



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en Comunidades Indígenas con asentamiento en Puerto Nariño (Amazonas), año 2016

Mario Alejandro Vega Marín

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
2018

Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en Comunidades Indígenas con asentamiento en Puerto Nariño (Amazonas), año 2016

Mario Alejandro Vega Marín

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias - Microbiología

Directora:

Martha Isabel Murcia Aranguren M.Sc., Ph.D.

Línea de Investigación:

Epidemiología molecular de la tuberculosis

Grupo de Investigación:

MICOBAC-UN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2018

A mis padres.

A mi hija.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis padres por su confianza y apoyo en todos los momentos de mi vida.

A la Universidad Nacional de Colombia.

A la Maestría en Ciencias-Microbiología.

A la profesora Martha I. Murcia A. por sus enseñanzas, su paciencia y su determinación que fueron, y son, una inspiración.

Al grupo de investigación MICOBAC-UN por su apoyo incondicional en la realización de los ensayos de laboratorio.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina.

A Viviana, mi compañera de vida, por su apoyo tanto académico como personal.

A la asociación indígena ATICOYA por permitir el ingreso del grupo de trabajo a las comunidades indígenas y lograr acercarnos a su realidad.

A mis compañeros médicos, nutricionistas, enfermeros, antropólogos, que trabajaron en el macro-proyecto “Fortalecimiento Intersectorial e Intercultural de la Estrategia “Alto a la Tuberculosis” en Comunidades Indígenas con Asentamiento en el Trapecio Amazónico (Parte 1- Puerto Nariño)” y demostraron su total compromiso con la población abordada.

A las comunidades indígenas de Puerto Nariño.

Resumen

Introducción: La tuberculosis, enfermedad infecciosa declarada como problema global de salud, afecta en mayor medida a grupos vulnerables entre los cuales se encuentran la población indígena. **Objetivo:** Determinar la epidemiología molecular de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en la población indígena del municipio de Puerto Nariño-Amazonas. **Metodología:** Estudio descriptivo de corte transversal realizado en 23 comunidades indígenas del Municipio de Puerto Nariño-Amazonas. Los aislados clínicos fueron recuperados en medio Löwenstein Jensen y BACTEC MGIT™ a partir de muestras de esputo de personas que presentaron sintomatología respiratoria (identificadas previamente por búsqueda activa). La susceptibilidad se determinó mediante métodos fenotípicos: proporciones múltiples y BACTEC MGIT™ SIRE; y genotípicos: GenoType®MTBDRplus y GeneXpert MTB/RIF®. La caracterización genotípica se realizó por spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 loci. Para los análisis de genotipificación se utilizaron bases de datos globales SITVIT (Instituto Pasteur de Guadeloupe) y el portal MIRU-VNTRplus. El poder de discriminación de los dos métodos empleados se calculó mediante el índice de discriminación de Hunter-Gaston (HGDI). **Resultados:** Se diagnosticaron 80 casos de tuberculosis activa, 76/80 (95%) en población indígena. Se recuperaron 74 aislados clínicos pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*, 70 en población indígena. El promedio de edad de los pacientes fue de 28,9 años. La genotipificación por spoligotyping determinó que el 100% de los aislados recuperados perteneció a la especie *M. tuberculosis*, además detectó 5 genotipos diferentes, el 98,57% (69/70) correspondió al linaje Euro-Americano y el 1,42% (1/70) presentó un patrón huérfano (patrón no reportado en la base de datos SpolDB4). Por MIRU-VNTR de 24 loci se discriminaron 14 genotipos diferentes, además en 2 pacientes se detectó la presencia de infecciones policlonales. La combinación de los resultados de los dos métodos permitió tener un mayor poder de discriminación. Se identificó un caso de TB-MDR en un menor de edad. **Conclusiones:** La población indígena en estudio presentó una alta prevalencia de tuberculosis pulmonar, 1.302 casos/100.000 habitantes. La genotipificación demostró la presencia de infección policlonal en dos pacientes que convivían en la misma comunidad, además se determinó alta homogeneidad genómica con 59/70 (84,3%) aislados clínicos agrupados en 8 clusters, sugiriendo posibles cadenas de transmisión activa reciente en la población intervenida. Un aislado clínico se confirmó MDR mediante las metodologías empleadas.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, MIRU-VNTR, población indígena, Puerto Nariño.

Abstract

Introduction: Tuberculosis, an infectious disease declared as a global health problem, affects to a greater extent vulnerable groups among which are the indigenous population. **Objective:** To determine the molecular epidemiology of the clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* circulating in the indigenous communities of Puerto Nariño-Amazonas. **Methodology:** Descriptive cross-sectional study carried out in 23 indigenous communities of Puerto Nariño-Amazonas. The clinical isolates were recovered in Löwenstein Jensen and BACTEC MGIT™ medium from sputum samples from people who presented respiratory symptomatology (previously identified by active search). Susceptibility was determined by phenotypic methods: multiple proportions and BACTEC MGIT™ SIRE; and genotypic: GenoType®MTBDRplus and GeneXpert MTB / RIF®. The genotypic characterization was performed by spoligotyping and 24 MIRU-VNTR loci. For the genotyping analyzes, global databases SITVIT (Pasteur Institute of Guadeloupe) and the MIRU-VNTRplus portal were used. The discrimination power of the two methods used was calculated using the Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI). **Results:** 80 cases of active tuberculosis were diagnosed, 76/80 (95%) in indigenous population. We recovered 74 clinical isolates belonging to the *M. tuberculosis* Complex, 70 in the indigenous population. The average age of the patients was 28,9 years. Genotyping by spoligotyping determined that 100% of the recovered isolates belonged to *M. tuberculosis* species, in addition detected 5 different genotypes, 98.57% (69/70) corresponded to Euro-American lineage and 1.42% (1/70) presented an orphan pattern (pattern not reported in the SpolDB4 database). By 24 MIRU-VNTR loci, 14 different genotypes were discriminated, and in 2 patients the presence of polyclonal infections were detected. The combination of the results of the two methods allowed to have a greater power of discrimination. A case of MDR-TB was identified in a younger. **Conclusions:** The indigenous population under study had a high prevalence of pulmonary tuberculosis, 1.302 cases / 100.000 inhabitants. Genotyping showed the presence of polyclonal infection in two patients living in the same community, and high genomic homogeneity was determined with 59/70 (84.3%) clinical isolates grouped in 8 clusters, suggesting possible chains of recent active transmission in the intervened population. A clinical isolate was confirmed by MDR by the methodologies used.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, MIRU-VNTR, indigenous population, Puerto Nariño.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Abreviaturas	XVII
Introducción	1
1. Planteamiento del problema	4
2. Justificación	8
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo General	10
3.2 Objetivos Específicos	10
4. Marco teórico	11
4.1 Características generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
4.2 Especies y linajes	16
4.3 Situación de la tuberculosis a nivel mundial	19
4.4 Situación de la tuberculosis en Colombia	21
4.5 Pueblos indígenas como población vulnerable a la tuberculosis	22
4.6 Métodos genotípicos para estudios epidemiológicos	25
4.6.1 Spoligotyping	27
4.6.2 MIRU-VNTR	29
4.6.3 Secuenciación total del genoma	34
4.7 Mecanismos de resistencia	36
4.8 Pruebas de susceptibilidad	38
4.8.1 Método de proporciones múltiples	39
4.8.2 Metodo automatizado BACTEC MGIT™	39
4.8.3 GenoType®MTBDRplus	39
4.8.4 GeneXpert MTB/RIF®	41
5. Metodología	42
5.1 Tipo de estudio	42
5.2 Población de estudio	42
5.3 Diagnóstico de TB activa mediante cultivo	43
5.4 Recolección de la información	43
5.5 Disposiciones éticas	43
5.6 Extracción de ADN	44
5.7 Spoligotyping	44
5.8 MIRU-VNTR de 24 loci	44
5.9 Análisis de datos de genotipificación	45
5.10 Susceptibilidad por el método de proporciones múltiples	45
5.11 Susceptibilidad por BACTEC™ MGIT™ SIRE	46
5.12 Susceptibilidad por GenoType®MTBDR plus 2.0	46

5.13 Susceptibilidad por GeneXpert MTB/RIF®	46
6. Resultados	48
6.1 Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con tuberculosis activa	48
6.2 Recuperación de los aislados clínicos	51
6.3 Genotipificación mediante spoligotyping	51
6.4 Genotipificación por MIRU-VNTR de 24 loci	56
6.5 Genotipificación por spoligotyping y MIRU-VNTR 24 loci.	69
6.6 Interpretación de resultados de genotipificación	72
6.7 Evaluación de la susceptibilidad por métodos fenotípicos y genotípicos.	76
7. Discusión	79
8. Conclusiones y recomendaciones	85
8.1 Conclusiones	85
8.2 Recomendaciones	86
9. Bibliografía	87
A. Anexo 1: Genotipificación molecular por Spoligotyping	96
B. Anexo 2: Genotipificación por MIRU-VNTR de 24 loci	99
C. Anexo 3: Correspondencia entre peso molecular y número de copias en cada loci	101
D. Anexo 4. Prueba de susceptibilidad por método de proporciones múltiples	102
E. Anexo 5. Prueba de susceptibilidad por BACTEC™ MGIT™ SIRE	104
F. Anexo 6. Prueba de susceptibilidad por GenoType®MTBDR plus 2.0	105
G. Anexo 7. Número de repeticiones de los 24 loci analizados en cada aislado clínico.	108
H. Anexo 8. Georreferenciación de los casos de tuberculosis por genotipo (clusters)	109

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Representación del genoma circular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	12
Figura 2: Estructura filogenética del complejo <i>M. tuberculosis</i> .	18
Figura 3: Tasa de incidencia de tuberculosis estimada, año 2016.	21
Figura 4: Representación esquemática del genoma de <i>M. tuberculosis</i> y sus marcadores moleculares.	27
Figura 5: Visualización de espaciadores presentes en varias cepas del complejo <i>M. tuberculosis</i> .	28
Figura 6: Posición de loci MIRU en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	30
Figura 7: Posición de los 24 MIRUs utilizados actualmente para genotipificación molecular	34
Figura 8: Mutaciones en genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> y sus correspondientes bandas wild type WT y mutación MUT.	40
Figura 9: Edad de los pacientes diagnosticados con tuberculosis.	50
Figura 10: Georreferenciación de pacientes diagnosticados con tuberculosis.	50
Figura 11: Película de revelado de spoligotyping # 1.	52
Figura 12: Distribución de los genotipos encontrados por spoligotyping.	52
Figura 13: Dendrograma formado por SITs obtenidos mediante spoligotyping.	54
Figura 14: Árbol de expansión mínima por creado a partir del Spoligotyping.	56
Figura 15: Locus MIRU 4.	57
Figura 16: Loci MIRU 47 y MIRU 2.	57
Figura 17: Locus MIRU 10.	58
Figura 18: Locus MIRU 20	58

Figura 19:	Locus MIRU 24.	59
Figura 20:	Locus MIRU 39	59
Figura 21:	Locus MIRU 40.	60
Figura 22:	Locus MIRU 42.	60
Figura 23:	Locus MIRU 47.	61
Figura 24:	Locus MIRU 48.	61
Figura 25:	Locus MIRU 52.	62
Figura 26:	Locus MIRU QUB-11b	62
Figura 27:	Locus MIRU QUB-26.	63
Figura 28:	Locus MIRU 26	63
Figura 29:	Locus MIRU 43.	64
Figura 30:	Locus MIRU 49.	64
Figura 31:	Dendrograma formado por los patrones MIRUs obtenidos.	65
Figura 32:	Árbol de expansión mínima basado en MIRU-VNTR.	66
Figura 33:	Dendrograma formado por la combinación de las metodologías spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 loci	71
Figura 34:	Distribución de Clusters por Comunidad.	75
Figura 35:	Tiras de nitrocelulosa de GenoType® MTBDRplus.	77

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Secuencia de los 24 loci MIRUs.	31
Tabla 2: Caracterización demográfica de los 74 pacientes con TB activa.	49
Tabla 3: Genotipos de <i>M. tuberculosis</i> circulantes por comunidad].	55
Tabla 4: Porcentaje de frecuencia alélica de los 24 loci analizados.	67
Tabla 5: Diversidad alélica por HGDI de los 24 loci MIRU-VNTR analizados	68
Tabla 6: Comparación del poder discriminatorio de cada método genotípico utilizado	72
Tabla 7: Distribución de los aislados clínicos por clusters en las comunidades indígenas	74
Tabla 8: Resultados de las pruebas de susceptibilidad realizadas.	78
Tabla 9: Mix pre-PCR para amplificación del locus DR.	96
Tabla 10: Ciclos térmicos para PCR del locus DR	97
Tabla 11: Mix pre-PCR para amplificación de los 24 loci MIRUs	99
Tabla 12: Ciclos térmicos para PCR de los 24 loci MIRUs	100
Tabla 13: Correspondencia entre peso molecular y copias de loci	101
Tabla 14: Ciclos térmicos para PCR de los genes a evaluar por GenoType®	105
Tabla 15: Repeticiones MIRU-VNTR en aislados clínicos	108

Lista de Abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
BAAR	Bacilo Alcohol Ácido Resistente
CMTB	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRISPR	Clustered regulary interspaced short palindromic repeats
DOTS-TAES	Directly Observed Treatment Short-Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
DR	Direct Repeat
ETR	Exact Tandem Repeat
INS	Instituto Nacional de Salud
IS	Insertion Sequence (Secuencia de inserción)
LJ	Lôwentein Jensen
LSP	Large Sequence Polymorphysm (Polimorfismo de secuencia larga)
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspered Repetitive Units-Variable NumberTandem Repeat
MPTR	Major Polymorphic Tandem Repeat
ODM	Objetivos del Milenio
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SIT	Spoligotype International Type
SIVIGILA	Sistema Nacional de Vigilancia
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de único nucleótido)
TB	Tuberculosis

TB-MDR	Tuberculosis-Multi Drogo Resistente
TB-XDR	Tuberculosis-Extremadamente Resistente
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

Introducción

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis*. En 1991, fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como problema global de salud pública (World Health Organization, 2006) y considerada como la segunda causa de muerte debida a un solo agente infeccioso, permaneciendo como una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo (World Health Organization, 2017).

La OMS estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, el 80% de personas infectadas en países industrializados son mayores de 50 años, mientras que el 75% de infectados en países en desarrollo son menores de 50 años. Las personas infectadas con *M. tuberculosis* que no desarrollan síntomas tienen tuberculosis latente y son el reservorio de la bacteria. Solamente entre 5-10% de ellos desarrollarán la enfermedad en algún momento de su vida (Kochi, 1991).

En el año 2016, la OMS, estimó que se presentaron en el mundo 10.4 millones de casos nuevos de tuberculosis (incidencia 140 casos /100.000 habitantes), de los cuales el 10% estaba coinfectado con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), siendo el riesgo de desarrollar TB entre los 37 millones de personas viviendo con el VIH 21 veces mayor que en el resto de la población (World Health Organization, 2017).

Aproximadamente el 10% de los casos de TB se presentó en niños, y 1.8 millones de personas fallecieron por la enfermedad. Además en el mismo año se estimó se presentaron 490.000 casos de tuberculosis multi-drogo-resistente (TB-MDR), resistente a los dos principales fármacos antituberculosos de primera línea rifampicina e isoniazida, mientras que 110.000 casos fueron mono-resistentes a Rifampicina, es decir Pre-MDR (World Health Organization, 2017).

En Colombia, en el año 2015 se reportaron 12918 casos de tuberculosis en todas sus formas, de los cuales 11647 correspondieron a casos nuevos, para una incidencia nacional de 24,2 casos /100.000 habitantes. Los departamentos con mayor incidencia fueron Amazonas (72,1 casos /100.000 habitantes), Risaralda (47,2 casos /100.000 habitantes) y Chocó (45,4 /100.000 habitantes) (Instituto Nacional de Salud SIVIGILA, 2015).

El 70% de los casos de TB corresponde a la forma pulmonar, siendo ésta presentación la responsable de la transmisión persona a persona. La afección de otros órganos se conoce como tuberculosis extra-pulmonar y sus principales localizaciones son la ganglionar, pleural, urogenital, meníngea y osteoarticular (O'Garra, y otros, 2013).

Se ha establecido que la tuberculosis afecta en mayor proporción a grupos de alto riesgo tales como individuos VIH positivos, gestantes, diabéticos, etc y a población vulnerable como: población carcelaria, desplazados, trabajadores de salud y población indígena. La población indígena vive en regiones geográficas aisladas con duras condiciones ambientales y de difícil acceso. Además las creencias culturales, organización política y conocimientos ancestrales de medicina pueden influir significativamente en la salud y bienestar de cada pueblo (Montenegro & Stephens, 2006).

De acuerdo a varios estudios se ha observado que la población indígena tiene tasas de incidencia y prevalencia de tuberculosis más altas que la población general. Como ejemplos se puede citar Perú que reportó en población indígena una incidencia de 114,4 casos/100.000 habitantes y Brasil 189,2 casos/100.000 habitantes. En Colombia las tasas de incidencia varían de acuerdo a los grupos étnicos, encontrándose tasas que están entre 60 a 112 casos/100.000 habitantes (Organización Panamericana de la Salud, 2004). Sin embargo estudios puntuales en poblaciones indígenas específicas han determinado tasas de incidencia de hasta 291 casos/100.000 habitantes, esto en 10 comunidades indígenas del departamento de Antioquia entre 2009-2010 (Hernández Sarmiento, y otros, 2013).

La prevención de la tuberculosis en Colombia ha sido prioritaria en los programas nacionales de salud pública. En el año 2009 se lanzó el plan estratégico "Colombia libre de tuberculosis 2010-2015 para la expansión y fortalecimiento de la Estrategia Alto a la TB", e incluyen: mejorar acceso universal al diagnóstico y tratamiento de la TB-MDR y TB extremadamente resistente (TB-XDR); mejorar calidad y cobertura de la estrategia DOTS; aumentar sustancialmente las inversiones en investigación operativa así como en investigación y desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, nuevos medicamentos y vacunas para prevenir y tratar la tuberculosis (MPS, INS, & OPS, 2009).

Las técnicas moleculares utilizadas en epidemiología molecular permiten identificar los genotipos de *M. tuberculosis* circulantes tanto a nivel global como a nivel local, información importante para entender la dinámica de transmisión de la enfermedad y controlar la TB en todas las regiones del mundo. Entre las técnicas más utilizadas para esta caracterización se encuentran el polimorfismo de la longitud de fragmentos largos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110), Spoligotyping y MIRU-VNTR de 15 o 24 loci; cada una de las cuales utiliza como blanco regiones cromosómicas diferentes que permiten determinar la huella dactilar (fingerprinting) de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* que circulan en todo el mundo y determinar así el linaje al cual pertenecen. La importancia epidemiológica de determinar los linajes radica en que ciertos linajes y sub-linajes causan mayor progresión a enfermedad activa y son más virulentos, de acuerdo a estudios en modelos animales, y están implicados en brotes de TB-MDR (Brites & Gagneux, 2015).

1. Planteamiento del problema

La tuberculosis (TB) ha sido declarada como un grave problema de salud pública a nivel mundial y es una de las principales causas de muerte causada por un solo agente infeccioso, situada incluso por encima del VIH.

En Colombia, la TB es considerada endémica. En el año 2015, las entidades territoriales que presentaron las incidencias más altas fueron: Amazonas, Risaralda y Chocó con 72,1; 47,2 y 45,4 casos/ 100.000 habitantes, respectivamente. De acuerdo a grupos poblacionales específicos, en población indígena se notificaron 689 casos de tuberculosis de todas las formas, el 54,1 % correspondió al sexo masculino y el 14,9% de los casos lo aportaron las personas mayores de 65 años (Instituto Nacional de Salud SIVIGILA, 2015).

Específicamente en el departamento del Amazonas se encontró un aumento de la incidencia de TB en el periodo 2001-2005, con una incidencia de 114 casos/100.000 habitantes para el año 2005. Además el corregimiento departamental La Chorrera y los municipios de Puerto Nariño y Leticia registraron las mayores tasas de incidencias en el departamento del Amazonas con tasas de 168, 167 y 142 / 100.000 habitantes, respectivamente (MPS, INS, ACIDI, OPS, OMS, 2007). De acuerdo al Programa de Control de Tuberculosis del Departamento del Amazonas, en Puerto Nariño la incidencia de TB al año 2010 fue de 172 casos/100.000 habitantes, al año 2011 104 casos/100.000 habitantes y al año 2012 fue de 90 casos/100.000 habitantes; y como meta el municipio planeó disminuir para el año 2015 un 30% la incidencia de TB en el municipio de Puerto Nariño mediante la atención clínica de al menos el 90% de los casos de TB (Municipio de Puerto Nariño-Amazonas, 2012).

Adicionalmente, se ha determinado que existen grupos poblacionales que tienen mayor susceptibilidad de contraer y desarrollar la enfermedad, debido a la presencia de factores de riesgo tales como: inmunodeficiencia, hacinamiento, alcoholismo y drogadicción, desnutrición, deficiente acceso a sistemas de salud óptimos, entre otros. En la población indígena confluyen varios de estos factores que hacen que se considere una población vulnerable para TB (Herrera, 2015).

La población indígena, a pesar de su enorme diversidad en pueblos, tiene factores comunes entre ellos, tales como: la cultura (conocimiento, identidad, estrategias de bienestar), política (autodeterminación, estructuras jerárquicas, territorio), espiritualidad (ideología, creencias y religión) y ecológica (uso de recursos naturales, ciclos ecológicos) que determinan su identidad (Montenegro & Stephens, 2006). Esta población tiene un riesgo mayor que la población general para la adquisición de enfermedades infecciosas como la tuberculosis, debido a la falta de acceso oportuno a los servicios de salud, marginación, pobreza, así como a sus características socio-antropológicas, que causan retraso en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (Cardona-Arias & Hernández-Petro, 2013) (Culqui, y otros, 2010).

En el encuentro regional de lucha contra la tuberculosis, en población indígena realizado en la ciudad de Panamá en 2004, se analizaron las diferencias con respecto a la incidencia de TB en población indígena versus la incidencia de TB en población general. En este encuentro se evidenció, por ejemplo, que la población indígena de Venezuela tiene 6 veces más incidencia que la población general. Paraguay es el país que presenta la mayor incidencia en población indígena de la región (392,2 casos/100.000 habitantes), siendo esta 10 veces mayor que la incidencia de la población general (Organización Panamericana de la Salud, 2004).

Culqui y colaboradores realizaron un estudio en el año 2008 en población indígena del Perú y encontraron una incidencia en esta población de 106 casos/100.000 habitantes, con rangos en las distintas comunidades indígenas que van desde 42,3 casos/100.000 habitantes en la comunidad de Aguaruna, hasta 400,9 casos/100.000 habitantes en la comunidad de Cashibo-Cacataybo (Culqui, y otros, 2010).

Investigaciones en Colombia respecto a pueblos indígenas son escasas, un estudio en 10 comunidades indígenas de Antioquia realizado por Hernández y colaboradores (2012) determinó una incidencia de 291 casos/100.000 habitantes. Sin embargo únicamente el 35% de la población participó en dicho estudio (Hernández Sarmiento, y otros, 2013). No existen estudios específicos que caractericen los genotipos circulantes en la población indígena colombiana.

El agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, es un patógeno intracelular que ha evolucionado a través de su historia en respuesta a diferentes fuerzas evolutivas, y en particular junto con la expansión demográfica humana hace unos 20-35 mil años. Estudios genéticos y arqueológicos han demostrado fenómenos esperados tales como la co-evolución huésped-patógeno, en especial la adaptación local de linajes con características genóticas similares (Brites & Gagneux, 2015). El análisis de varios genomas secuenciados representativos del complejo *M. tuberculosis* ha determinado una población altamente clonal y ha permitido la clasificación del complejo *M. tuberculosis* en 7 linajes filogenéticos principales que tienen la característica de tener una distribución geográfica diferencial y una asociación con poblaciones específicas. Además, se ha determinado la asociación de ciertos linajes con mayor adaptabilidad y virulencia, así por ejemplo el linaje 4 (Euro-Americano) se encuentra extendido en Europa, América, Asia y África; y el linaje 2 (Este de Asia, incluyendo familia Beijing) predomina en el este de Asia, pero también se encuentra presente en el centro de Asia, Rusia y Sudáfrica. Estos dos linajes también han estado implicados en grandes brotes causados por cepas MDR y son más virulentos de acuerdo a estudios realizados en varios modelos animales (Brites & Gagneux, 2015) (Coscolla & Gagneux, 2014).

El desarrollo de la genómica ha permitido determinar regiones cromosómicas que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares y discriminar los aislados clínicos de acuerdo a su variabilidad genética. La aplicación de estas metodologías ha permitido optimizar los estudios epidemiológicos y entender de mejor manera la dinámica de transmisión de la tuberculosis, esto es participación de cepas específicas en cadenas de transmisión reciente, reinfecciones, recaídas y presencia de infecciones mixtas (presencia de dos o más cepas diferentes).

Los esfuerzos globales para controlar la tuberculosis se iniciaron hace más de 20 años, desde que la tuberculosis fue declarada como problema global de salud pública, en el año 1993, por la Organización Mundial de la Salud, lanzándose la estrategia DOTS-TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) en el año 1994 y posteriormente la estrategia “Alto a la tuberculosis” que está relacionada con los Objetivos el Milenio y buscaba reducir los casos de tuberculosis hacia el año 2015. Actualmente la estrategia “Fin a la Tuberculosis” reemplaza a la estrategia “Alto a la Tuberculosis” y va de la mano con las nuevas metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Para lograr

alcanzar el objetivo de poner fin a la epidemia mundial de la tuberculosis es necesario, entre otras estrategias, intensificar la investigación y la innovación (World Health Organization, 2014).

Las investigaciones en este campo permiten mejorar los sistemas de salud, pues, de acuerdo al tipo de investigación, se pueden desarrollar nuevas herramientas diagnósticas, nuevos blancos para el desarrollo de medicamentos y vacunas, y optimizar los programas de tuberculosis a nivel local al plantear nuevas estrategias de intervención de acuerdo a las características propias de cada región. Es en este campo donde se hace necesario la caracterización de los genotipos circulantes en poblaciones vulnerables específicas, como los pueblos indígenas, y determinar patrones de susceptibilidad, para trasladar estos resultados a la salud pública con el fin de mejorar los programas de tuberculosis y de controlar la transmisión efectiva de cepas de *M. tuberculosis* sensibles y resistentes.

2. Justificación

La marginación de la población indígena en Colombia se ve reflejada en los índices altos de necesidades básicas insatisfechas, pobreza, falta de tierra, desempleo, analfabetismo, deserción escolar, y un perfil epidemiológico en el que la prevalencia de enfermedades transmisibles como la tuberculosis supera ampliamente las cifras reportadas en población general.

El Ministerio de la Protección Social y la OPS en el documento “*Enfoque intercultural, prevención de la tuberculosis en pueblos indígenas 2009*” recomiendan unir esfuerzos y concertar alianzas público-privadas que lleguen a las comunidades y mediante un “diálogo bidireccional” con ellas logren implementar actividades dirigidas al control de la enfermedad.

El departamento de Amazonas tiene alta proporción de población indígena y es la región del país que presenta la tasa de incidencia más alta. Puerto Nariño en el año 2010 presentó una incidencia de TB de 186,2 casos/100.000 habitantes y se planteó como meta disminuir un 30% la incidencia de TB en este municipio para el año 2015, mediante la atención clínica de al menos el 90% de los casos de TB en el municipio (Municipio de Puerto Nariño-Amazonas, 2012).

Controlar la TB en las comunidades indígenas con las actuales condiciones de programa no es posible. Las actividades educativas, la captación de pacientes y el seguimiento del tratamiento solo se ofrecen en las cabeceras municipales en donde muy pocos indígenas tienen acceso, ya sea por limitaciones culturales, económicas, o como consecuencia del conflicto armado. La desaparición paulatina del promotor de salud en el sistema actual, hace más difícil la labor de identificación y referencia de sintomáticos respiratorios y no permite que los tratamientos puedan ser administrados directamente en la comunidad.

Abordar la TB en los pueblos indígenas de Colombia fortaleciendo intersectorial e interculturalmente la estrategia “Alto a la TB” se convierte en una necesidad, que permitirá lograr reducir la morbilidad y mortalidad por tuberculosis en sus territorios.

En Colombia se desconocen los genotipos de *M. tuberculosis* circulantes en comunidades indígenas de Puerto Nariño, por lo que su determinación permitirá dilucidar la dinámica de transmisión de la TB en estas poblaciones vulnerables de frontera.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la epidemiología molecular de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en la población indígena del municipio de Puerto Nariño (Amazonas).

3.2 Objetivos Específicos

1. Genotipificar los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* en población indígena de Puerto Nariño mediante técnicas moleculares.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en población indígena de Puerto Nariño a medicamentos antituberculosos de primera línea.

4 Marco teórico

4.1 Características generales de *Mycobacterium tuberculosis*

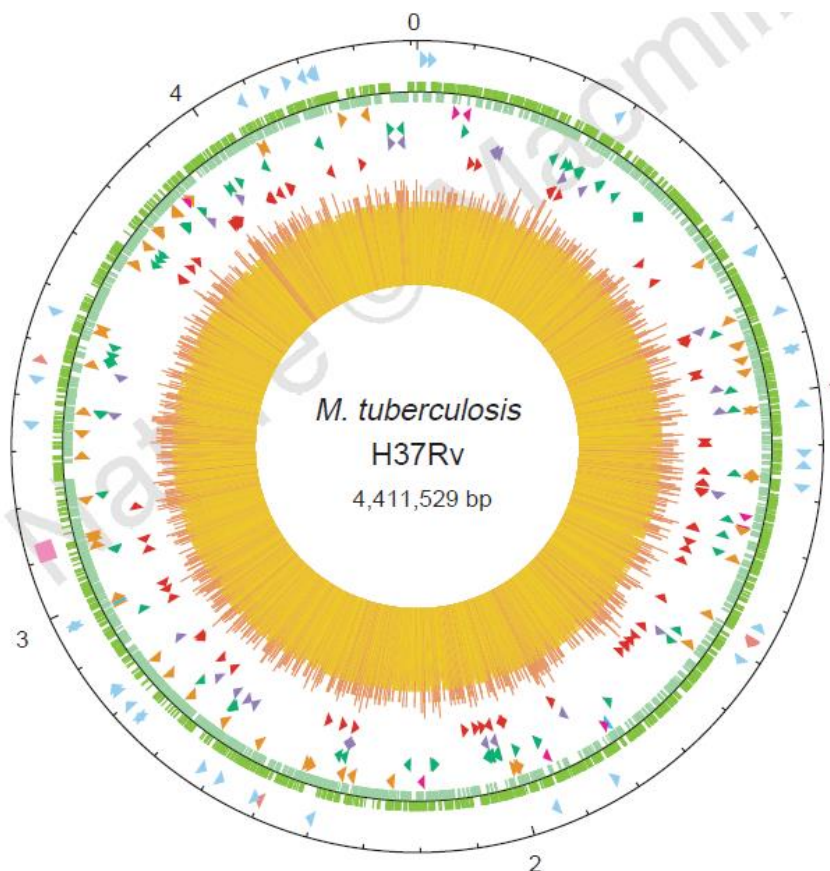
Mycobacterium tuberculosis es un microorganismo patógeno intracelular de crecimiento lento, con una pared celular compleja, rica en lípidos de cadena larga y con una alta homogeneidad genética. El tiempo de generación es de 12 a 24 horas lo que contribuye a su lento crecimiento, carácter crónico y largos periodos de tratamiento (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006) (Cole, y otros, 1998).

El complejo *M. tuberculosis* abarca 11 miembros capaces de producir tuberculosis en el huésped, aunque 4 especies son referidas tradicionalmente como miembros del complejo: *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium africanum*. “*M. canetti*”, que se considera la variante lisa de *M. tuberculosis*. Estos son genéticamente idénticos en la secuencia 16S ARNr con una similitud del 99% (Mostowya & Behr, 2005), Los otros miembros del complejo están adaptadas a especies de animales domésticos o salvajes y son: *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, “*M. orygis*”, “*M. mungi*” y “*M. suricatae*”, además del “bacilo chimpanzee” (Coscolla & Gagneux, 2014), pueden hacer zoonosis. Este último fue aislado de un chimpancé salvaje en Costa de Marfil, África. Se encuentra emparentado más cerca al linaje 6 (*M. africanum* oeste de África 2, descrito más adelante) que a las cepas adaptadas a animales. La cepa se aisló de un chimpancé hembra en el curso de una investigación de enfermedades y comportamiento de chimpancés en el Parque Nacional Taï, Costa de Marfil en el año 2009. Posterior a una secuenciación completa mediante la plataforma 454 (Roche, Penzberg, Germany) e Illumina (Illumina, Inc., San Diego, USA) se confirmó que el aislado pertenecía no solo al complejo *M. tuberculosis* sino que compartía 32 SNPs del linaje 6, adaptado a humanos (Coscolla, y otros, 2013).

La cepa de referencia H37Rv fue aislada en el año 1905 a partir del esputo de un paciente de 19 años con tuberculosis pulmonar y denominada H37 y posteriormente disociada en dos variantes: virulenta (Rv) y avirulenta (Ra) en el año 1934 (Bifani, y otros, 2000). La cepa H37Rv, ha sido utilizada para diversos estudios biomédicos, puesto que ha conservado su virulencia total en estudios que utilizan modelos animales, además es

susceptible a fármacos antituberculosos y manipulación genética. En base a esta cepa de referencia se ha determinado el tamaño del cromosoma micobacteriano en 4.411.529 pares de bases, con un alto contenido G+C, con un promedio de 65,6% y un alto contenido de secuencias repetitivas (Cole, y otros, 1998). En la siguiente figura se puede observar el genoma circular de *M. tuberculosis* H37Rv. Se puede observar la ubicación del locus DR (elemento perteneciente a la familia CRISPR) importante para la genotipificación del complejo por el método Spoligotyping, representado por un cuadro rosa.

Figura 1. Representación del genoma circular de *M. tuberculosis* H37Rv



Genoma circular de *M. tuberculosis* H37Rv. El círculo exterior muestra la escala en Mb, 0 representando el origen de replicación. El primer anillo indica las posiciones de genes de ARN estables (ARNt mostrados en azul, otros genes en rosa) y la región DR en cuadro rosa; El segundo anillo muestra las secuencias codificantes por cadena (en sentido horario de color verde oscuro, en sentido anti horario de color verde claro); El tercer anillo representa ADN repetitivo (secuencias de inserción de color naranja, familia 13E12 REP de color rosa, profago de azul); El cuarto anillo muestra las posiciones de los miembros de la familia PPE (verde); El quinto anillo muestra los miembros de la familia PE (púrpura, excluyendo PGRS); Y el sexto anillo muestra las posiciones de las secuencias de PGRS (rojo oscuro). El histograma (centro) representa el contenido de G+C, con < 65% G + C en amarillo y > 65% G + C en rojo. Tomado de: (Cole, y otros, 1998).

Las secuencias de inserción (IS) son fragmentos de ADN con un tamaño menor de 2.500 pb con una organización genética simple, no poseen secuencias codificadoras a excepción de las involucradas en su movilidad y exhiben secuencias cortas de repetición invertida terminales de entre 10-40 pb (Mahillon & Chandler, 1998). Se han identificado 32 secuencias de inserción diferentes en el cromosoma micobacteriano. La IS6110, descrita en 1990, posee un tamaño de 1361 pb y se encuentra en micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (Thierry, y otros, 1990) utilizándose como marcador molecular tanto para identificación como para genotipificación de cepas del complejo *M. tuberculosis*.

Dos elementos tipo-profagos han sido anotados en el genoma de H37Rv: phiRV1 y phiRV2, ambos de un tamaño aproximado de 10 Kb, y también se han hallado en otros genomas de *M. tuberculosis*. Ambos elementos codifican sistemas de escisión e integración que les permite moverse de una posición cromosomal a otra. La cepa de laboratorio *M. bovis* BCG perdió el elemento phiRV1 tras su sucesiva atenuación (Cole, y otros, 1998).

El genoma de *M. tuberculosis* incluye además tres sistemas CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) que poseen una serie de repeticiones directas cortas de entre 21 a 37 pb, separadas por secuencias espaciadoras únicas que varían entre 20 a 40 pb (Lamrabet & Drancourt, 2012). Los sistemas CRISPR, junto con proteínas codificadas por genes *cas* que se encuentran asociados a CRISPR (*cas*, CRISPR associated genes), protegen a los diferentes microorganismos contra elementos genéticos móviles como fagos o plásmidos, mediante la incorporación de secuencias cortas específicas del elemento genético invasor en el locus CRISPR y guían la destrucción del elemento genético por la transcripción de ARN que contiene la secuencia específica del elemento invasor. Se han encontrado estos sistemas en aproximadamente 40% de especies bacterianas y en la gran mayoría de arqueas que tienen genomas secuenciados (Karginov & Hannon, 2010).

La comparación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG reveló la presencia de 10 regiones de diferenciación, nombradas RD1 a RD10, relacionadas con *M. tuberculosis*. Tres de estas regiones, RD1 a RD3, se encuentran deletionadas específicamente en el genoma de la cepa vacunal *M. bovis* BCG; y siete regiones de, RD4 a RD10, se encuentran deletionadas en las cepas virulentas de *M. bovis* (Gordon, y otros,

1999). Estas deleciones afectan la expresión génica y fenotípica de la bacteria, puesto que dentro de los productos codificados en estos loci se encuentran invasinas Mce, proteínas PE, PPE y ESAT-6, epóxido hidrolasas y una secuencia de inserción IS1532. Además se determinó 2 loci en H37Rv, RvD1 y RvD2, que se encuentran delecionados con relación al genoma de *M. bovis* BCG y *M. bovis* (Gordon, y otros, 1999). En el caso de la región RD1, de una extensión de 9,5 Kb, la reintroducción de esta región en la cepa BCG resultó en la expresión fenotípica de virulencia de la cepa similar a las cepas virulentas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis* (Mahairas, Sabo, Hickey, Singh, & Stover, 1996).

Se han determinado 5 sistemas de secreción tipo VII, los cuales son los principales factores de virulencia de la micobacteria (ESX1 a ESX5). La cepa *M. bovis* BCG ha perdido el sistema ESX1 el cual es un factor de virulencia importante de *M. tuberculosis*. Este sistema de secreción es el mejor estudiado y secreta los antígenos ESAT-6 (Early-Secretory Antigenic-Target protein 6), CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10) y proteínas de las familias PE y PPE, entre otros factores de virulencia. Los sistemas ESX3 y ESX5 participan en la adquisición de hierro y zinc, y en la secreción de proteínas PE y PPE, respectivamente; y el rol de los sistemas ESX2 y ESX4 no han sido dilucidados completamente (Delogu, Sali, & Fadda, 2013).

Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 son codificados por los genes Rv3874 y Rv3875, respectivamente, se encuentran localizados en la región RD1 y son secretados por el sistema ESX1. ESAT-6 posee un 75 % de estructura helicoidal secundaria y CFP-10 posee una estructura secundaria no específica o "random coil". Ambos antígenos forman un estrecho complejo 1:1 (Renshaw, y otros, 2002). Los antígenos son los blancos de las células T en las fases iniciales de la infección generando una respuesta específica de células Th1 con la liberación de varias interleucinas (IL-12, IFN- γ y TNF- α) importantes para la formación del granuloma, y son la base del diagnóstico inmunológico de TB latente (TBL) en los ensayos de liberación de interferón gamma, o IGRAs por sus siglas en inglés (Delogu, Sali, & Fadda, 2013).

Existen familias de proteínas ricas en glicina que, al igual que CFP-10 y ESAT-6, poseen importancia inmunológica y son especialmente abundantes. Estas familias se denominan PE y PPE por su composición de aminoácidos en los motivos de su N terminal. PE por Prolina-Ácido glutámico y PPE por Prolina-Prolina-Ácido glutámico. Aproximadamente el

10% del genoma codificante se emplea para la producción de estas proteínas (Cole, y otros, 1998). La familia PE y PPE comprenden aproximadamente 100 y 70 genes, respectivamente, y podrían ser la mayor fuente de variación antigénica por medio de su polimorfismo entre distintas cepas. La familia PE se subdivide en tres grupos formados cada uno por 29, 8 y 67 miembros. El último grupo exhibe un dominio PE seguido de repeticiones en tándem de Gly-Gly-Ala o Gly-Gly-Asn y son llamadas PE_PGERS (Polymorphic GC-rich Repetitive Sequences) (Mukhopadhyay & Narayanaswamy, 2011). La familia PPE se subdivide en al menos tres grupos, uno de los cuales constituye la clase MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeats) y son caracterizados por repeticiones en tándem de Asn-X-Gly-X-Gly-Asn-X-Gly (Cole, y otros, 1998).

Otra de las características importantes del microorganismo es su capacidad de entrar en un estado de dormancia en el cual se disminuyen los procesos metabólicos celulares, y en el que no se detectan síntomas relacionados con tuberculosis, estableciendo reservorios de la enfermedad en la comunidad. Las bacterias utilizan esta adaptación pues no siempre se encuentran en condiciones de crecimiento favorables, como lo proveen los medios de cultivos de laboratorio. La formación de endosporas por *Bacillus spp.* y el establecimiento en fase estacionaria de *Escherichia coli* son ejemplos de la capacidad de adaptación de los microorganismos, los cuales están gobernados por complejos procesos moleculares (Voskuil, Visconti, & Schoolnik, 2004). En *M. tuberculosis* este estado se ve influenciado por hipoxia, cambios en pH, depleción de nutrientes y/o síntesis de productos tóxicos, lo que provoca que la bacteria restrinja su actividad biosintética, induzca sistemas enzimáticos para utilizar fuentes de energía alternativa y desarrolle mecanismos para estabilizar el contenido de su citosol (Wayne & Sohaskey, 2001). Un modelo experimental en ratones ha determinado que la baja tensión de oxígeno y la presencia de óxido nítrico o monóxido de carbono activa un sistema regulatorio de tres componentes: DosS, DosT y DosR, el último activa finalmente la transcripción de un set de 48 genes conocidos regulón DosR, necesarios para la supervivencia bajo condiciones anaeróbicas (Bartek, y otros, 2009). Otro modelo experimental *in vitro*, determinó la sobre-regulación de genes involucrados en respiración anaerobia (*narG*, *cysH*, *nirA*, *fdhF*), en el ciclo de ácidos tricarboxílicos (*aceA*, *gltA1*, *pckA*) y varios genes que participan en la β -oxidación de ácidos grasos, así como la expresión de factores de transcripción alternativos (*sigB*, *sigE*, *sigH*) que alteran la expresión de genes de acuerdo a las condiciones de estrés (Hampshire, y otros, 2004).

Otra de las características del bacilo tuberculoso es ser una bacteria ácido-alcohol resistente (BAAR), pues en la estructura de su pared celular se encuentra un alto contenido de lípidos que impiden que los colorantes utilizados penetren en la bacteria, además esta baja permeabilidad contribuye a su resistencia a agentes terapéuticos, permite su crecimiento dentro de los macrófagos infectados y su persistencia dentro del huésped (Brennan & Nikaido, 1995) (Pawelczyk & Kremer, 2014). La membrana celular posee características comunes a otras bacterias, sin embargo los fosfolípidos se encuentran altamente glicosilados formando moléculas de importancia inmunológica como los lipoarabinomananos (LAM). Otros compuestos característicos de la membrana celular son productos derivados de politerpenos como carotenoides y menaquinonas (Brennan & Nikaido, 1995).

Los lípidos que componen su pared celular incluyen ácidos micólicos de cadena larga, entre 60-90 carbonos, unidos covalentemente al arabinogalactano, a su vez unidos a peptidoglicano, constituyendo el núcleo de la pared celular o mAGP (mycolyl arabinogalactan peptidoglycan, por sus siglas en inglés); además se encuentran proteínas, fosfatidilinositol manósidos, lipomanano y lipoarabinomanano (LAM), los cuales pueden ser separados del mAGP mediante varios solventes, por lo que se puede considerar que los lípidos, proteínas y lipoglicanos que son extraídos son las moléculas efectoras en los procesos de la enfermedad, mientras que el mAGP es vital para la viabilidad del microorganismo y por ende, blanco para el desarrollo de nuevos fármacos (Brennan, 2003).

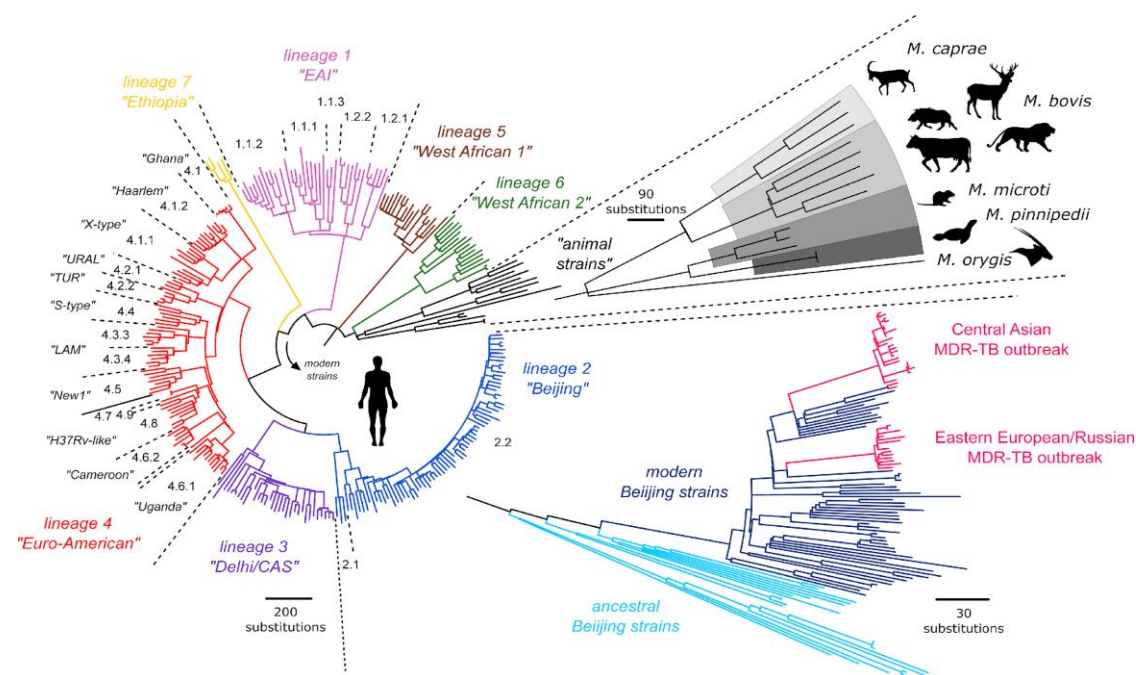
4.2 Especies y linajes

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende varios miembros que comparten el 99,9% de identidad de ADN, y se han agrupado en linajes filogenéticamente distintos, los cuales se asocian con diferentes regiones geográficas. La secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis* en la última década, junto con la genómica comparativa ha permitido tener un robusto marco filogenético y determinar la presencia de polimorfismos de un nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), deleciones genómicas y polimorfismos de larga secuencia (LSP, por sus siglas en inglés) y así determinar su clasificación en los diferentes linajes (Coscolla & Gagneux, 2014).

La mayoría de linajes se caracterizan por una distribución geográfica diferencial y asociación estable con poblaciones específicas, lo cual ha sugerido una co-evolución con la expansión del hombre desde África hace aproximadamente 20 a 35 mil años. Se han establecido 7 linajes principales asociados a infección en humanos (*Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* linajes 1-4 y 7; y *M. africanum* linajes 5 y 6), al menos una rama filogenética asociada con especies presentes en mamíferos (*M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. mungi* y *M. suricattae*); y una rama conformada por bacterianas llamadas “smooth tubercle bacilli” (STB) las cuales al parecer están más relacionadas con el ancestro común del CMTB, incluyen a *M. canneti*, con características únicas como transferencia horizontal de genes y recombinación inter-cepas (Brites & Gagneux, 2015) (Coscolla & Gagneux, 2014).

Los diferentes estudios de secuenciación completa del genoma han revelado que existe una distancia genética máxima de 2.200 SNPs entre cepas animales y humanas, y una máxima de 1.800 SNPs entre linajes (Niemann, Merker, Kohl, & Supply, 2016). Los linajes ancestrales asociados a humanos (linajes 1, 5, 6 y 7) se encuentran confinados en África, mientras que los linajes modernos (2, 3 y 4) se encuentran más dispersas, así, se observa que el linaje 3 se encuentra distribuido principalmente en Asia, el linaje 2 se encuentra asociado principalmente en pacientes del este de Asia, aunque cepas pertenecientes a las ramas más modernas del linaje 2 (familia Beijing) tienen una distribución más amplia; y el linaje 4 conecta distintas regiones de Europa, Oeste de África o Latinoamérica y Mediterráneo. La figura 2 muestra la estructura filogenética global de CMTB basada en 35.577 SNPs de 283 cepas de MTB.

Figura 2. Estructura filogenética del complejo *M. tuberculosis*.



Estructura filogenética global de *M. tuberculosis* representado en un árbol Neighbor-Joining. Las especies del complejo *M. tuberculosis* pueden clasificarse en 7 linajes principales, que a su vez se pueden dividir en sub-linajes geográficamente confinados. Los linajes "modernos" (linajes 2, 3, 4) tienen una distribución global, mientras los linajes "ancestrales" están limitados a África occidental y oriental. Se observa la rama filogenética asociada a especies animales. Árbol basado en 1000 réplicas bootstrap a partir de 35.577 sitios variables. Tomado de (Niemann, Merker, Kohl, & Supply, 2016)

Importante para esta clasificación fue el reconocimiento de que cepas asociadas a grandes epidemias compartían una delección de la región TbD1, catalogando a las cepas en linajes modernos y linajes ancestrales.

Los linajes modernos son monofiléticos, tienen delección en la región TbD1 y comprenden tres linajes:

Linaje 4 (Euro-Americano) con una distribución en Europa y América, África y Medio Oriente;

Linaje 2 (Este de Asia, incluye familia Beijing) distribuida ampliamente en países de Asia Oriental;

Linaje 3 (Este de África e India) con una distribución en el centro y sur de Asia y el este de África;

Los linajes antiguos, tienen delección en la región TbD9, son parafiléticos y comprenden los siguientes linajes;

Linaje 1 (Indo-Oceánico) distribuido alrededor del Océano Índico y Filipinas;

Linaje 5 (*M. africanum* Oeste del África 1) y Linaje 6 (*M. africanum* Oeste del África 2) restringido a países del occidente africano;

Linaje 7 (Etiopía) recientemente descrito y restringido a Etiopía.

La asociación de cada linaje con poblaciones humanas es importante en las consecuencias epidemiológicas de la tuberculosis. Los linajes 2 y 4 son los responsables de la mayoría de infecciones con tuberculosis y han estado implicados en brotes de MDR-TB, además de causar progresión a enfermedad activa y ser más virulentos de acuerdo con modelos animales (Brites & Gagneux, 2015).

4.3 Situación de la tuberculosis a nivel mundial

En el año 1991 la Asamblea Mundial de la Salud declaró la TB como un problema global de salud pública y se establecieron 2 objetivos para el control de la tuberculosis: detección del 70% de nuevos casos por baciloscopia y curación de la menos el 85% de estos pacientes, para el año 2000. Posteriormente, en 1994 se lanzó la estrategia TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) el cual incluye un compromiso gubernamental, detección de casos especialmente por búsqueda pasiva, quimioterapia supervisada con esquema acortado para al menos todos los casos confirmados por baciloscopia, sistema de suministro regular de medicamentos y un sistema de monitoreo del programa para supervisión y evaluación. El programa fue adoptado por 182 países en los cuales mejoraron los programas nacionales de control de la tuberculosis. Posteriormente nació la estrategia “Alto a la Tuberculosis” por la necesidad de alcanzar la metas relacionada con los Objetivos del Milenio (ODM), específicamente con el objetivo 6 “Combatir el VIH/SIDA, paludismo y otras enfermedades” en el decenio 2006-2015. La finalidad de la estrategia “Alto a la Tuberculosis” fue reducir los casos de tuberculosis para el año 2015, de acuerdo a los ODM. Entre los objetivos se nombran: lograr acceso universal a un diagnóstico de calidad y a un tratamiento enfocado en el paciente; reducir el sufrimiento y la carga socio-económica asociada a la tuberculosis; proteger las poblaciones pobres y vulnerables frente a la tuberculosis, a la coinfección Tuberculosis-VIH y MDR-TB; y apoyar el desarrollo de nuevas herramientas y su pronta y eficaz utilización (World Health Organization, 2006).

La nueva estrategia “Fin a la Tuberculosis”, aprobada en el año 2014 por la Asamblea Mundial de la Salud, reemplaza a la estrategia “Alto a la Tuberculosis” y está enfocada en las nuevas metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). La visión de la estrategia es un mundo libre de tuberculosis y sus objetivos son, para el año 2035, la reducción de muertes por tuberculosis en un 95% comparado con cifras de 2015; y reducción de la incidencia en un 90% de acuerdo con cifras de 2015 (World Health Organization, 2014).

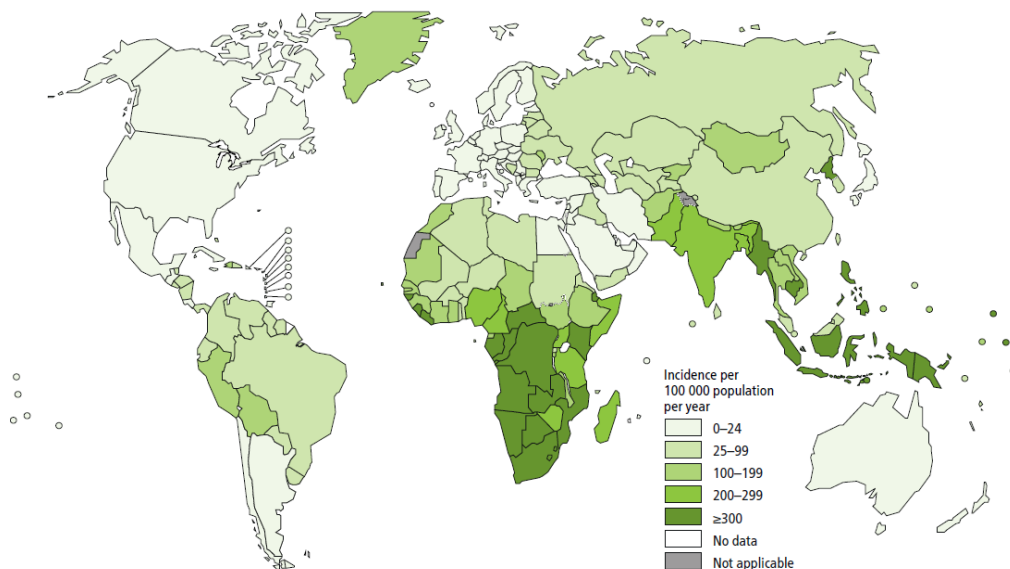
De acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud del año 2016, los esfuerzos para reducir la carga de tuberculosis planteados en la estrategia “Alto a la Tuberculosis” fueron alcanzados de manera general. Se logró alcanzar la meta de detener y revertir la incidencia en las seis regiones mundiales, definidas por la OMS, y en 16 de 22 países catalogados como países de alta carga que, en conjunto, contabilizan el 80% de casos de tuberculosis a nivel mundial. Las tasas de incidencia a nivel mundial han disminuido en un promedio 1,5% anualmente desde 1990 hasta el año 2015. La meta de reducir en un 50% la tasa de mortalidad al año 2015 fue casi alcanzada, pues al año 2015 la tasa de mortalidad se redujo en un 47% comparado con el año 1990. Lo mismo ocurrió con la meta de reducir en un 50% la prevalencia, alcanzándose un 42%. Las regiones de la OMS que alcanzaron la totalidad de metas fueron: Región de las Américas, Región del Sur-este de Asia y la Región del Oeste del Pacífico (World Health Organization, 2016).

Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos empleados, la tuberculosis continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial. Sigue siendo una de las primeras causas de muerte provocada por una enfermedad infecciosa, incluso superando en casos al VIH-SIDA.

En el año 2016, la OMS, estimó que se presentaron en el mundo 10.4 millones de casos nuevos de tuberculosis (incidencia 140 casos/100.000 habitantes), de los cuales el 10% estaba coinfectado con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), siendo el riesgo de desarrollar TB entre los 37 millones de personas viviendo con el VIH 21 veces mayor que en el resto de la población. Además para el mismo año la OMS estimó 490.000 casos nuevos de TB-MDR. La mortalidad estimada fue de 1.3 millones de personas VIH negativo y 374.000 casos en individuos que conviven con VIH. Globalmente la incidencia de tuberculosis ha descendido alrededor del 2% por año, sin embargo para alcanzar los

objetivos de la estrategia “Fin a la tuberculosis” este porcentaje debe aumentar a un 4-5% por año (World Health Organization, 2017). En la figura 3 se observa las tasas de incidencia estimadas para el año 2016.

Figura 3. Tasa de incidencia de tuberculosis estimada, año 2016.



Número de casos incidentes de tuberculosis en relación con el tamaño de la población. Las tasas de incidencia varían desde menos de 10 casos/100.000 habitantes hasta más de 500 casos/100.000 habitantes en ciertos países del este de Asia y sur de África. Tomado de (World Health Organization, 2017).

4.4 Situación de la tuberculosis en Colombia

A nivel local, en el año 2015 se reportaron al SIVIGILA 12.918 casos de tuberculosis, de los cuales 11.647 correspondieron a casos nuevos, para una incidencia de 24,2 casos/100.000 habitantes. Los departamentos con mayor incidencia fueron: Amazonas, Risaralda y Chocó con 72,1; 47,2 y 45,4 casos/100.000 habitantes, respectivamente. La forma pulmonar fue la más común, contabilizando el 89,3% de todos los casos (Instituto Nacional de Salud SIVIGILA, 2015).

La OMS en su informe del año 2017, estimó una incidencia de TB en la región de las Américas de 27 casos/100.000 habitantes, mientras que para Colombia la estimación fue de 32 casos/100.000 habitantes. La tasa de coinfección VIH-TB fue de 4,4 casos/100.000 habitantes (World Health Organization, 2017).

Los estudios de epidemiología molecular realizados en el país se han enfocado principalmente a la población general. Así por ejemplo Puerto y colaboradores, en el año 2015, determinaron los genotipos circulantes mediante spoligotyping en Colombia a partir de 741 aislados clínicos obtenidos entre 1999 y 2012 en 31 departamentos, con una prevalencia del sub-linaje LAM de 39,9% seguido del sub-linaje Haarlem 19%, sub-linaje T 9% y familia Beijing con un 3,23%. Además se determinó que un 17% eran patrones huérfanos y que el SIT42 (LAM9), con un 24,7% del total de los aislados clínicos, fue el genotipo más frecuente. En cuanto al sexo se determinó que el 60,7% de los pacientes fueron del sexo masculino y el rango etario más afectado fue el de 16-30 años con el 34,9% de los casos (Puerto, y otros, 2015). Otro estudio, realizado por Realpe y colaboradores (2014), en 414 aislados clínicos de pacientes con TB pulmonar determinó que los genotipos SIT42 (LAM9) y SIT63 (H1) con 29,9% y 23,4% respectivamente son los genotipos de mayor circulación en el país (Realpe, y otros, 2014). Finalmente, un estudio donde se caracterizó la estructura poblacional de *M. tuberculosis* en Bogotá a partir de 152 aislados clínicos mostró, de la misma manera, que el sub-linaje más frecuente es LAM (49,4%), Haarlem (25%) y sub-linaje mal definido "ill-defined" T (13,82%). Así mismo, el genotipo de mayor circulación fue SIT42 LAM9 (27,63%) (Cerezo, y otros, 2012).

4.5 Pueblos indígenas como población vulnerable a la tuberculosis

El sistema inmune del huésped que participa en la respuesta contra *M. tuberculosis* es parcialmente eficaz pues rara vez lo elimina del cuerpo. La respuesta inmunológica lleva a un estado de infección latente en que la bacteria puede entrar en una fase activa, desencadenando la enfermedad. Se estima que aproximadamente un tercio de la población global está infectada con el bacilo de la tuberculosis en estado de latencia, sin embargo entre el 5-10% de estas personas desarrollarán una forma activa en algún momento de su vida (O'Garra, y otros, 2013). Este porcentaje puede verse aumentado bajo ciertas condiciones, o factores de riesgo, como el debilitamiento del sistema inmunológico, en especial por el VIH; el hacinamiento, el internamiento prolongado tanto en sistemas hospitalarios o educativos, así como en centros penitenciarios; el alcoholismo y drogadicción, edad, desnutrición, no acceso a sistemas de salud y sistemas sanitarios

débiles; además la virulencia del microorganismo (Romero García, Gondres, Paez Candelaria, Bacardí, & Jones Romero, 2016).

De acuerdo a estos factores de riesgo se pueden identificar grupos específicos poblacionales con mayor vulnerabilidad a enfermarse por tuberculosis, entre los que se encuentran: personas privadas de la libertad, individuos en situación de calle, migrantes, personas de avanzada edad, personal de salud, afrodescendientes, escolares, militares, población fronteriza e indígenas. En estos grupos poblacionales pueden confluir más de un factor de riesgo (Herrera, 2015).

Los pueblos indígenas poseen varios de los factores de riesgos mencionados, además de convivir en condiciones extremas, con restricciones para el acceso de comida, agua y refugio, lo que hace que tengan las tasas más altas de morbilidad y mortalidad con respecto a la población general. Esta inequidad se refleja, por ejemplo, en la tasa de mortalidad infantil en Brasil, con 31 casos/100.000 infantes en la población general mientras que esta tasa aumenta a 106 casos/100.000 habitantes en la comunidad indígena Xavante. Otro ejemplo indicativo de esta problemática es Ecuador, en donde la tasa de mortalidad materna en población general al año 2003 fue del 74,3/100.000 habitantes, mientras que en comunidades indígenas remotas la mortalidad materna llegó hasta 250 casos/100.000 habitantes (Montenegro & Stephens, 2006).

En el caso de enfermedades infecciosas, las tasas de incidencia y prevalencia en poblaciones indígenas también se encuentran superando la media nacional. Además, las cargas parasitarias son elevadas en comunidades indígenas y esto se puede correlacionar con su pobre estado nutricional. Los patrones de enfermedad en las poblaciones indígenas dependen mucho del grado de contacto con la población general; inclusive contactos de corto tiempo puede generar un brote de enfermedad que puede ser rastreado. Esta propagación es más claramente observable en algunas partes del Amazonas, donde el único medio de transporte es el fluvial y las comunidades se encuentran a lo largo de estos sistemas acuáticos (Montenegro & Stephens, 2006).

En tuberculosis, todos los determinantes sociales incrementan el riesgo de infección y enfermedad; además los factores necesarios para la transmisión del bacilo, esto es: número de casos con tuberculosis pulmonar, duración de la contagiosidad e interacción de

casos con sus contactos, se encuentran en niveles superiores que la población general. Adicionalmente la implementación de estrategias para combatir la enfermedad, como la estrategia DOTS-TAES, tienen una logística más complicada, pues por motivos geográficos y culturales suponen una barrera para el acceso de la salud (Organización Panamericana de la Salud, 2004). La estrategia DOTS-TAES fue lanzada en el año 1993 con el objetivo de dar una respuesta eficiente mediante acciones estandarizadas y supervisadas en países en desarrollo para disminuir la incidencia y prevalencia de tuberculosis en las comunidades. La implementación de la estrategia ha mostrado una disminución de la incidencia y transmisión de la enfermedad, sin embargo es necesario considerar acciones para mejorar la estrategia TAES en comunidades indígenas (Organización Panamericana de la Salud, 2004).

Se ha observado que la tuberculosis afecta en mayor medida a los pueblos indígenas comparada con la población general de cada país. En Perú, en el marco del “Encuentro Regional Para el Análisis del Acceso a Tratamiento Anti-Tuberculosis en Poblaciones Indígenas”, se reportó una incidencia de 114,4 casos/100.000 habitantes en población indígena. En Paraguay la incidencia en población indígena supera hasta 10 veces la incidencia de la población general, con 392,2 casos/100.000 habitantes. Brasil reportó, en el mismo encuentro, una incidencia en pueblos indígenas de 189,2 casos/100.000 habitantes, aunque en pueblos indígenas de la Amazonía Brasileña se puede encontrar una incidencia de hasta 518 casos/100.000 habitantes (Organización Panamericana de la Salud, 2004). Sin embargo, diferentes estudios en poblaciones indígenas específicas muestran números más altos. Por ejemplo, Culqui y colaboradores, publicaron un estudio de incidencia de tuberculosis en pueblos Aimaras del Perú, encontrando en el año 2005 una incidencia promedio de tuberculosis pulmonar baciloscopia positivo de 33,35 casos/100.000 habitantes, sin embargo esta cifra aumenta a 399,39 casos/100.000 habitantes en el Distrito de Tilali, Departamento de Puno en el sudeste peruano (Culqui, y otros, 2009). Brasil reportó una incidencia en el pueblo Suruí, en el periodo comprendido entre 1991-2001, de casi 2500 casos/100.000 habitantes con aproximadamente la mitad de los casos reportados en menores de 15 años (Coimbra Jr & Basta, 2007). Finalmente en Colombia Hernández y colaboradores determinaron la incidencia de tuberculosis, entre junio de 2009 y julio de 2010 en 10 comunidades indígenas del departamento de Antioquia, reportando una incidencia de 291 casos/100.000 habitantes. Sin embargo participaron en el estudio el 35% del total de la población puesto que, de acuerdo a las autoridades

indígenas, la mayoría de habitantes se encontraban fuera de sus comunidades en trabajos de campo (Hernández Sarmiento, y otros, 2013).

4.6 Métodos genotípicos para estudios epidemiológicos

Definir la fuente de infección y dilucidar su ruta de transmisión es importante para los estudios epidemiológicos de cualquier enfermedad causada por microorganismos, y en el caso de tuberculosis es un factor clave para lograr la meta de la estrategia de la OMS “Fin a la tuberculosis”. El genoma de *M. tuberculosis* tiene una alta homogeneidad por lo que ha sido necesario encontrar marcadores moleculares que permitan obtener información concerniente a patrones de diseminación, infectividad y patogenicidad (Arnold, 2007). Los métodos iniciales para la tipificación de micobacterias fueron los métodos fenotípicos (morfología de la colonia, patrón de susceptibilidad a diferentes fármacos, tipificación por micobacteriófagos) pero tenían el inconveniente de que tales métodos no eran lo suficientemente robustos, pues podían variar dichas características en el transcurso del tratamiento. De la misma manera lo fueron los métodos bioquímicos y serológicos. La era genómica revolucionó la capacidad de discriminar cepas de acuerdo a los análisis de la variabilidad genética.

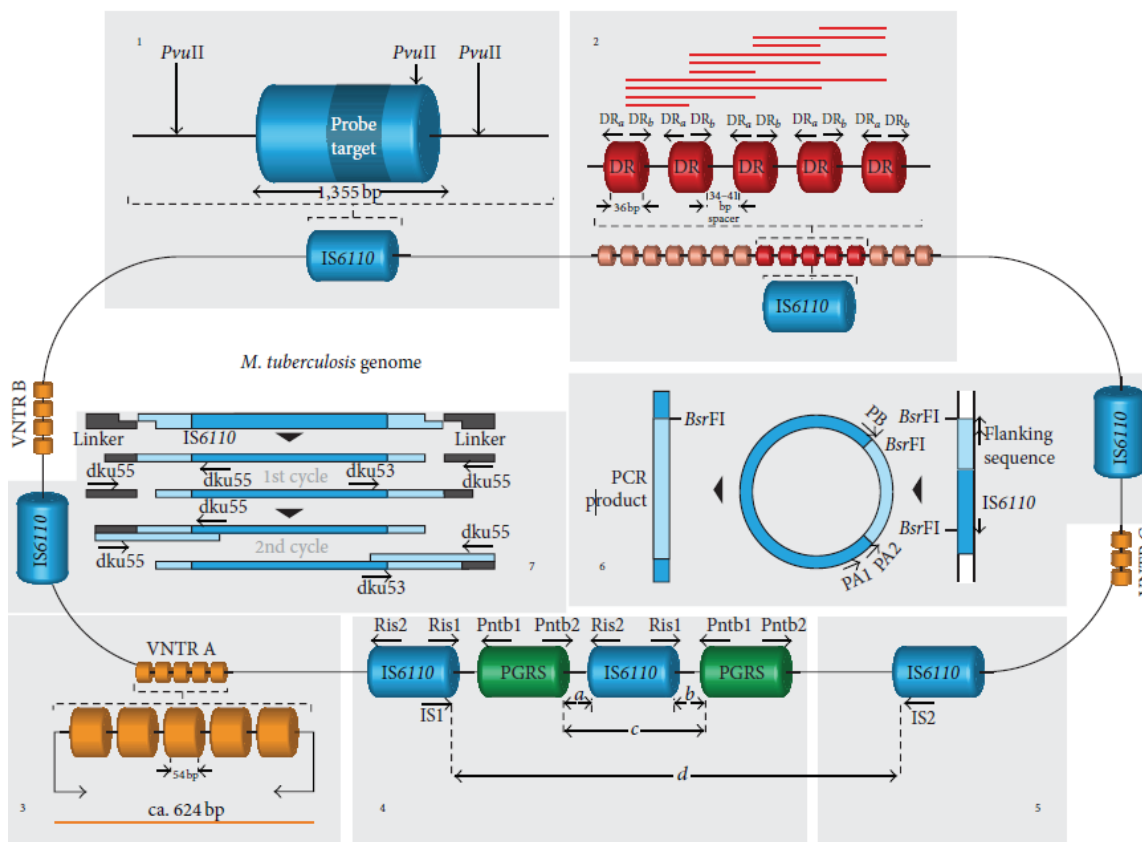
Los métodos moleculares permiten agrupar los aislados clínicos con idéntico patrón genotípico en grupos o “clusters”, para posteriormente calcular una filogenia o un índice de agrupamiento basado en los tamaños de los clusters formados y de esta manera, por ejemplo, identificar factores de riesgo relacionados con la transmisión reciente de la enfermedad (Tanaka & Francis, 2004). Mientras que patrones únicos (diferentes entre si) indican más la reactivación endógena de un foco primario.

La prueba de oro para la genotipificación de aislados clínicos de *M. tuberculosis* fue el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos largos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110). La secuencia de inserción IS6110 es una secuencia de ADN de 1.355 pb. la cual posee 2 secuencias codificadoras (*orfA* y *orfB*) para transposasas, que le da la propiedad de transposición a lo largo del genoma micobacteriano. La secuencia de inserción IS6110 se encuentra en un número variable de copias así como en diferente posición en el genoma de los miembros del Complejo *M.*

tuberculosis. Posterior a una digestión cromosómica con la enzima de restricción *PvuII*, de una electroforesis en gel de agarosa, southern blot, hibridación de los fragmentos obtenidos con una sonda de IS6110 marcada en una membrana y revelado por autorradiografía, se obtiene un patrón molecular característico del aislado clínico. Este método es altamente discriminativo, sin embargo posee limitaciones como la necesidad de altas cantidades de ADN por lo que es necesario varias semanas para la obtención de un cultivo, es una técnica de laboratorio laboriosa y tiene un bajo poder discriminativo para cepas con menos de 5 copias IS6110 (van Soolingen, 2001).

La secuenciación del genoma micobacteriano ha permitido encontrar varias regiones genómicas con elementos repetitivos de ADN (Figura 4), entre las que se encuentran repeticiones en tándem de número variable (VNTR, variable number of tandem repeat) que son regiones análogas a loci minisatélites en células eucariotas y son la base para la tipificación de la prueba MIRU-VNTR 24 loci, que actualmente es el método estándar o prueba de referencia para la tipia del complejo *M. tuberculosis*. Otra región del genoma es la DR, conformada por repeticiones directas separadas por secuencias espaciadoras que son determinadas mediante la prueba Spoligotyping.

Figura 4. Representación esquemática del genoma de *M. tuberculosis* y sus marcadores moleculares



Representación de los marcadores moleculares utilizados para la genotipificación de cepas de *M. tuberculosis*. La explicación de los métodos RFLP-IS6110, spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 loci se encuentra en el texto. Tomado de (Jagielski, y otros, 2014)

4.6.1 Spoligotyping

Es un método basado en la amplificación por PCR de la región DR (Direct Repeat) del cromosoma de la bacteria, que corresponde a una familia de ADN repetitivo conocida como CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Se ha postulado que las regiones CRISPR, en asociación con proteínas asociadas, son sistemas inmunes adaptativos en arqueas y bacterias (Makarova, y otros, 2011).

El locus DR se encuentra formado por repeticiones directas conservadas de 36 pb separadas por secuencias espaciadoras de entre 34 a 41 pb. El locus fue descrito en el año 1991 por Hermans y colaboradores. En dicho estudio se analizó la secuencia de inserción IS987 en *M. bovis* BCG y sus regiones flanqueantes. Se encontró que IS987 se

halla en una región que contiene regiones repetitivas de 36 pb (la ahora reconocida región DR) y separadas por secuencias que varían en su longitud desde 35 a 41 pb. Además se determinó que esta región DR solo se encuentra en micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y es una región hot spot para la integración de dicha secuencia de inserción (Hermans, y otros, 1991). Basado en estas observaciones Kamerbeek y colaboradores en 1997 diseñaron el método conocido como Spoligotyping (spacer oligotyping) que utiliza las regiones repetitivas directas DR como blanco para la amplificación por PCR mediante primers inversamente orientados complementarios a los DRs, además uno de los primers está biotinilado por lo tanto los amplicones obtenidos poseen biotina, importante para la posterior detección. Los productos de PCR obtenidos, de diferentes tamaños, son hibridados con una membrana que tiene 43 oligonucleótidos sintéticos unidos covalentemente y representan las 43 secuencias espaciadoras identificadas tanto en *M. tuberculosis* H37Rv (espaciadores 1–19, 22–32 y 37–43) como en *M. bovis* BCG (20-21 y 33–36). La presencia de los espaciadores se revela mediante quimioluminiscencia por el sistema estreptavidina-peroxidasa y visualización mediante autorradiografía (Kamerbeek, y otros, 1997).

Figura 5. Visualización de espaciadores presentes en varias cepas del complejo *M. tuberculosis*.



Patrones de hibridación, o espoligotipos, de ADNs micobacterianos amplificados por PCR de 35 cepas de *M. tuberculosis* y 5 cepas de *M. bovis*. Tomado de (Kamerbeek, y otros, 1997)

La delección de un espaciador se debe probablemente a mecanismos de recombinación genética como recombinación homóloga o por eventos de transposición de una secuencia de inserción, pues el locus DR es una región hot spot para la integración de IS6110 (Groenen, Bunschot, van Soolingen, & van Embden, 1993). Entre las ventajas de la metodología Spoligotyping se puede nombrar su simplicidad, costo efectividad, resultados obtenidos hasta en 2 días, la baja cantidad de ADN necesario para su análisis permitiendo ser aplicado directamente sobre muestras clínicas; y la alta estabilidad del locus DR (Jagielski, y otros, 2014). En un estudio para determinar su “reloj molecular”, esto es el tiempo promedio necesario para cambiar su secuencia de ADN, realizado por Niemann y colaboradores en 1999, con 165 aislados clínicos obtenidos de 56 pacientes en un intervalo de 1-772 días, se concluyó que la región DR permanece estable durante 772 días, tiempo que se realizó el estudio, mientras que el patrón obtenido por RFLP-IS6110 cambió en el 5% de los aislados clínicos, con un tiempo promedio de entre 200 a 700 días (Niemann, Richter, & Rüsche-Gerdes, 1999).

Los resultados del spoligotyping se muestran como un patrón binario (1=presencia, 0=ausencia) de 43 dígitos, el cual puede ser interpretado, analizado y comparado mediante el uso de base de datos globales. La cuarta base de datos internacional de spoligotyping, SpolDB4, describe 39.295 cepas obtenidas de 122 países y se determinaron 1.939 STs (Shared-types, tipos compartidos). Estas cepas están clasificadas en 62 clados/linajes basados en un análisis bioinformático y por un panel de expertos. La importancia de esta base de datos radica en la información de la diversidad actual genómica del complejo *M. tuberculosis* (Brudey, y otros, 2006). La base de datos está disponible en línea en http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/

Entre sus desventajas están: bajo poder de discriminación menor al de los métodos RFLP-IS6110 y MIRU-VNTR 24 loci, por lo que su uso como único método de genotipificación para estudios epidemiológicos es restringido.

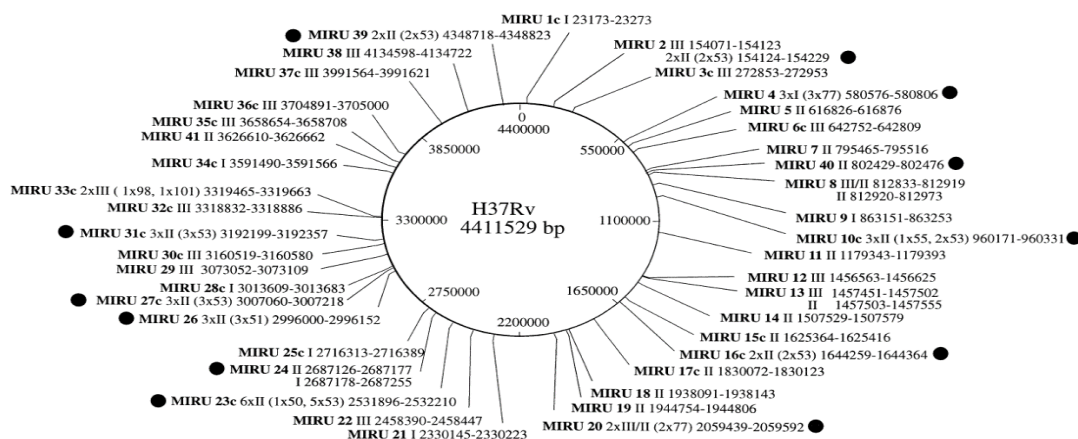
4.6.2 MIRU-VNTR

La secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* ha revelado la presencia de loci con repeticiones en tándem, las cuales se asemejan a regiones minisatélite en células eucariotas. Estos loci fueron llamados repeticiones en tándem de número variable (VNTR,

Variable Number of Tandem Repeat). En 1998 Frothingham y Meeker-O'Connell describieron 11 loci con repeticiones en tándem a partir de la cepa de referencia H37Rv, 5 loci MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeat) y 6 loci ETR (Exact Tandem Repeat). El loci MPTR tienen secuencias en tándem de 15 pb mientras que los loci ETR poseen secuencias en tándem que van de 53 a 79 pb. Los análisis por PCR en 48 cepas del complejo *M. tuberculosis* para comprobar el polimorfismo de estos 11 loci mostraron que un locus MPTR (MPTR-A) y los 6 loci ETR (A-F) son altamente polimórficos (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998). Además Supply y colaboradores describieron una nueva clase de VNTR, localizada en un operón que codifica para un sistema de dos componentes, al que se nombró Unidades Repetitivas Interespaciadas Micobacteriales (MIRU, Mycobacterial Interspersed Repetitive Units). Esta nueva clase de ADN repetitivo, de entre 46-101 pb., se encontró en el cromosoma de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. leprae*; además mediante búsqueda de homología de secuencias se determinó que la cantidad de MIRUs en el genoma micobacteriano se encontraba entre 40 a 50 regiones (Supply, Magdalena, Himpens, & Lochter, 1997).

El análisis inicial de polimorfismo de 41 loci MIRUs presentes en *M. tuberculosis* H37Rv sobre 31 cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* indicó que 12 loci mostraban variación en el número de copias tándem en cepas no relacionadas (Supply, y otros, 2000). En la siguiente figura se puede observar la localización en el cromosoma de los 41 loci MIRUs en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

Figura 6. Posición de loci MIRU en *M. tuberculosis* H37Rv



Los números en negrita y arábigo especifican el respectivo locus MIRU. La posición en el genoma de cada loci se indica en los números posteriores al número de MIRU. La 'c' indica que el MIRU correspondiente se encuentra en orientación inversa a la definida por la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* generada por Cole y colaboradores (Cole, y otros, 1998), los números romanos indican el tipo de MIRU (I, II o III). Tomado de (Supply, y otros, 2000).

La tipificación por MIRU-VNTR se basa en la amplificación por PCR mediante primers específicos de las regiones flanqueantes de cada loci a analizar, y la posterior determinación del tamaño del amplicón. Puesto que el tamaño de las repeticiones en tándem son conocidas, se puede calcular el número de copias presentes en cada loci analizado. Inicialmente se estableció el análisis de 12 regiones, previamente descritas, que tenían un poder discriminatorio similar al considerado estándar de oro: RFLP-IS6110, con las ventajas de su reproducibilidad y comparación fácil inter-laboratorios, y demostraban como un método potencial para el estudio de eventos epidemiológicos claves como transmisiones o recaídas (Mazars, y otros, 2001). Sin embargo la tipificación por RFLP-IS6110 era necesaria como método adicional cuando la investigación epidemiológica o demográfica no proporcionaba información adecuada sobre vínculo de los pacientes en los clusters formados. Un set de 24 loci fue propuesto como método optimizado para la tipificación de cepas con un poder de discriminación igual al método RFLP-IS6110, además se comprobó que el uso combinado de spoligotyping mejoraba el poder discriminatorio (Supply, y otros, 2006). Los loci utilizados, así como la secuencia de cada par de primers, en la tipificación por MIRU-VNTR 24 loci se indica en la siguiente tabla.

Tabla 1. Secuencia de los 24 loci MIRUs

Locus	Alias	Longitud repetición (pb)	Secuencia de primers (5' a 3')
580	MIRU 4; ETR D	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG
802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA

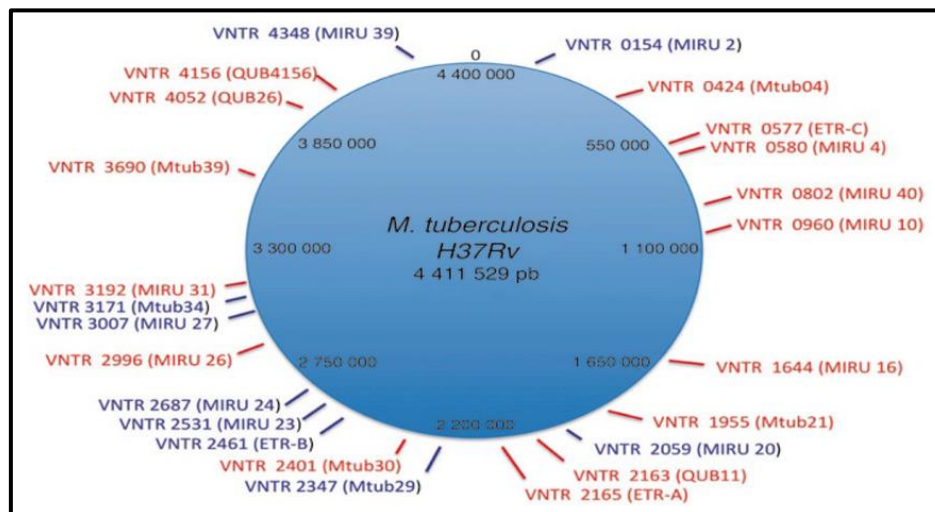
			CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
3192	MIRU 31; ETR E	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
424	Mtub04	51	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
577	ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
2401	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTGAACCCCCACGCCATTAGTA
3690	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
4156	QUB-4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT
2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT
1955	Mtub21	57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA
4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCCGAT CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
154	MIRU 2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
2531	MIRU 23	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG

			AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC
4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTIONGTA
2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
3007	MIRU 27; QUB-5	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
2347	Mtub29	57	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
2461	ETR B	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
3171	Mtub34	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

Adaptado de (Supply, y otros, 2006)

El método MIRU-VNTR de 24 loci proporciona un código de 24 números, correspondientes al número de copias en tándem de cada loci, el cual puede ser comparado interlaboratorios y facilita los estudios epidemiológicos y de estructura poblacional genética como en la base de datos MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/>) que permite un análisis de los datos de MIRU-VNTR complementado con otros métodos genotípicos (Spoligotyping, polimorfismos de secuencia larga LSP y polimorfismos de un solo nucleótido SNP). Adicionalmente la base de datos SITVITWEB permite tener una visión global de la diversidad genética del complejo *M. tuberculosis*, junto con información de Spoligotyping, basados en 62.582 cepas aisladas en todo el mundo. Esta base de datos se encuentra disponible en línea en la dirección http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/ (Jagielski, y otros, 2014).

Figura 7. Posición de los 24 MIRUs utilizados actualmente para genotipificación molecular.



Tomado de (Morand, y otros, 2010)

4.6.3 Secuenciación total del genoma

Los avances en la tecnología de secuenciación de ADN han permitido obtener gran cantidad de secuencias completas de genomas de muchas cepas de *M. tuberculosis* alrededor del mundo, ayudándonos a entender la diversidad filogenética del complejo *M. tuberculosis*. Además la comparación de secuencias completas de genomas nos provee un marco filogenético suficientemente robusto para la clasificación de las cepas con la sensibilidad necesaria para entender particularidades genéticas de las diferentes cepas en detalle y utilizando herramientas genómicas comparativas, predecir el potencial impacto fenotípico de polimorfismos genéticos específicos (Coscolla & Gagneux, 2014). Las deleciones genómicas conocidas como Regiones de Diferencia (RD) o polimorfismos de secuencia larga (LSP, por sus siglas en inglés) se utilizaron como marcadores ideales para la clasificación de los principales linajes y sub-linajes filogenéticos de *M. tuberculosis* puesto que los LSPs son esencialmente irreversibles. Los polimorfismos de un nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) se han utilizado para establecer varias metodologías de tipificación (Coscolla & Gagneux, 2014)

Una de las estrategias para la tipificación a nivel de nucleótidos es la llamada tipificación de secuencia multilocus (MLST Multilocus Sequence Typing). El método se basa en polimorfismo de la secuencia nucleotídica de loci específicos permitiendo identificar cepas clonales (Vázquez & Berrón, 2004). Por lo general se analizan hasta 10 genes

housekeeping que codifican para enzimas vitales y proteínas estructurales. Sin embargo esta técnica ha demostrado poseer baja utilidad para tipificar cepas del complejo *M. tuberculosis* por el bajo grado de polimorfismos en el complejo aunque se ha visto útil para la diferenciación de micobacterias no tuberculosas (Jagielski, y otros, 2014). Por otro lado, nuevos métodos basados en SNPs han sido desarrollados por varios grupos de investigación para la clasificación filogenética de las cepas a analizar. Los SNPs como marcadores moleculares tienen una ventaja sobre los marcadores moleculares clásicos (elementos genéticos móviles, ADN repetitivo) y es que virtualmente no presentan homoplasia, haciendo de ellos marcadores ideales para la genotipificación de *M. tuberculosis* (Stucki, y otros, 2012). Si bien no se ha alcanzado un consenso de cuales SNPs deben ser utilizados como marcadores moleculares se han identificado millones de SNPs para su aplicación. En el año 2010 Comas y colaboradores secuenciaron 21 cepas del complejo *M. tuberculosis* (20 cepas representativas de los principales linajes y 1 cepa de *M. canettii*) y se determinaron 9037 SNPs específicos de linaje (Comas, y otros, 2010). Este fue el punto de partida para el desarrollo de una estrategia de tipificación basada en SNPs denominada MOL-PCR (Multiplexed Oligonucleotide Ligation-PCR), que permite la detección de SNPs específicos para asignar cepas a los seis principales linajes asociados a humanos, SNPs específicos del clado que comprende *M. bovis* y *M. caprae* y para la familia Beijing (Stucki, y otros, 2012). Los tres pasos principales de esta metodología son:

1. Unión de dos oligonucleótidos multiplex (MOLigo1 y MOLigo2) a blancos específicos y ligación de ambas sondas. MOLigo1 formado por una secuencia complementaria a un primer forward, una secuencia tag complementaria a una secuencia anti-tag que se encuentra unida covalentemente a micro-esferas y una secuencia complementaria al SNP evidenciado como marcador molecular; MOLigo2 comprende una secuencia complementaria al blanco y una secuencia de un primer reverse. La correcta hibridación de ambas sondas permite su ligación mediante ligasas termoestables y solo se da si las sondas alinearon una cerca de la otra, confiriendo así la especificidad del ensayo.
2. Amplificación mediante PCR de las sondas exitosamente ligadas y marcaje con un compuesto fluorescente para la posterior detección de los productos amplificados.
3. Hibridación, por la unión de la secuencia tag de los productos de PCR a secuencias anti-tag unidas covalentemente en micro-esferas, e identificación, por un citómetro de flujo tipo Luminex, de la intensidad de fluorescencia emitida por el complejo microesfera-producto de PCR (Deshpande, y otros, 2009). Este estudio identificó SNPs filogenéticamente informativos a partir de 22 secuencias totales de genoma del Complejo *M. tuberculosis* y

se seleccionaron 8 SNPs de acuerdo a criterios específicos para el diseño de las sondas. Un panel con 36 cepas previamente caracterizadas fue utilizada para probar el método y asignando correctamente la totalidad de cepas en los principales linajes filogenéticos (Stucki, y otros, 2012).

4.7 Mecanismos de resistencia

La aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos constituye un grave problema de salud pública. Poco después de la introducción de los fármacos antituberculosos estreptomina, isoniazida, ácido para-amino-salicílico se detectaron cepas resistentes a dichos fármacos, indicando la necesidad de medir la resistencia en los aislados clínicos de una manera exacta y rápida. El Instituto Pasteur introdujo el método de proporciones críticas como método de susceptibilidad. Posteriormente la introducción de la rifampicina, en la década de 1960, ayudo en el descenso de la resistencia en *M. tuberculosis*, provocando un descenso en el financiamiento e interés en programas de control de tuberculosis. En la década de los 80's con la aparición del VIH-SIDA, y la aparición de cepas resistentes a los fármacos rifampicina e isoniazida, denominados cepas Multi-Drogo-Resistentes o MDR, se reanudó la vigilancia epidemiológica de la resistencia a fármacos (Johnson, y otros, 2006).

Los principales fármacos antituberculosos de primera línea incluyen: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. La aparición de resistencia es el resultado de mutaciones espontáneas en el cromosoma bacteriano, con una frecuencia de 10^6 a 10^8 replicaciones bacterianas, de los genes blanco en donde actúan los fármacos y se deben la mayoría de ocasiones, a una selección de cepas resistentes durante el tratamiento por ingestión inadecuada de los medicamentos, mala calidad de los mismos o por baja adherencia al tratamiento (Zhang & Yew, 2009).

La rifampicina actúa en el paso de transcripción del ciclo celular, por medio de la unión a la sub-unidad β de la ARN polimerasa, interfiriendo en la transcripción y causando la muerte del microorganismo. La ARN polimerasa esta codificada por 4 genes: *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, que sintetizan las 4 subunidades (α , β , β' , δ) de la ARN polimerasa. El blanco de la rifampicina es el gen *rpoB* (Johnson, y otros, 2006), la resistencia a rifampicina se debe en un 96% de casos a mutaciones en una región core de 81 pares de bases (pb) del

gen que codifica la ARN polimerasa, *rpoB*. Las posiciones donde ocurren la mayoría de mutaciones se encuentran en 531, 526 y 516; adicionalmente las mutaciones en las posiciones 511, 516, 518 y 522 indican resistencia de bajo nivel a rifampicina y rifapentina aunque retienen susceptibilidad a rifabutina y rifalazil (Zhang & Yew, 2009).

Por otro lado, la resistencia a isoniazida puede estar causada por mutaciones en varios genes: *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, y *ndh*. La isoniazida es un pro-fármaco, es decir se activa tras ser metabolizado por una enzima, en este caso la enzima es la catalasa-peroxidasa (KatG) que convierte la isoniazida en la forma activa ácido isonicotínico, además de otras especies reactivas que actúan sobre *M. tuberculosis* como: superóxidos, peróxidos, óxido nítrico y radicales hidroxil. El ácido isonicotínico interfiere en la producción de la enzima InhA (enoyl-acyl carrier protein reductase), importante en la síntesis de ácidos micólicos presentes en la pared celular. Mutaciones en el gen *katG*, entre los codones 138 a 328, y principalmente en el codón 315, son las causas mayoritarias de resistencia de alto nivel (Johnson, y otros, 2006). Mutaciones en la región promotora del gen *inhA* causan sobreexpresión de la enzima InhA causando resistencia de bajo nivel. Es importante señalar que mutaciones en *inhA* causan resistencia cruzada con etionamida, un fármaco de segunda línea estructuralmente relacionado. Otras mutaciones en diferentes genes podrían indicar un bajo porcentaje de resistencia a isoniazida, como mutaciones en el gen *ahpC* que podría incrementar la producción de hidroperóxido-reductasa protegiendo al bacilo tuberculoso del peróxido, aunque no confiere resistencia a isoniazida ejerce un papel detoxificador (Johnson, y otros, 2006).

La pirazinamida es, al igual que la isoniazida, es un pro-fármaco que actúa en entornos con pH ácido. Interfiere con la síntesis de ácidos grasos y es activado por la enzima pirazinamidasa o PZasa, codificada por el gen *pncA*. La forma activa, que es el ácido pirazinoico, ingresa por difusión pasiva al citoplasma, donde se acumula disminuyendo el nivel de pH hasta inactivar la síntesis de los ácidos grasos indispensables para la bacteria. El único gen que determina la resistencia a pirazinamida es el *pncA*, en el 72-97% de los casos de resistencia. Las cepas sin mutaciones en *pncA* que muestran resistencia a pirazinamida probablemente tienen mutaciones en un gen regulatorio de *pncA* no definido. *M. bovis* presenta resistencia intrínseca por un SNP en la posición nucleotídica 169 del gen equivalente en *M. tuberculosis*.

El etambutol es un antibiótico bacteriostático que actúa interfiriendo la síntesis de arabinogalactano en la pared celular al inhibir la polimerización del arabinano, e inducir la acumulación de un compuesto intermedio de la biosíntesis del arabinogalactano, el D-arabinofuranosil-P-decaprenol. Uno de los genes que participan en la resistencia a etambutol es *embB*, que codifica para la enzima arabinosil-transferasa. El gen *embB* se encuentra dentro de un operón junto a *embA* y *embC*, con el orden *embCAB*. Aproximadamente el 68% de resistencia a etambutol se produce por una mutación en el codón 306 de *embB* (Zhang & Yew, 2009). La detección fenotípica de resistencia, la cual es difícil, falla en hasta un 91,4% lo que tiene un impacto negativo en los programas de control de la tuberculosis, mostrando la necesidad de una detección genotípica de la resistencia. Sin embargo un 30% de cepas resistentes no presentan mutaciones en el gen *embB* por lo que es necesario mayor investigación en los mecanismos de resistencia a este fármaco (Johnson, y otros, 2006).

4.8 Pruebas de susceptibilidad

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, circulantes en la población general ha hecho necesario la realización de pruebas de susceptibilidad a los fármacos de primera línea. De acuerdo a la normativa dada por el Instituto Nacional de Salud de Colombia, las pruebas de susceptibilidad deben realizarse en los siguientes casos: pacientes que presenten recaída o fracaso de tratamiento, por abandono de tratamiento mayor a un mes, co-infección TB-VIH, contacto de paciente (caso índice) con TB resistente, tuberculosis infantil y en población de alto riesgo y vulnerable (personas privadas de la libertad, habitante de calle, trabajadores de salud, personas inmunocomprometidas, fuerzas armadas, educadores y población indígena) (Instituto Nacional de Salud, 2014).

Existen diferentes metodologías para conocer la susceptibilidad a los fármacos antituberculosos de acuerdo a su comportamiento fenotípico o características moleculares, ambas metodologías con sus ventajas y desventajas propias. Entre los métodos fenotípicos se nombran el método de proporciones múltiples, y el sistema automatizado BACTEC MGIT™, mientras que entre los métodos genotípicos se nombran GenoType®MTBDRplus y GeneXpert MTB/RIF®, basados en hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa y PCR en tiempo real de genes específicos causales de resistencia, respectivamente.

4.8.1 Método de proporciones múltiples

El método fue descrito inicialmente por Canetti y colaboradores en el año 1963 y se basa en el hecho que cada cepa salvaje de *M. tuberculosis* contiene algunos mutantes resistentes a los fármacos antituberculosos, y la diferencia entre una cepa resistente y una sensible es que la proporción de bacterias resistentes entre el total de bacterias que conforman el cultivo es mucho más alta en una cepa resistente que en una sensible. Esta información se obtiene al realizar siembras diluidas en medios que no contienen el fármaco y medios que contienen el fármaco. Si las diluciones son elegidas correctamente las colonias obtenidas podrán ser contabilizadas y deducir la proporción de bacterias resistentes en el total de bacterias viables (Canetti, y otros, 1963).

4.8.2 Método automatizado BACTEC MGIT™

El sistema BACTEC MGIT™ (Mycobacterial Growth Indicator Tube) fue introducido para reemplazar el método semi-automatizado radiométrico BACTEC 460TB System que utilizaba sustancias radioactivas (Garrigó, y otros, 2007). Inicialmente el método radiométrico utilizaba medio 7H12 que contenía ácido palmítico unido a carbono radioactivo, ^{14}C , con el antibiótico a estudiar. La liberación del carbono radioactivo es medida por el sistema y permite establecer una curva de crecimiento o inhibición (Roberts, y otros, 1983). La manipulación y peligrosidad de sustancias radioactivas incentivó a búsquedas de nuevas alternativas para la detección de micobacterias. En 1995 se introdujo el medio MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) que consiste en un medio Middelbrook 7H9 modificado en un tubo con silicona que posee un sensor fluorescente de oxígeno, el pentahidrato de rutenio cuya fluorescencia natural es extinguida por la presencia de oxígeno. Mediante el sistema automatizado BACTEC MGIT™ (Becton Dickinson) es posible monitorear la fluorescencia a medida que crece la micobacteria (Ardito, Posteraro, Sanguinetti, Zanetti, & Fadda, 2001).

4.8.3 GenoType®MTBDRplus

A pesar que los métodos fenotípicos automatizados para las pruebas de susceptibilidad redujeron los tiempos de resultados entre 7-10 días, los métodos moleculares son más rápidos y pueden ser aplicados directamente de la muestra clínica. Las mutaciones en los genes *rpoB*, *katG*, e *inhA* permiten inferir resistencia a rifampicina e isoniazida,

respectivamente (Hillemann, Rüscher-Gerdes, & Richter, 2007). Mutaciones en la “región core” de 81 pb del gen *rpoB* contabilizan más del 95% de cepas resistentes a rifampicina, mientras que la resistencia a isoniazida puede ser detectada, entre el 50%-95%, por mutaciones en el codón 315 de *katG* y, entre el 20%-35%, por mutaciones en la región reguladora del gen *inhA* (Hillemann, Rüscher-Gerdes, & Richter, 2007). El ensayo se basa en amplificación mediante PCR de los genes a evaluar y una posterior hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa que tiene inmovilizadas sondas complementarias a los genes evaluados y las principales mutaciones. Ya sea la ausencia de hibridación en las “sondas salvajes” (wild type) o hibridación en las sondas de mutación, es indicativo de resistencia al fármaco respectivo. Las mutaciones que el método detecta se indican en la figura 8.

Figura 8. Mutaciones en genes *rpoB*, *katG* e *inhA* y sus correspondientes bandas wild type WT y mutación MUT.

Ausencia de banda wild type	Codón analizado	Desarrollo de banda de mutación	Mutación
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2
<i>inhA</i> WT1	-15 -16	<i>inhA</i> MUT 1 <i>inhA</i> MUT 2	C15T A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT 3A <i>inhA</i> MUT 3B	T8C T8A

* Mutación detectada únicamente *in silico*. Figura adaptada del inserto del Kit GenoType MTBDR*plus* versión 2.0

4.8.4 GeneXpert MTB/RIF®

El ensayo, basado en amplificación de ácidos nucleicos, Xpert MTB/RIF para la plataforma GeneXpert fue lanzado en el año 2009 e integra los tres procesos requeridos para una PCR en tiempo real de una manera automatizada: preparación de la muestra, amplificación y detección. El método fue desarrollado por Cepheid Inc., y la Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores (FIND, por sus siglas en inglés) junto con el apoyo técnico de la Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey y el financiamiento de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos (World Health Organization, 2011).

La metodología se basa en la detección de mutaciones en la “region core” del gen *rpoB*, que codifica el sitio activo de la enzima. Se utiliza 5 diferentes sondas de hibridación fluorescentes, llamadas balizas moleculares (molecular beacons) que al hibridar con su secuencia blanco fluorescerán indicando la presencia de resistencia a rifampicina (El-Hajj, Marras, Tyagi, Kramer, & Alland, 2001). Entre las principales ventajas del método se encuentra la posibilidad de realizarlo en cualquier laboratorio con un personal con entrenamiento mínimo, la realización de la prueba directamente de una muestra de esputo y los resultados están disponibles en 2 horas (Rachow, y otros, 2011).

5 Metodología

5.1 Tipo de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal realizado de marzo a noviembre del año 2016 en las comunidades indígenas del Municipio de Puerto Nariño-Amazonas. El estudio forma parte del macro proyecto “Fortalecimiento Intersectorial e Intercultural de la Estrategia “Alto a la Tuberculosis” en Comunidades Indígenas con Asentamiento en el Trapecio Amazónico (Parte 1- Puerto Nariño)” ejecutado por la Universidad Nacional de Colombia mediante convenio 063 con la Gobernación del Amazonas.

5.2 Población de estudio

La población de estudio estuvo conformada por los habitantes de las comunidades indígenas que se encuentran geo-referenciadas en el Municipio de Puerto Nariño, Departamento de Amazonas. El municipio comprende los pueblos indígenas de las etnias Ticuna, Cocama y Yagua (resguardo TICOYA) que se encuentran distribuidos en 22 comunidades asentadas sobre dos ríos principales: Amazonas y Loretoyacu. Las comunidades asentadas sobre el río Amazonas son: Atacuari, 7 de Agosto, Boyahuazu, Naranjales, Patrullero, 20 de Julio, Puerto Esperanza, Valencia y Palmeras; mientras que las comunidades que tienen asentamiento sobre el río Loretoyacu son: Tipisca, 12 de Octubre, Puerto Rico, San Juan del Soco, Santa Teresita, Santarem, Tarapoto, Nuevo Paraíso, Pozo Redondo, Villa Andrea, San Francisco, resguardo Ticoya y Cabecera Municipal Puerto Nariño; además se incluyó la comunidad San Martín de Amacayacu, que pertenece al resguardo TICOYA, contabilizando en total 23 comunidades indígenas.

En el marco del proyecto de investigación titulado: “*Fortalecimiento Intersectorial E Intercultural De La Estrategia “Alto A La Tuberculosis” En Comunidades Indígenas Con Asentamiento En El Trapecio Amazónico (Parte 1 - Puerto Nariño)*”, la búsqueda activa de sintomáticos respiratorios (SR) se realizó mediante consulta médica en la totalidad de la población previa firma del consentimiento informado. Se consideró SR a todo individuo con tos con o sin expectoración de cualquier duración. A todos los individuos catalogados como SR se les tomó muestra seriada de esputo espontáneo o inducido. A todas las muestras se les realizó baciloscopia y a todas las primeras muestras se les realizó también cultivo

en los medios de cultivo LJ, STG y BACTEC MGIT™. Del total de la población examinada (n= 6.310), la cantidad total de personas identificadas con sintomatología respiratoria fueron 808 individuos (12,8%), entre tanto la población indígena fue de 5.837 y de ellos 753 (12,9%) personas tuvieron sintomatología respiratoria, 473 no indígenas, 55 SR (11,6 %).

5.3 Diagnóstico de TB activa mediante cultivo

Se procesaron en total 1013 cultivos en medio Lowenstein Jensen y BACTEC MGIT™, de los cuales 80 fueron positivos. 6 cultivos positivos identificados mediante la prueba inmunocromatográfica TBID (BD) no fue posible recuperarlos por la contaminación presente en los medios de cultivo.

En total se recuperaron 74/80 aislados clínicos en la población total, de los cuales 4 pertenecen a pacientes no indígenas y 70 pertenecen a pacientes que se reconocen como indígenas y son el objeto del presente estudio.

5.4 Recolección de la información

A partir de la encuesta médica aplicada se obtuvieron los datos clínicos y demográficos de cada paciente, los cuales se consignaron en una base de datos en Excel (Microsoft®) y se encuentran en custodia del laboratorio de Micobacterias de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional.

5.5 Disposiciones éticas

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y por la Asociación de Autoridades Indígenas ATICOYA. Los individuos que aceptaron participar voluntariamente firmaron un consentimiento informado previa explicación del proyecto y aclaración de dudas. La autorización de los menores de edad fue dada por los padres o representantes.

5.6 Extracción de ADN

- Todos los aislamientos recuperados fueron sembrados en medio LJ para su posterior extracción de ADN mediante el kit comercial GenoLyse® (Hain Lifescience, Germany) de acuerdo a instrucciones del fabricante.

. El raspado de cada aislado clínico fue resuspendido en 100 µl de buffer de lisis alcalino y se incubó a 95°C durante 5 minutos en un termo-mezclador marca Eppendorf®

- Se añadió al lisado 100 µl de buffer de neutralización y se agitó brevemente en vórtex. La solución se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos en microcentrífuga refrigerada marca Thermo Scientific ST 16R.

- El sobrenadante fue colectado y almacenado a -20°C hasta su utilización en los diferentes ensayos.

5.7 Spoligotyping

La genotipificación por spoligotyping se realizó de acuerdo a la descripción hecha por Kamerbeek en 1997. Se utilizó una membrana comercial (Mapmygenome India Limited) que tiene inmovilizadas las 43 secuencias espaciadores.

Los productos de amplificación se hibridaron en la membrana comercial que contiene las secuencias de oligonucleótidos unidos covalentemente. Se utilizó un sistema miniblatter para la hibridación. El protocolo utilizado se encuentra descrito en el anexo 1.

La lectura se realizó manualmente de acuerdo a la ausencia o presencia de cada uno de los espaciadores, se informó como 0 (ausencia de hibridación) o 1 (presencia de hibridación) y se consignó en una base de datos de Excel (Microsoft®) para su posterior análisis.

5.8 MIRU-VNTR de 24 loci

La amplificación de los 24 loci MIRU-VNTR se basa en la metodología propuesta por Supply y colaboradores en el año 2001. Los primers utilizados corresponden a las regiones

flanqueantes de los 24 loci y se realizó PCR de forma individual para cada uno de los loci a caracterizar utilizando primers específicos para cada loci.

El protocolo utilizado se encuentra detallado en el anexo 2. En el anexo 3 se encuentra la tabla de correspondencia entre peso molecular y número de copias en cada loci para determinar el número de copias en tándem presente en cada aislado clínico.

El número de copias en tándem de cada loci fue registrado en una base de datos en Excel (Microsoft®) para su posterior análisis.

5.9 Análisis de datos de genotipificación

Los resultados de genotipificación fueron ingresados a bases de datos globales (SITVIT, Instituto Pasteur de Guadeloupe: http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/; y MIRU-VNTRplus: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>). El portal MIRU-VNTRplus se utilizó para la construcción de dendrogramas mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) de acuerdo a los resultados de spoligotyping y MIRU-VNTR y de esta manera obtener el número de clusters formados. La base del Instituto Pasteur de Guadeloupe se utilizó para la asignación de genotipos y comparación de estos con los reportados en otras regiones a nivel global.

5.10 Susceptibilidad por el método de proporciones múltiples

El método, descrito por primera vez en 1963 por Canetti y colaboradores, determina la proporción de micobacterias susceptibles al fármaco evaluado de acuerdo a la relación del número de colonias crecidas en medio LJ con antibiótico versus el número de colonias crecidas en medio LJ sin antibiótico (control de viabilidad de la bacteria). Por debajo del 1% de crecimiento, con relación al medio sin antibiótico la cepa es clasificada como susceptible mientras que por encima de este valor la resistencia es clínicamente significativa. Es el método de referencia para la evaluación de susceptibilidad.

Se utilizó como concentraciones de antibióticos isoniazida 0,2 µg/ml y rifampicina 40 µg/ml y medio Löwenstein-Jensen, además se trabajó con cultivos puros y con un tiempo de crecimiento de 4 semanas de incubación.

El procedimiento completo se encuentra indicado en el anexo 4.

5.11 Susceptibilidad por BACTEC™ MGIT™ SIRE

La prueba se basa en la detección del consumo de oxígeno del medio MGIT™ (Mycobacterial Growth Indicator Tube) por parte de la micobacteria, comparando su crecimiento entre medios con y sin antibióticos. El equipo analiza los resultados de crecimiento e informa como susceptible, resistente o error, en cuyo caso es necesario repetir la prueba. El procedimiento completo se encuentra descrito en el anexo 5.

La evaluación de susceptibilidad se realizó únicamente para los antibióticos rifampicina e isoniazida.

5.12 Susceptibilidad por GenoType®MTBDR plus 2.0

Esta prueba se realizó mediante el kit comercial GenoType®MTBDR plus 2.0, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Hain), identifica complejo *M. tuberculosis* así como resistencia a rifampicina e isoniazida, mediante la detección de las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia en los genes *rpoB* y *katG* e *inhA*, respectivamente, mediante una hibridación reversa a sondas específicas inmovilizadas en las membranas de las tiras.

La extracción del ADN se realizó con el kit GenoLyse® de acuerdo a instrucciones del fabricante. El procedimiento se encuentra detallado en el anexo 6.

5.13 Susceptibilidad por GeneXpert MTB/RIF®

Es una prueba de diagnóstico rápido recomendado por la OMS, que se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Cepheid) y se basa en una PCR en tiempo real que confirma micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y susceptibilidad a rifampicina,

asociada a mutaciones dentro de la región que determina resistencia a rifampicina (RRDR) en el gen *rpoB*.

El sistema es automatizado y todos los reactivos necesarios para la amplificación por PCR se encuentran en el cartucho de la prueba.

- A partir de un cultivo LJ se toma un raspado de las colonias y se coloca en un tubo falcon con 1 ml de solución salina. Se añade 2 ml de reactivo de digestión de muestra en relación 1:2.
- Se homogeniza en vórtex y se inoculara en el cartucho la totalidad de la solución.
- Se ingresa el cartucho en el equipo y se registra la información de la muestra en el software del equipo de acuerdo a instrucciones del fabricante.
- Posterior a dos horas se interpretan los resultados.
- Los resultados se basan en una señal fluorescente producida por las sondas y los algoritmos producidos por el software e informa como: MTB detectado, resistencia rifampicina detectado/no detectado, MTB detectado, resistencia rifampicina indeterminado, MTB no detectado, invalido, error, no resultado; teniendo que repetir la prueba en los tres últimos casos.

6 Resultados

6.1 Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con tuberculosis activa

Se evaluaron mediante consulta médica a 6310 personas en las 23 comunidades indígenas intervenidas. Del total de la población que aceptó participar en el estudio y firmó el consentimiento informado 473/6310 (7,5%) personas se reconocieron como no indígenas y 5837/6310 (92.5%) fueron indígenas.

De la población indígena, 4431/5837 (75,9%) individuos pertenecían a la etnia Ticuna, 830/5837 (14,2%) a la etnia Cocama, 465/5837 (8%) a la etnia Yagua y 111/5837 (1,9%) a otras etnias minoritarias como Uitoto, Bora, Okaina, Yukuna, entre otros.

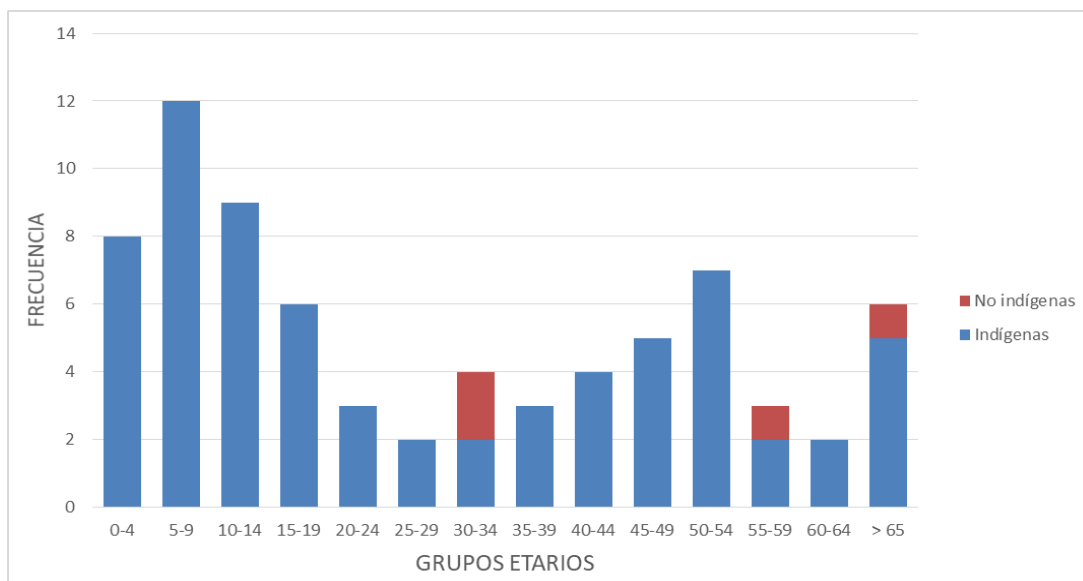
Se diagnosticaron en toda la población 80 casos de tuberculosis activa, 76/80 (95%) en población indígena y 4/80 (5%) casos en población no indígena. Se recuperaron 74 aislados pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*, 70 en población indígena y 4 en población no indígena. Los siguientes resultados están enfocados en los 74 aislados clínicos recuperados, haciendo la diferenciación entre indígenas y no indígenas. En la tabla 2 se observan las características demográficas de los pacientes, tanto indígenas como no indígenas con tuberculosis activa. La mayor proporción de pacientes correspondió al sexo masculino y el pueblo indígena con mayor incidencia fue la etnia Ticuna, mientras que el 86,5% pertenecían al régimen subsidiado.

Tabla 2. Caracterización demográfica de los 74 pacientes con TB activa

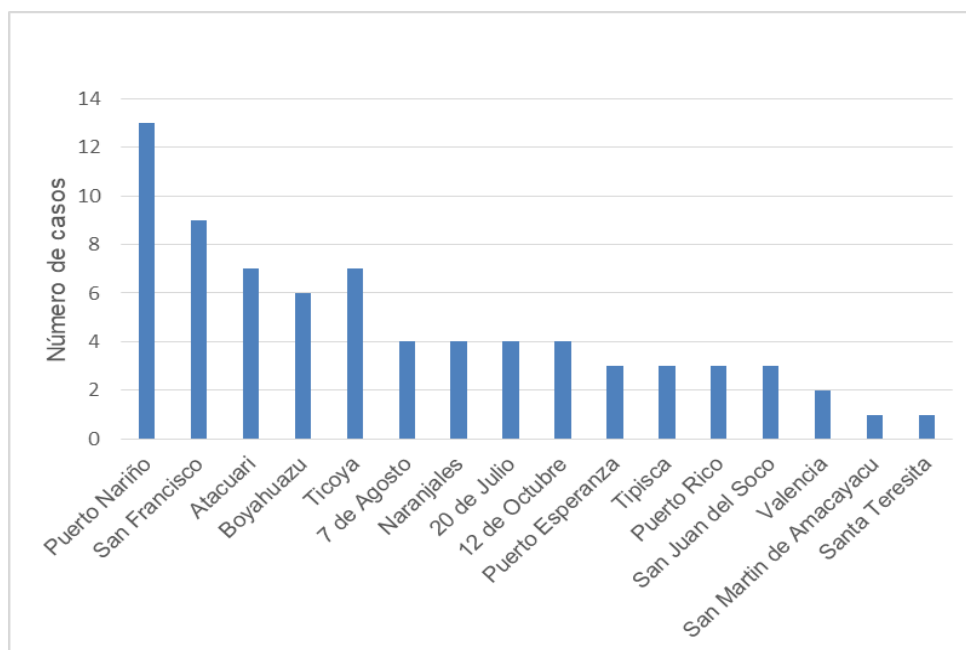
Características demográficas			
Variables		Total	
		Frecuencia	Porcentaje
Sexo	Masculino	45 (2 no indígenas)	60,8%
	Femenino	29 (2 no indígenas)	39,2%
Raza	Indígena	70	94,6%
	No indígena	4	5,4%
Pueblo indígena	Ticuna	37	50%
	Cocama	14	18,9%
	Yagua	19	25,7%
SGSSS	Régimen contributivo	3 (2 no indígenas)	4%
	Régimen subsidiado	64 (1 no indígena)	86,5%
	Régimen especial	1 (1 no indígena)	1,4%
	No asegurado	4	5,4%
	Extranjero	2	2,7%

SGSSS. Sistema General de Seguridad Social en Salud

La edad promedio del diagnóstico de tuberculosis en toda la población fue de 30 años (28,9 años solo en pacientes indígenas), con un rango de 1 a 82 años. El grupo etario con mayores casos diagnosticados fue entre 5 a 9 años con 11 pacientes (14,9%). Además se observa que 33/74 (44,6%) de casos diagnosticados estuvieron en el rango de 0 a 19 años.

Figura 9. Edad de los pacientes diagnosticados con tuberculosis

En cuanto a la geo-referenciación de casos, el mayor número se presentó en la cabecera municipal de Puerto Nariño con 13 casos, siendo además el asentamiento poblacional que presentó 3/4 casos de tuberculosis en pacientes no indígenas. Las comunidades indígenas con el mayor número de casos fueron San Francisco, Atacuari, Ticoya y Boyahuazu con 9, 7, 7 y 6 casos, respectivamente.

Figura 10. Georreferenciación de los pacientes diagnosticados con tuberculosis.

6.2 Recuperación de los aislados clínicos

Los aislados clínicos fueron recuperados en el medio de cultivo Löwenstein Jensen y BACTEC MGIT™. Los 74 cultivos positivos para bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) fueron identificados mediante la prueba inmunocromatográfica TBID (BD) como pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* y confirmados mediante las pruebas comerciales: GeneXpert (Cepheid) y GenoType®MTBDR plus 2.0 (Hain).

6.3 Genotipificación mediante spoligotyping

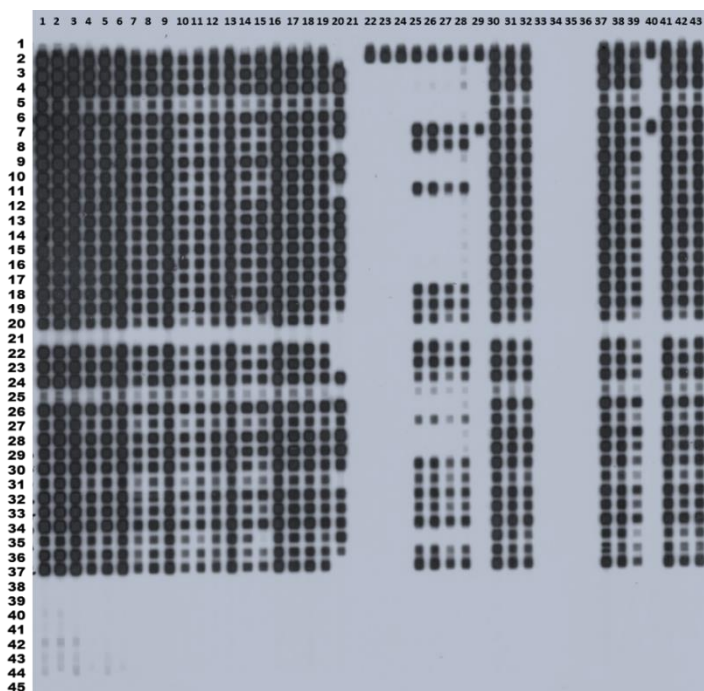
La genotipificación se realizó a los 74 aislados clínicos obtenidos de pacientes indígenas y no indígenas con tuberculosis activa del Municipio de Puerto Nariño-Amazonas en el año 2016. Por Spoligotyping se pudo confirmar que el 100% de aislados correspondió a la especie *M. tuberculosis*.

De los 74 aislados estudiados, 73/74 (98,6%) pertenecían al linaje 4 o Euro-Americano y 1/70 (1,4%) presentó un patrón huérfano.

Mediante algoritmo UPGMA se determinó que 73/74 (98,6 %) aislados clínicos formaron 4 clusters conformados por 2-36 aislados clínicos, y 1/74 (1.35%) fue un patrón único que correspondió al patrón huérfano. El mayor clúster fue el conformado por aislados LAM 6 Sit 95, el cual agrupó el 50% (37/74) de los aislados obtenidos

En la figura 11 se observa una película de hibridación de los aislados clínicos analizados.

Figura 11. Película de revelado de spoligotyping # 1

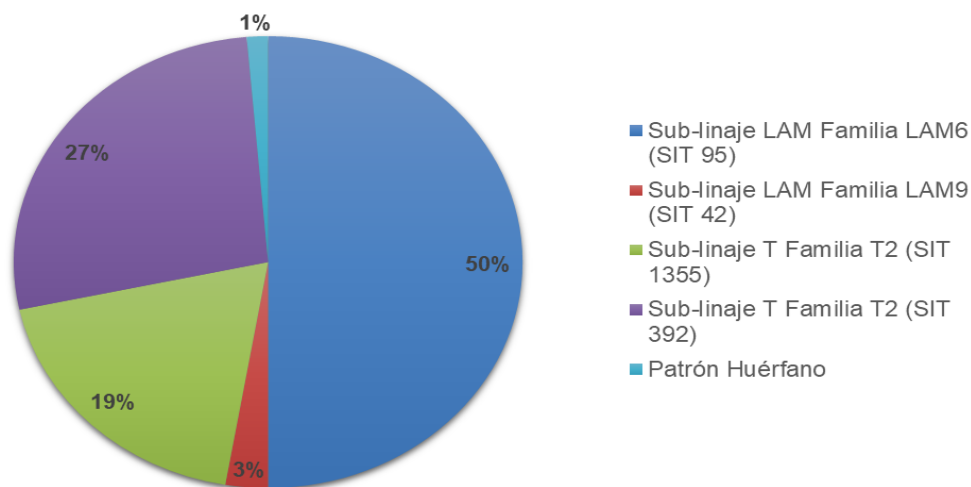


Números horizontales: 1-43 indican espaciador a caracterizar. Números verticales: líneas 1 y 45: control negativo, línea 2: control positivo H37Rv, líneas 3-37 aislados clínicos proyecto Amazonas.

Los análisis de genotipificación por spoligotyping indicaron la presencia de 5 patrones diferentes; 69/70 (98,57%) aislados tuvieron SIT asignado en la base de datos SpolDB4 y 1/70 (1,42%) presentó un patrón huérfano (Patrón no encontrado en la base de datos SpolDB4 (Figura 12).

Figura 12. Distribución de los genotipos encontrados por spoligotyping.

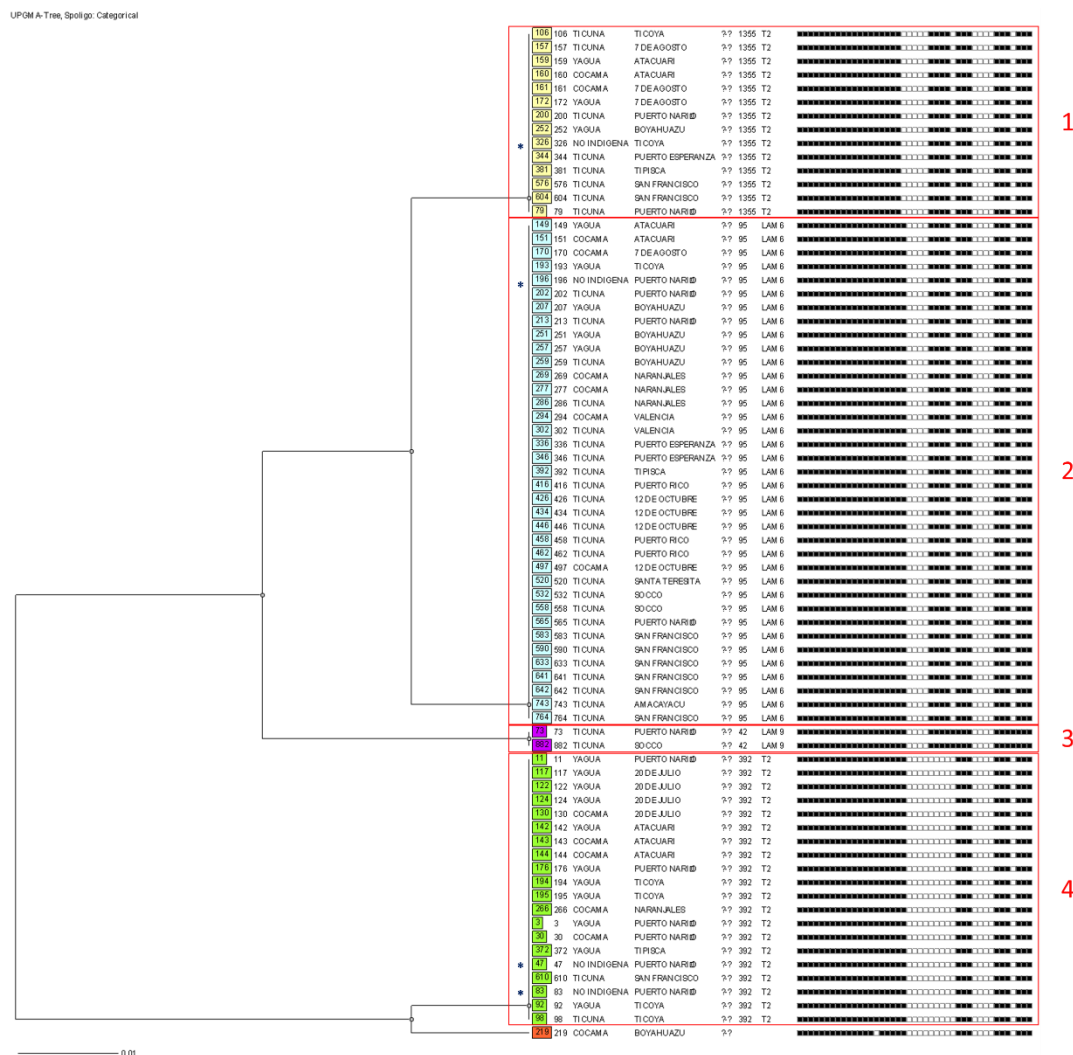
Distribución de genotipos encontrados por spoligotyping



En la figura 13 se observa el dendrograma que comprende los 74 aislados recuperados y genotipificados por el método Spoligotyping, en el que se pueden observar claramente los 4 clusters mencionados, más el patrón huérfano identificado. La tasa de agrupamiento fue de 98,6 %, lo que indica alta transmisión reciente. El mayor clúster fue el conformado por 37 (50%) aislados, pertenecientes al Sub-linaje LAM, Familia LAM 6, SIT95; seguido por el clúster 4 conformado por 20 (27%) aislados, Sub-linaje T, Familia T2, SIT 392; el clúster 1, estuvo conformado por 14 (18.9%) aislados, Sub-linaje T, Familia T2 SIT 1355 y el clúster 3 con 2 (2.7%) aislados Sub-linaje LAM, Familia LAM9 SIT 42; un solo aislado presentó un patrón único que correspondió a un patrón huérfano.

Analizando los 4 aislados obtenidos de pacientes no indígenas se pudo evidenciar que 2 pertenecían al Sub-linaje T Familia T2 (SIT392) y provenían de individuos que vivían en la cabecera municipal de Puerto Nariño, este mismo genotipo fue compartido por 18 aislados obtenidos de indígenas; uno correspondió al sub-linaje LAM, Familia LAM 6 SIT95, compartido por 36 indígenas y uno correspondió con el genotipo sub-linaje T, Familia T2 SIT1355, compartido por 13 indígenas (Figura 13).

Figura 13. Dendrograma formado por los SITs obtenidos mediante spoligotyping.



Los números 1-4 son los clusters formados por los aislados clínicos. Se indica el pueblo indígena y comunidad que pertenece cada paciente. *Aislados de pacientes no indígenas.

El genotipo LAM6 SIT95 se encontró presente en 15/17 (88.2%) comunidades en las que se diagnosticaron casos de TB, con predominio en la comunidad de San Francisco 6/37 (16.2%), Puerto Nariño cabecera municipal 4/37 (10,8%) y 12 de octubre 4/37 (10,8%); el genotipo T2 SIT392 se encontró presente en 7/17 (41.2%) comunidades con predominio en Puerto Nariño cabecera municipal 6/20 (30%); el genotipo T2 SIT1355, se registró en 8/17 (47%) comunidades, con predominio en 7 de agosto 3/14 (21.4%); el patrón huérfano se encontró en la comunidad de Boyahuazu, comunidad localizada en el extremo sur de Colombia frontera con Perú (Tabla 3).

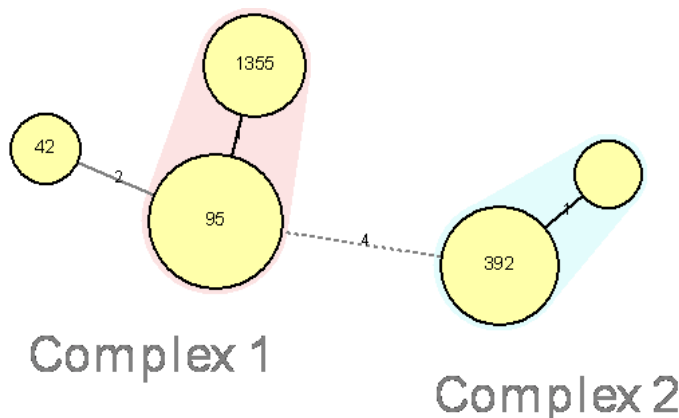
Tabla 3. Genotipos de *M. tuberculosis* circulantes por comunidad

Comunidades	Cultivos TB	LAM6 SIT 95	LAM 9 SIT 42	T2 SIT1355	T2 SIT392	Huérfano	Total
<i>San Martín de Amacayacu</i>	1	1					1
<i>Valencia</i>	2	2					2
<i>Puerto Esperanza</i>	3	2		1			3
<i>20 de Julio</i>	4				4		4
<i>Patrulleros *</i>	2						
<i>Naranjales *</i>	5	3			1		4
<i>7 de Agosto</i>	4	1		3			4
<i>Boyahuazu</i>	6	4		1		1	6
<i>Atacuari</i>	7	2		2	3		7
<i>Puerto Nariño*</i>	15	4	1	2	6		13
<i>Ticoya *</i>	8	1		2	4		7
<i>San Francisco</i>	9	6		2	1		9
<i>San Juan del Soco</i>	3	2	1				3
<i>12 de Octubre</i>	4	4					4
<i>Puerto Rico</i>	3	3					3
<i>Santa Teresita</i>	1	1					1
<i>Tipisca</i>	3	1		1	1		3
Total	80	37	2	14	20	1	74

* Corresponden a comunidades en las que no se pudieron recuperar uno o más aislados de *M. tuberculosis* (n=6)

Se construyó un árbol de expansión mínima (MST, Minimum Spanning Tree) que comprendió todos los aislados. Cada línea indica un posible evento de transmisión entre los grupos o nodos conectados, basado en la cantidad de mutaciones en las regiones analizadas, en caso del spoligotyping 43 regiones. Se utilizó como parámetro un único cambio máximo en el alelo (espaciador) dentro de un complejo clonal. Se evidenciaron 2 complejos clonales formados por los SITs 95 y 1355; y por 392 y el aislado con patrón huérfano. El SIT 42 no forma parte de los complejos clonales pues posee dos cambios alélicos con relación al complejo 1.

Figura 14. Árbol de expansión mínima por creado a partir del Spoligotyping



Complejos clonales formados por la variación mínima de alelos. Se indica los cambios alélicos en las líneas de conexión con cada nodo. El tamaño del nodo indica la cantidad de aislados clínicos presentes. Los números indican el SIT. El aislado con patrón huérfano se encuentra en el nodo sin número.

El poder de discriminación de la genotipificación por spoligotyping fue calculado mediante el índice de discriminación de Hunter-Gaston (HGDI), de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Donde:

N : Número total de aislado clínicos estudiados

S : Número de clusters generados

n_j : Número de aislados clínicos por clúster

De acuerdo al cálculo realizado el índice de discriminación HGDI por Spoligotyping es de 0,636

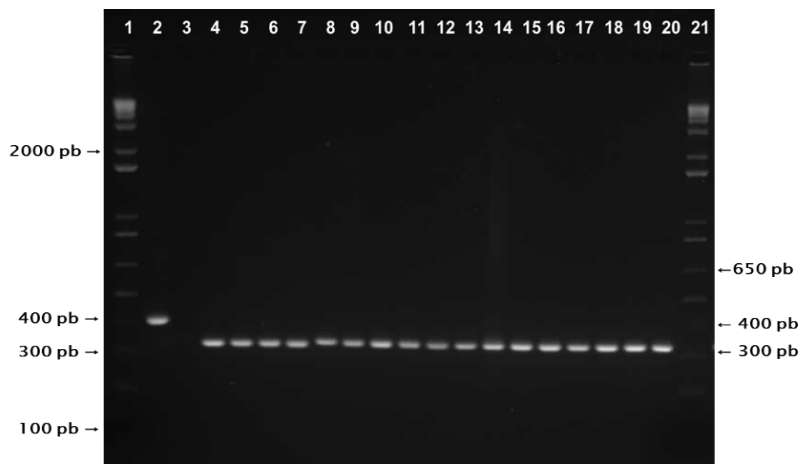
6.4 Genotipificación por MIRU-VNTR de 24 loci

La genotipificación se realizó a todos los 74 aislados clínicos obtenidos, junto con la cepa de referencia H37Rv como control en cada amplificación y cada electroforesis efectuada. Los tamaños de amplicón para cada locus analizado fue comparado con la tabla de correspondencia alélica (Anexo 3) para determinar el número de repeticiones en tándem presente en cada uno de los 24 loci.

En las figuras 15-30 se observan geles de electroforesis y en el anexo 7 se indica el número de repeticiones de cada aislado clínico en los 24 loci analizado. Se puede observar en las

figuras 28, 29 y 30 la detección de una infección policlonal en 2 pacientes puesto que presentan dos bandas en 3 diferentes loci (MIRUs 26, 43 y 49). La infección policlonal fue confirmada por una nueva extracción de ADN y nueva tipificación de los loci mencionados. Ambos pacientes pertenecen a la misma comunidad.

Figura 15. Locus MIRU 4

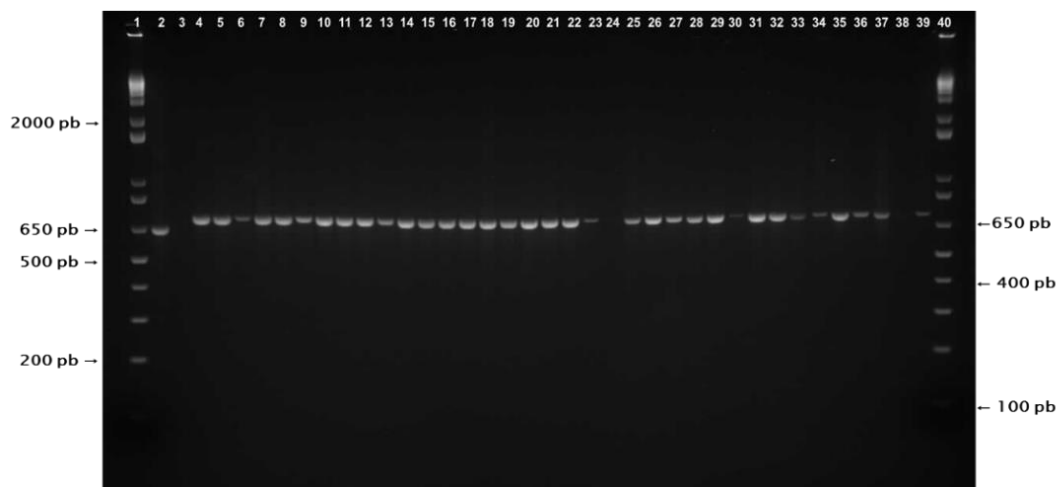


Gel de electroforesis del locus 4 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 21: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (406 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 20: aislados clínicos.

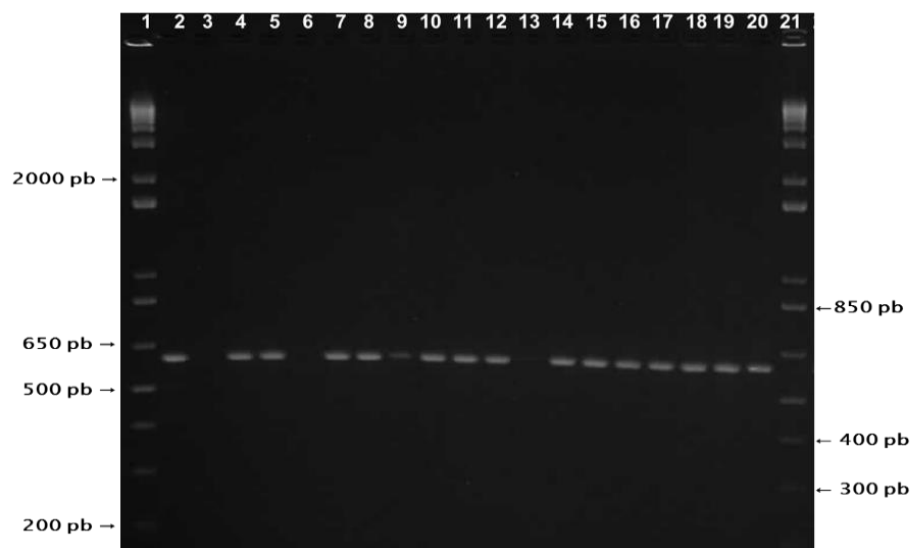
Figura 16. Loci MIRU 47 y MIRU 2



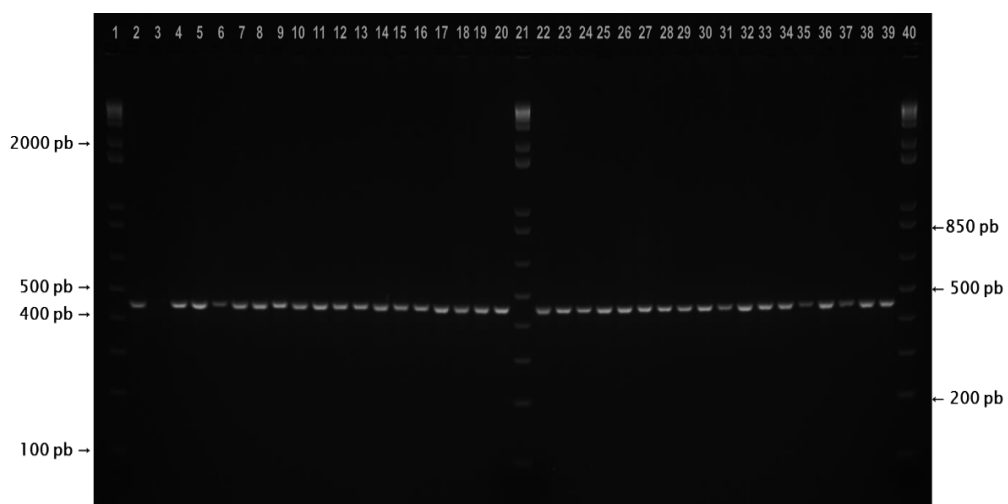
Gel de electroforesis loci 47 y 2, coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 19: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); MIRU 47. Carril 2: cepa control H37Rv (363 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 9: aislados clínicos; MIRU 2. Carril 10: cepa control H37Rv (508 pb); carril 11: control negativo; carriles 12 – 18: aislados clínicos.

Figura 17. Locus MIRU 10

Gel de electroforesis del locus 10 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 40: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (643 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 39: aislados clínicos.

Figura 18. Locus MIRU 20

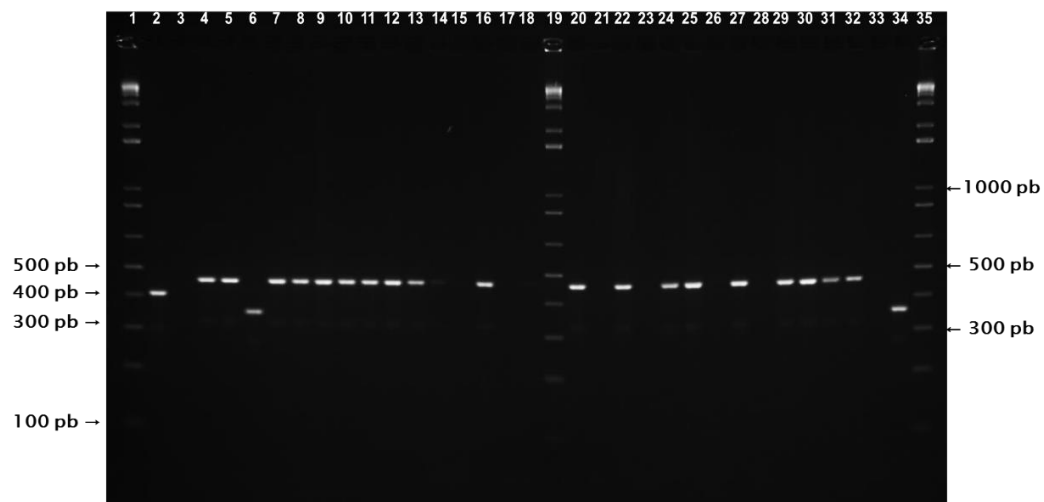
Gel de electroforesis del locus 20 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 21: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (591 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 20: aislados clínicos.

Figura 19. Locus MIRU 24

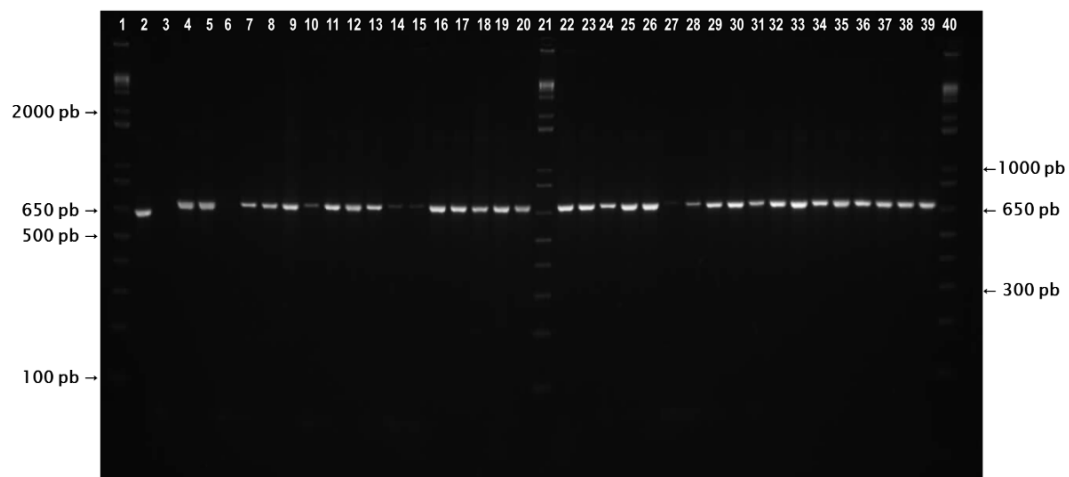
Gel de electroforesis del locus 24 coloreado con SYBR safe. Carriles 1, 21 y 40: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (447 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 39: aislados clínicos.

Figura 20. Locus MIRU 39

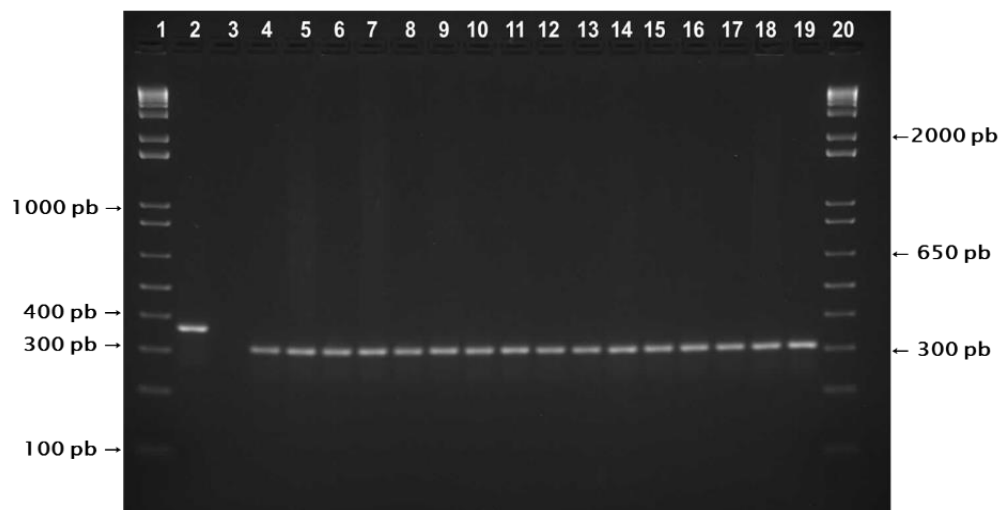
Gel de electroforesis del locus 39 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 21: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (646 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 20: aislados clínicos.

Figura 21. Locus MIRU 40

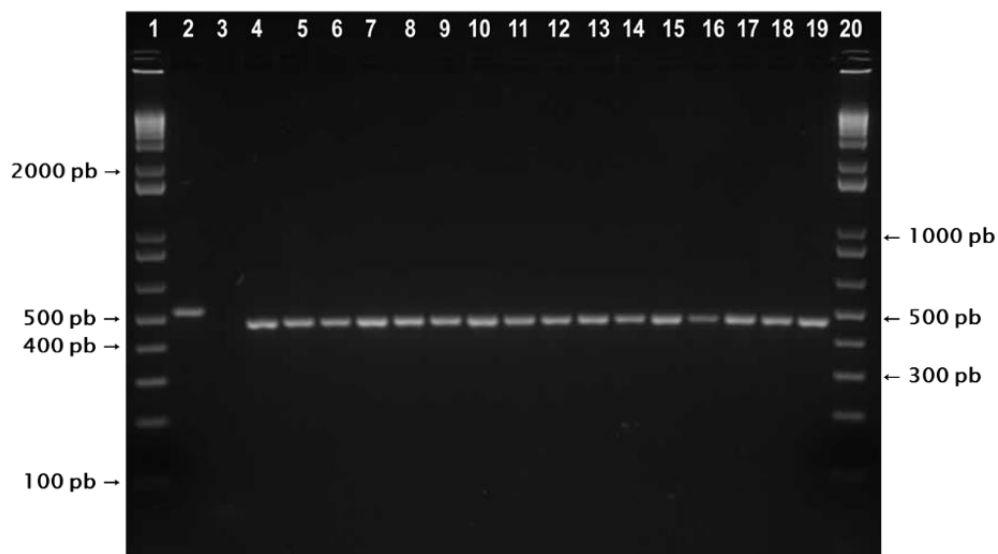
Gel de electroforesis del locus 40 coloreado con SYBR safe. Carriles 1, 19 y 35: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (408 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 34: aislados clínicos.

Figura 22. Locus MIRU 42

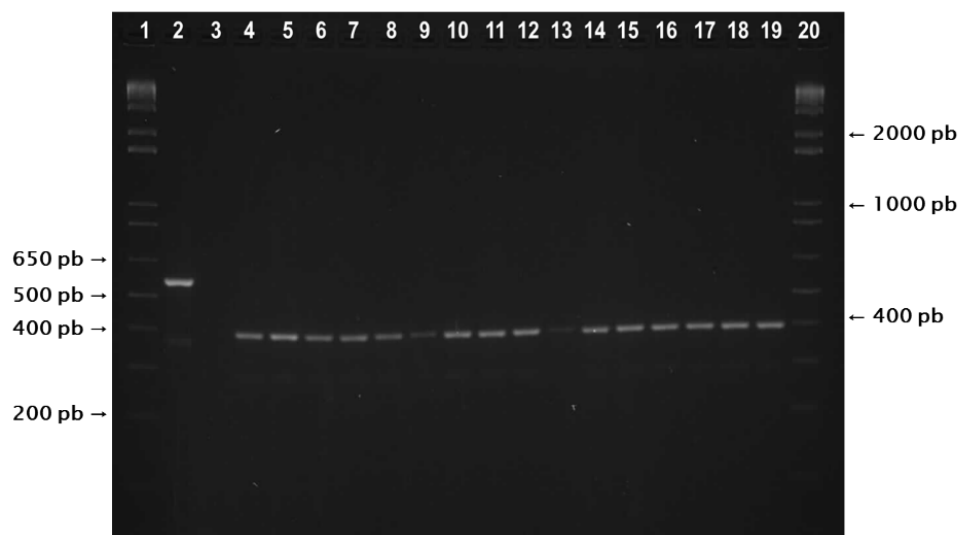
Gel de electroforesis del locus 42 coloreado con SYBR safe. Carriles 1, 21 y 40: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (639 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 39: aislados clínicos.

Figura 23. Locus MIRU 47

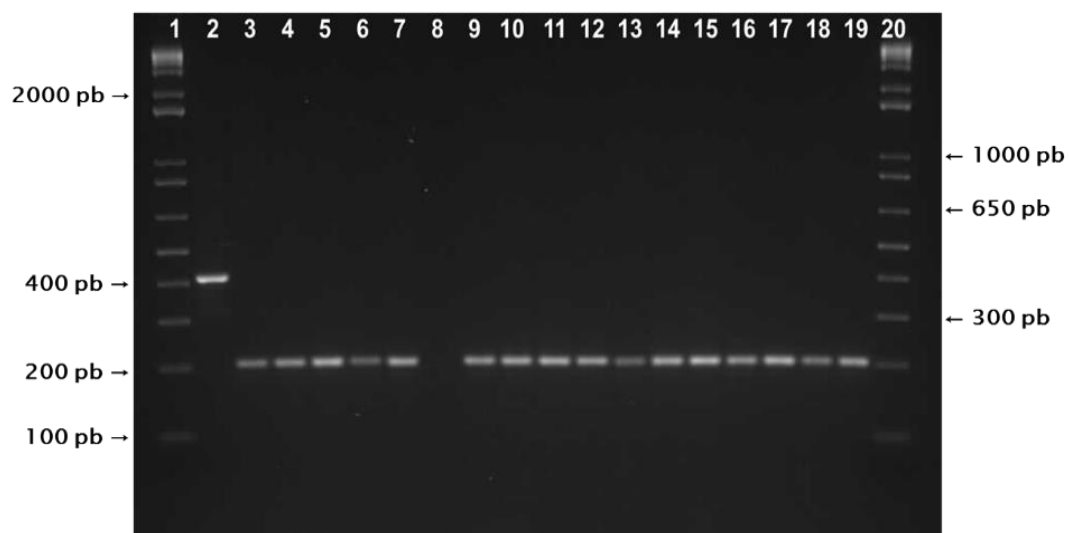
Gel de electroforesis del locus 47 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 20: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (363 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 19: aislados clínicos.

Figura 24. Locus MIRU 48

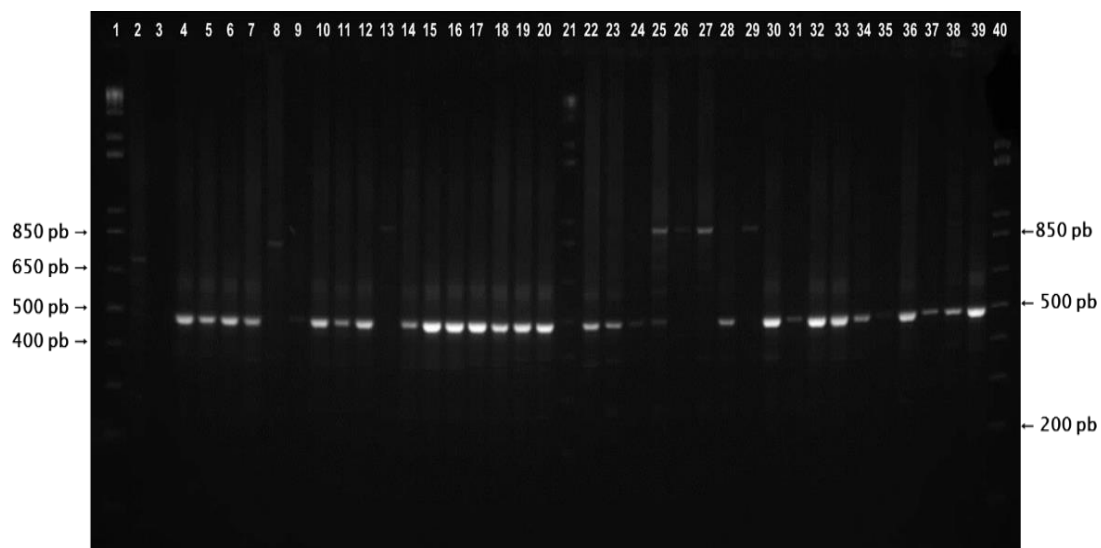
Gel de electroforesis del locus 48 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 20: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (518 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 19: aislados clínicos.

Figura 25. Locus MIRU 52

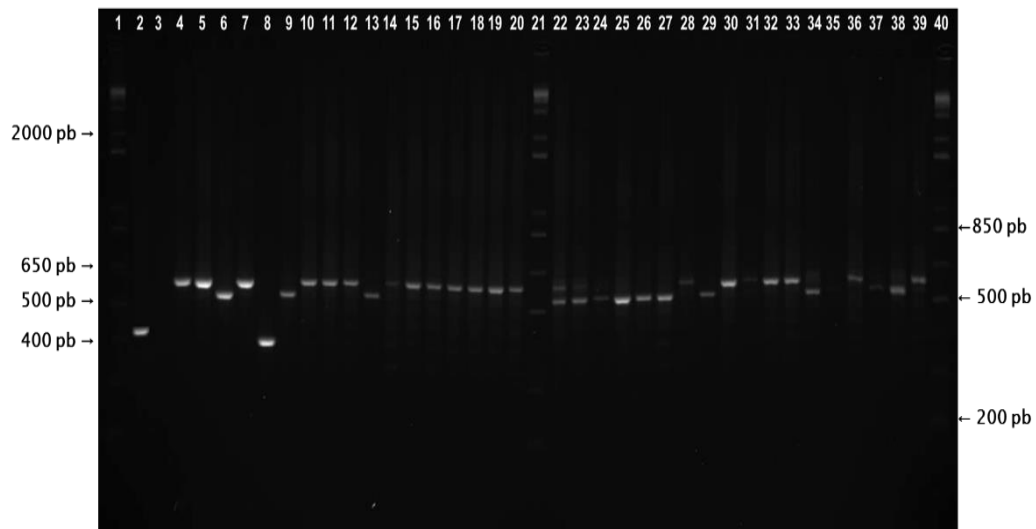
Gel de electroforesis del locus 52 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 20: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (562 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 19: aislados clínicos.

Figura 26. Locus MIRU QUB-11b

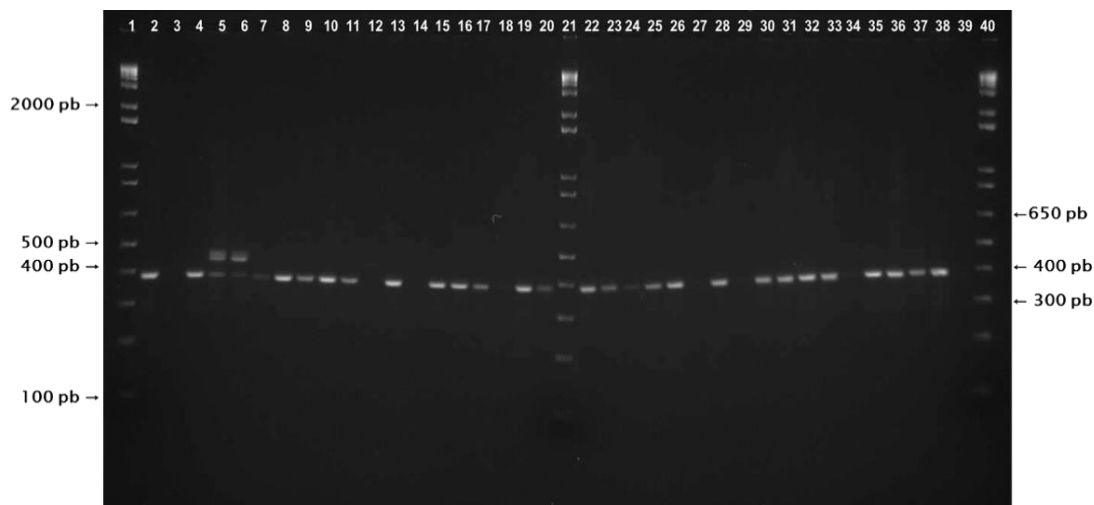
Gel de electroforesis del locus QUB-11b coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 20: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (412 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 19: aislados clínicos.

Figura 27. Locus MIRU QUB-26

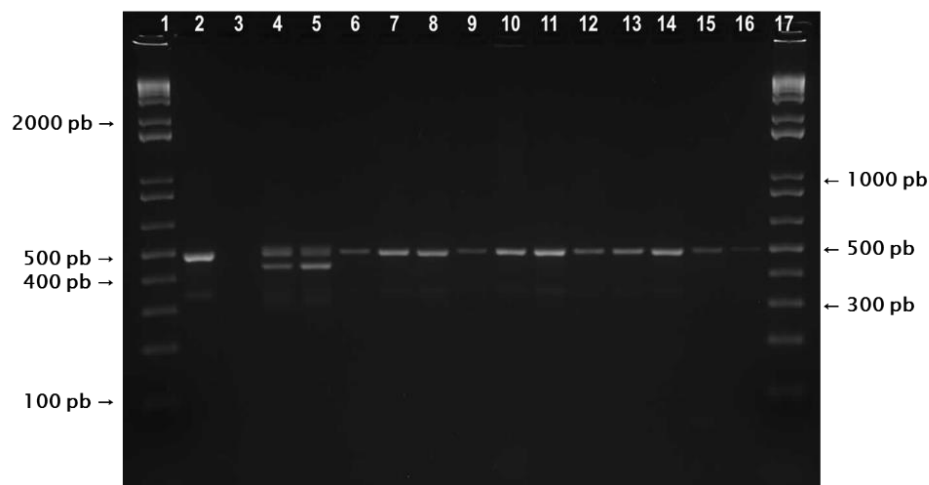
Gel de electroforesis del locus QUB-26 coloreado con SYBR safe. Carriles 1, 21 y 40: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (708 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 39: aislados clínicos.

Figura 28. Locus MIRU 26

Gel de electroforesis del locus 26 coloreado con SYBR safe. Carriles 1, 21 y 40: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (438 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 39: aislados clínicos. Se observa infección policlonal en carriles 22 y 23, dos bandas en cada carril de 540 pb y 591 pb correspondiente a 5 y 6 repeticiones, respectivamente.

Figura 29. Locus MIRU 43

Gel de electroforesis del locus 43 coloreado con SYBR safe. Carriles 1, 21 y 40: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (382 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 39: aislados clínicos. Se observa infección policlonal en carriles 5 y 6, dos bandas en cada carril de 382 pb y 440 pb correspondiente a 4 y 5 repeticiones, respectivamente.

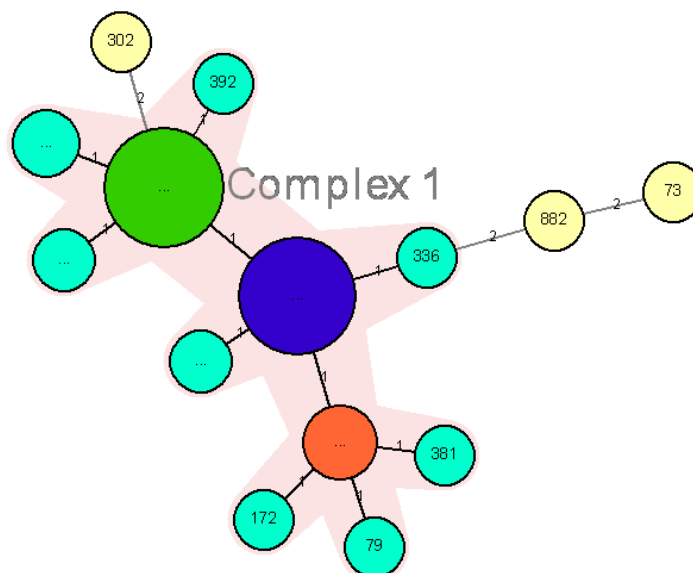
Figura 30. Locus MIRU 49

Gel de electroforesis del locus 49 coloreado con SYBR safe. Carriles 1 y 17: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen); carril 2: cepa control H37Rv (488 pb); carril 3: control negativo; carriles 4 – 16: aislados clínicos. Se observa infección policlonal en carriles 4 y 5, dos bandas en cada carril de 434 pb y 488 pb correspondiente a 2 y 3 repeticiones, respectivamente.

La generación del dendrograma por algoritmo UPGMA permitió determinar el número de aislados clínicos agrupados en clusters y con patrón único. Se obtuvieron 14 genotipos diferentes clasificados de la siguiente manera: 8/74 (10,8%) aislados con patrón único y 66/74 (89,2%) aislados formaron 6 clusters conformados por 2 a 28 aislados; 2 pacientes

Las líneas que unen los nodos del complejo clonal indican un posible evento de transmisión entre los nodos conectados.

Figura 32. Árbol de expansión mínima basado en MIRU-VNTR



Complejo clonal formado por la variación mínima de alelos. Se indica los cambios alélicos en las líneas que conectan cada nodo. El tamaño del nodo indica la cantidad relativa de aislados clínicos que lo conforman. Los números indican la identificación del aislado cuando el nodo lo conforma un solo aislado.

Adicionalmente se determinó la frecuencia alélica de los 24 loci MIRUs. En la tabla 4 se muestran el porcentaje de frecuencia de cada loci. Se puede observar que 17/24 loci (71%) no fueron polimórficos puesto que presentan un solo alelo. 2/24 loci (8%) fueron los más polimórficos: MIRUs 26 y QUB-26 con tres alelos diferentes y 5/24 loci (21%) presentaron 2 alelos diferentes: MIRUs 42, 43, 40, 1955 y 49.

Tabla 4. Porcentaje de frecuencia alélica de los 24 loci analizados

MIRU-VNTR	Porcentaje de frecuencia por número de copias										N° total de alelos
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
2		100%									1
42		6%		94%							2
43					97%	3%					2
4			100%								1
40	6%		94%								2
10					100%						1
16				100%							1
1955				4%	96%						2
20			100%								1
QUB-11b			100%								1
ETRA			100%								1
46					100%						1
47		100%									1
48			100%								1
23							100%				1
24		100%									1
26				3%		50%	47%				3
27				100%							1
49			4%	96%							2
31			100%								1
52			100%								1
QUB-26				83%			4%	13%			3
53			100%								1
39			100%								1

El poder de discriminación de la genotipificación por MIRU-VNTR 24 loci, así como de cada locus analizado por MIRU-VNTR, fue calculado, al igual que spoligotyping, mediante el índice de discriminación de Hunter-Gaston (HGDI), de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Donde:

N : Número total de aislado clínicos estudiados

S : Número de clusters generados

n_j : Número de aislados clínicos por clúster

El índice de discriminación HGDI por la genotipificación por MIRU-VNTR 24 loci es de 0,727. La tabla 5 muestra el poder de discriminación de cada loci. Se observa que 17 loci (70,8%) tuvieron poder de discriminación nulo (HGDI=0), y los loci MIRU más discriminatorios fueron MIRU 26 y QUB-26 con un índice de discriminación HGDI de 0,534 y 0,292, respectivamente.

Tabla 5. Diversidad alélica por HGDI de los 24 loci MIRU-VNTR analizados.

MIRU-VNTR	HGDI
2	0
42	0,107
43	0,055
4	0
40	0,107
10	0
16	0
1955	0,081
20	0
QUB-11b	0
ETRA	0
46	0

47	0
48	0
23	0
24	0
26	0,534
27	0
49	0,081
31	0
52	0
QUB-26	0,292
53	0
39	0

6.5 Genotipificación por spoligotyping y MIRU-VNTR 24 loci.

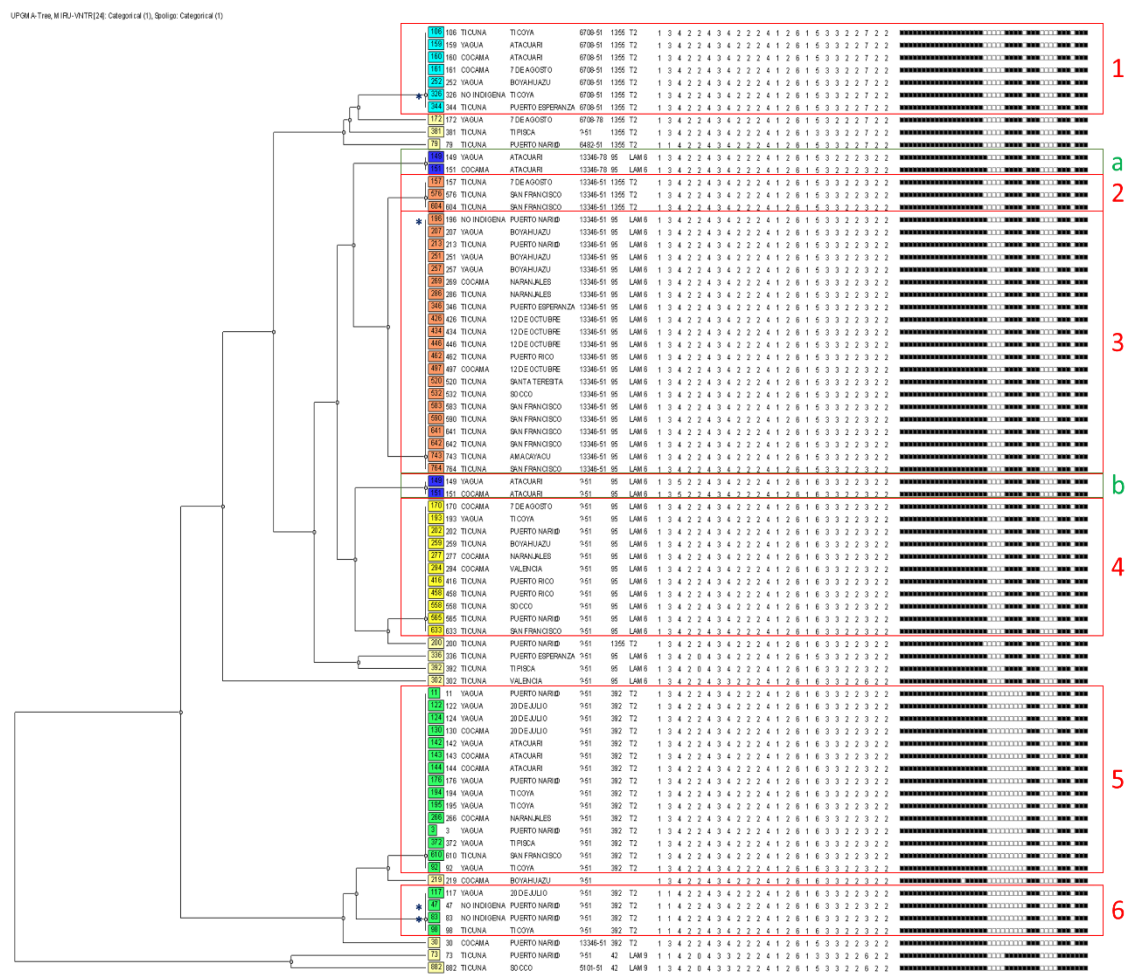
La combinación de los resultados de las dos metodologías empleadas permitió tener un mayor poder discriminatorio entre los clusters formados por los métodos genotípicos individuales. Mediante algoritmo UPGMA se determinó la presencia de 19 genotipos diferentes, se formaron 8 clusters que agruparon 63/74 (85,1%) aislados y 11/74 (14,9%) aislados presentaron un patrón único. 2 pacientes que presentaron infección policlonal formaron dos clusters exclusivos (a y b).

En la figura 33 se observa el dendrograma generado y la formación de los clusters mencionados. Comparativamente, el clúster 1 formado mediante spoligotyping por el SIT 1355 (T2) con 14 aislados clínicos se dividió en 2 clusters con 7 (1 paciente no indígena) y 3 aislados, respectivamente, y 4 aislados se clasificaron como patrones únicos; el clúster 2 formado por el SIT 95 (LAM6) conformado por 37 aislados (1 paciente no indígena) se

dividió en 4 clusters, 2 de los clusters correspondieron a los pacientes con infección policlonal, y 3 patrones huérfanos; el clúster 3 formado por 2 aislados clínicos correspondientes al SIT 42 (LAM9) fueron separados como patrones únicos; y el clúster 4 formado por el SIT 392 (T2) con 20 aislados fue dividido en 2 clusters con 15 y 4 aislados clínicos (2 pacientes no indígenas), respectivamente, y 1 aislados clínico fue separado como patrón único.

En resumen los clusters formados fueron los siguientes: clúster 1 con 7 aislados, uno proveniente de un paciente no indígena; clúster 2 formado por 3 aislados; clúster 3 compuesto por 21 aislados, uno de los cuales era de un individuo no indígena; clúster 4 formado por 11 aislados; clúster 5 formado por 15 aislados clínicos; clúster 6 formado por 4 aislados, 2 de ellos pertenecen a pacientes no indígenas; clúster *a* formado por 2 aislados; clúster *b* compuesto por 2 aislados; y por último se detectaron 11 patrones únicos.

Figura 33. Dendrograma formado por la combinación de las metodologías spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 loci.



Los números 1-6 y las letras a y b son los clusters formados por los aislados. Clusters a y b formados por pacientes con infección policlonal. Se indica el pueblo indígena y comunidad a la que pertenece cada paciente. *Aislados de pacientes no indígenas.

El poder de discriminación de la combinación de los métodos genotípicos MIRU-VNTR 24 loci y Spoligotyping se calculó utilizando la fórmula de HGDI

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

Donde:

N : Número total de aislado clínicos estudiados

S : Número de clusters generados

n_j : Número de aislados clínicos por clúster

El índice de discriminación HGDI por la combinación de los métodos genotípicos MIRU-VNTR 24 loci y Spoligotyping es de 0,840

En la siguiente tabla se puede apreciar la comparación del índice de discriminación de las metodologías empleadas, tanto separadas como combinadas. Se puede observar que el índice de discriminación aumenta cuando se combinan las dos metodologías de genotipificación.

Tabla 6. Comparación del poder discriminatorio de cada método genotípico utilizado.

Método de genotipificación	Clusters formados	Aislados clínicos agrupados	Patrones únicos	HGDI
Spoligotyping	4	73	1	0,636
MIRU-VNTR	6	66	8	0,727
MIRU-VNTR y Spoligotyping	8	63	11	0,840

6.6 Interpretación de resultados de genotipificación

A partir de los datos demográficos obtenidos de los formatos de consultas médicas se analizaron cada uno de los clusters formados por la combinación MIRU-VNTR y spoligotyping.

Clúster 1

Formado por 7 aislados clínicos: **Sub-linaje T, familia T2, SIT 1355 y MIT 201.**

Dos pacientes residen en Atacuari, sin relación específica; dos pacientes residen en Ticoya y conviven en el mismo hogar (madre-hija), uno de ellos no indígena; los 3 pacientes restantes residen en las comunidades de 7 de Agosto, Boyahuazu y Puerto Esperanza.

Clúster 2

Formado por 3 aislados clínicos: **Sub-linaje T, familia T2, SIT 1355 y MIT 201.**

Dos pacientes pertenecen a la misma comunidad, San Francisco, sin relación específica. El tercer paciente pertenece a la comunidad 7 de Agosto.

Clúster 3

Formado por 21 aislados clínicos: **Sub-linaje LAM, familia LAM6, SIT 95 y MIT 201.**

5 pacientes pertenecen a la comunidad San Francisco, 3 de los cuales son hermanos que conviven en el mismo hogar; 12 de Octubre con 4 pacientes; Boyahuazu 3 pacientes; Naranjales 2 pacientes; cabecera municipal Puerto Nariño 2 pacientes, uno de ellos no indígena. Los 5 últimos pacientes residían en diferentes comunidades: San Martín de Amacayacu, Puerto Esperanza, Puerto Rico, Santa Teresita y San Juan de Soco.

Clúster 4

Formado por 11 aislados clínicos: **Sub-linaje LAM, familia LAM6, SIT 95 y MIT 328.**

Dos pacientes residían en Puerto Nariño cabecera municipal y otros dos en Puerto Rico. Los 7 pacientes restantes viven en diferentes comunidades: 7 de Agosto, Boyahuazu, Naranjales, San Francisco, San Juan del Soco, Ticoya y Valencia.

Clúster 5

Formado por 15 aislados clínicos: **Sub-linaje T, familia T2, SIT 392 y MIT 328.**

3 pacientes residen en la cabecera municipal Puerto Nariño, 2 de los cuales tienen relación directa (padre e hija que viven en la misma casa). En el resguardo indígena Ticoya se encontraron tres pacientes que conviven en el mismo hogar. En las comunidades 20 de Julio y Atacuari residen 3 pacientes sin relación específica, respectivamente. Finalmente 3 pacientes restantes residen en las comunidades Naranjales, San Francisco y Tipisca.

Clúster 6

Formado por 4 aislados clínicos: **Sub-linaje T, familia T2, SIT 392 y MIT 328.**

Dos corresponden a dos individuos no indígenas de cabecera municipal de Puerto Nariño sin relación específica y los otros 2 pacientes residen en las comunidades 20 de Julio y Ticoya.

Clúster a

Formado por 2 aislados clínicos: **Sub-linaje LAM, familia LAM6, SIT 95 y MIT 201**

Los dos pacientes presentan infección policlonal, y forman 2 clusters exclusivos junto con cluster b. Sin una relación específica, los pacientes residen en la comunidad Atacuari.

Clúster b

Formado por 2 aislados clínicos: **Sub-linaje LAM, familia LAM6, SIT 95 y MIT 328**

Los dos pacientes presentan infección policlonal, y forman 2 clusters exclusivos junto con cluster b. Sin una relación específica, los pacientes residen en la comunidad Atacuari.

En la tabla 7 se observa un resumen de la distribución de los aislados clínicos en las diferentes comunidades indígenas.

Tabla 7. Distribución de los aislados clínicos por clusters en las comunidades indígenas

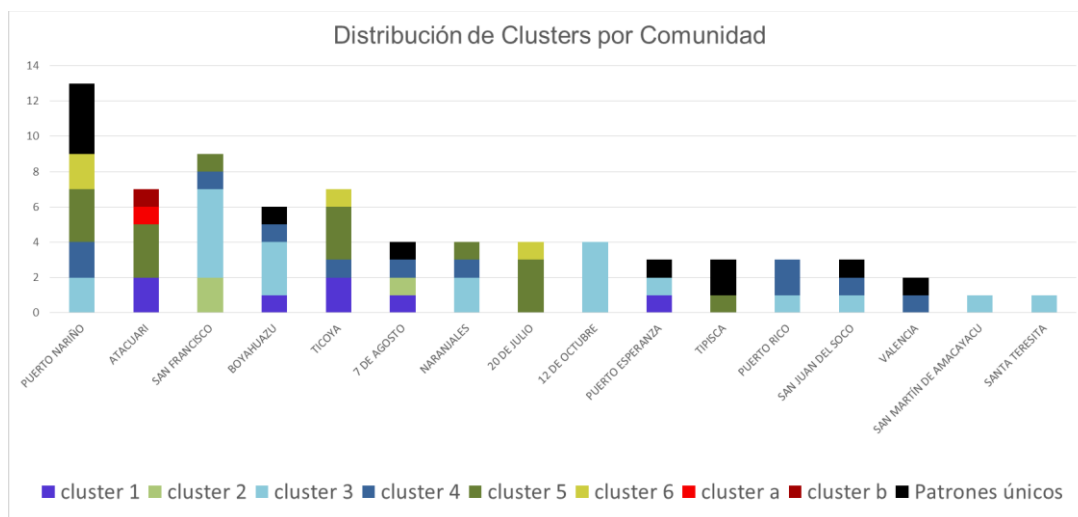
Comunidades	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Ca	Cb	Patrón único	Huér-fano	Total
Puerto Nariño			1(1)	2	3	(2)			4		13
Ticoya	1(1)			1	3	1					7
Atacuari	2				3		2*	2*			7+
Boyahuazu	1		3	1						1	6
7 de Agosto	1	1		1					1		4
Puerto Esperanza	1		1						1		3
Tipisca					1				2		3
20 de Julio					3	1					4
12 de Octubre			4								4
Naranjales			2	1	1						4
Puerto Rico			1	2							3
Sta. Teresita			1								1
San Juan del Socó			1	1					1		3
San Francisco		2	5	1	1						9
Valencia				1					1		2
San Martín de Amacayacu			1								1
Total	7	3	21	11	15	4	1+	1+	10	1	74

En paréntesis () se indica número de pacientes no indígenas; * infección policlonal: + Infección policlonal, se toma como un solo paciente.

Por otro lado, de los 23 asentamientos indígenas intervenidos (22 comunidades y cabecera municipal) 16/23 (69,6%) asentamientos tuvieron al menos un caso de tuberculosis (Santa Teresita y San Martín de Amacayacu) y un máximo de 13 casos (Puerto Nariño), tres de los cuales pertenecen a pacientes no indígenas. La cabecera municipal Puerto Nariño fue la zona geográfica que presentó mayor diversidad genética, de acuerdo a los métodos empleados, con 8/19 (42,1%) genotipos diferentes y con la

mayor cantidad de patrones únicos, 4/10 (40%); mientras que la comunidad de Boyahuazu fue la única que se encontró un patrón huérfano. En la figura 34 se observa la distribución de los clusters en cada comunidad que presentó casos de tuberculosis durante el estudio.

Figura 34. Distribución de Clusters por Comunidad.



De acuerdo a la figura 34, se puede destacar que en la comunidad 12 de Octubre se presentó un solo genotipo en sus cuatro pacientes, en la comunidad San Francisco 5/9 (55,5%) pacientes comparten un mismo genotipo; y en las comunidades de Valencia, San Juan del Socco, Puerto Esperanza y 7 de Agosto cada paciente con TB tienen un genotipo diferente, lo que sugiere reactivación de una infección pasada, mientras que en las comunidades que presentaron la circulación de un idéntico genotipo de *M. tuberculosis* indican que la transmisión de la TB probablemente fue reciente.

En el anexo 8 se puede observar la georreferenciación de los clusters formados en las comunidades indígenas que presentaron casos de tuberculosis. En las comunidades limítrofes con Perú no fueron posibles obtener las imágenes satelitales, por lo que se representan esquemáticamente.

La base de datos SpolDB4, que se encuentra disponible en línea en la aplicación SITVIT WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/tools.jsp), contiene un total de 1939 SITs representativos de 39.295 aislados clínicos originarios de 122 países y permitió analizar los SITs encontrados en el presente estudio:

El SIT 1355 (T2) que representó el 18,57% de los aislados clínicos recuperados en este estudio fue reportado previamente en Italia (n=10), Estados Unidos (n=6), Argentina (n=1) y Perú (n=1).

El SIT 392 (T2) que representó el 25,71% de los aislados de estudio, se había reportado únicamente en Brasil (n=4) y Argentina (n=1).

El SIT 95 (LAM6) que representó el 51,43% de los aislados clínicos obtenidos, había sido descrito en Sudamérica, principalmente en Brasil (n=15), además en Paraguay (n=2) y Guayana Francesa (n=3). Otros países que reportaron fueron Estados Unidos (n=8), Reino Unido (n=1) y Sudáfrica (n=1).

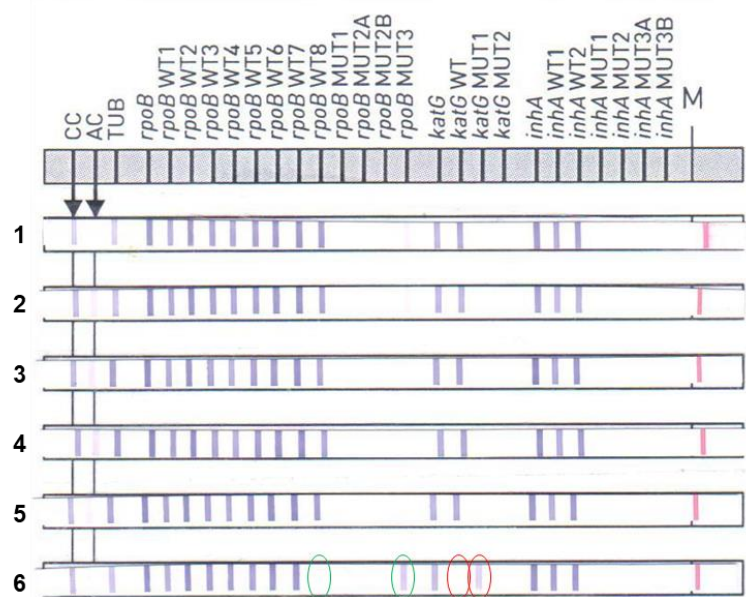
Finalmente el SIT 42 (LAM9) que representó el 2,85% de los aislados clínicos obtenidos, es uno de los SITs más reportados a nivel global en la base SpolDB4 (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/tools.jsp). A nivel mundial se reportaron 1955 cepas con este genotipo, 390 (19,9%) de las cepas reportadas fueron aisladas en Estados Unidos, seguido por Brasil con 234 (12%) cepas reportadas. En Sudamérica, los países que reportaron el genotipo fueron Venezuela, Argentina, Paraguay y Perú reportaron 95, 63, 40 y 7 cepas, respectivamente. En Colombia, Cerezo y colaboradores (Cerezo, y otros, 2012), Puerto y colaboradores (Puerto, y otros, 2015) y Realpe y colaboradores (Realpe, y otros, 2014) reportaron SIT 42 en 42/152 (27,6%); 183/741 (24,7%) y 124/414 (29,9%) aislados clínicos, respectivamente, aunque estos no se ven reflejados en la base de datos SpolDB4.

6.7 Evaluación de la susceptibilidad por métodos fenotípicos y genotípicos.

Por las metodologías fenotípicas aplicadas, se determinó que 73/74 (98.6%) aislados clínicos fueron susceptibles a rifampicina e isoniazida, mientras que un aislado clínico (1,4%) fue resistente a ambos medicamentos. Mediante la metodología genotípica GenoType® MTBDRplus versión 2.0, todos los aislados estudiados correspondieron al Complejo *M. tuberculosis*, 73/74 (98.6%) aislados clínicos no presentaron ninguna mutación en los genes evaluados (*rpoB*, *katG* e *inhA*) sugiriendo susceptibilidad a

rifampicina e isoniazida, y un solo aislado clínico (1,35%) presentó mutaciones en los genes *rpoB* y *katG*, el gen *rpoB* mostró una mutación en el codón 531 (Ser531Leu) y el gen *katG* presentó una mutación en el codón 315 (Ser315Thr1), sugiriendo resistencia a los fármacos rifampicina e isoniazida, respectivamente. Por GeneXpert MTB/RIF® se determinó igualmente que todos los aislados estudiados correspondieron al Complejo *M. tuberculosis*, 73/74 (98.6%) aislados clínicos no presentan ninguna mutación en la región core del gen *rpoB* y son susceptibles a rifampicina, mientras que 1/70 (1,4%) aislado clínico presentó mutación en la región core del gen *rpoB*, indicando resistencia a rifampicina. La figura 35 muestra las tiras de nitrocelulosa del kit GenoType® MTBDRplus utilizadas y la tabla 8 muestra los resultados de las pruebas de susceptibilidad tanto por métodos fenotípicos como genotípicos.

Figura 35. Tiras de nitrocelulosa de GenoType® MTBDRplus



GenoType® MTBDRplus. Números 1 – 6 muestras clínicas. Se destaca la presencia de las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina e isoniazida

Tabla 8. Resultados de las pruebas de susceptibilidad realizadas.

Método	Pan-susceptible	Monoresistente (Rifampicina)	Monoresistente (Isoniazida)	Multi-drogo-resistente	Total
Proporciones múltiples	73	0	0	1	74
BACTEC™ MGIT™ SIRE	73	0	0	1	74
GenoType® MTBDRplus 2.0	73	0	0	1	74
Xpert MTB/RIF®	73	1*	N.A.	N.A.	74

El mismo paciente mostró resistencia a rifampicina e isoniazida. * El ensayo Xpert MTB/RIF® no detecta resistencia a isoniazida. N.A.: No Aplica.

7 Discusión

El presente estudio permitió demostrar la situación de la tuberculosis en población indígena, del municipio de Puerto Nariño (Amazonas). Se diagnosticaron en total 80 casos de tuberculosis (74 casos nuevos y 6 recaídas) para una prevalencia de 1.267 casos/100.000 habitantes. Teniendo en cuenta solamente la población indígena, la prevalencia fue de 1.302 casos/100.000 habitantes (70 casos nuevos y 6 recaídas), esto es 48 veces más que la encontrada en población general en Colombia en el año 2015. Aunque existen pocos estudios que determinan prevalencia en población indígena, se ha encontrado que el pueblo Yanomami (Brasil), tiene una prevalencia de 6.400 casos/100.000 habitantes, 94,1 veces mayor que la encontrada en población general del estado de Amazonas (Sousa, y otros, 1997). Otro estudio realizado en el año 2.001, en la comunidad indígena Chine (Cotopaxi-Ecuador), encontró una prevalencia de 6.700 casos/100.000 habitantes (Romero-Sandoval, Flores-Carrera, Sánchez-Pérez, Sánchez-Pérez, & Mateo, 2007).

En población privada de la libertad, otro grupo vulnerable, se han encontrado prevalencias también superiores con relación a la población general. Por ejemplo en el Establecimiento Penitenciario y Carcelario “La Esperanza”, Municipio de Guaduas (Cundinamarca) se determinó la prevalencia de TB activa en 1.026,6 casos/100.000 habitantes en el año 2015 (Guerra, 2016), y un estudio realizado en una prisión en Río de Janeiro, Brasil, en el año 2002, encontró una prevalencia de 4.562 casos/100.000 habitantes (Sanchez, y otros, 2005).

La incidencia en el periodo de estudio (marzo – noviembre 2016) fue de 1.199,2 casos/100.000 habitantes, y al compararla con los estudios realizados en otras poblaciones indígenas se encuentra, de la misma manera, incidencias superiores a la población general. Por ejemplo en el pueblo indígena Warao, que habita en el delta del río Orinoco-Venezuela, se determinó una incidencia de 468 casos/100.000 habitantes (Maes, Kremer, van Soelingen, Takiff, & de Waard, 2008); e incluso llegando a incidencias de 2.500 casos/100.000 habitantes entre el pueblo indígena Suruí, en Brasil (Coimbra Jr & Basta, 2007). Esta situación no solo se da en Latinoamérica sino en la gran mayoría de comunidades indígenas a nivel global. Como ejemplo de lo mencionado en Canadá el pueblo Inuit tuvo una incidencia de 155,8 casos/100.000 habitantes, casi 150 veces más

que la población general, de la misma manera el pueblo Inuit en Groenlandia la incidencia tuvo su pico más alto en 2001 con 185 casos/100.000 habitantes y finalmente el grupo étnico E-Lun Chun en China tuvo una incidencia de 6500 casos/100.000 habitantes para el año 1985 (Tollefson, y otros, 2013). Esta alta carga de tuberculosis indica fallas en la detección de casos en esta población vulnerable debido al escaso acceso de estas comunidades a los servicios de salud estatales y la necesidad de mejorar los programas nacionales de tuberculosis entre la población indígena ajustadas a sus creencias y tradiciones propias de cada pueblo.

Se recuperaron 74 aislados clínicos de personas con tuberculosis, 70 de los cuales fueron obtenidos de personas que se reconocían como indígenas. La mayor proporción de enfermos fueron hombres (61%) lo cual concuerda con lo reportado por el INS para el año 2015 que el 63,3% de las TB en Colombia se presentó en el sexo masculino (Instituto Nacional de Salud SIVIGILA, 2015) y con reportes globales como el informe de tuberculosis de la OMS que indica que el 56% de casos nuevos para el año 2015 se presentó en hombres (World Health Organization, 2016). Sin embargo, vale la pena resaltar el número alto de casos en niños indígenas menores de 15 años, 31/70 (44,3%). La tuberculosis infantil puede ser considerada un evento centinela sugestivo de transmisión reciente de un adulto enfermo y podría indicar la falta de control y tratamiento de casos primarios. Aunque se ha aceptado que la transmisión se da por contactos propios del hogar, es decir por miembros de la familia o amigos muy cercanos, en comunidades con altas incidencias de tuberculosis la transmisión puede ocurrir principalmente fuera del hogar, aunque dentro de la comunidad (Schaaf, y otros, 2003). El diagnóstico suele ser un desafío, especialmente por la dificultad de obtener las muestras de esputo con la calidad necesaria para el diagnóstico. Aun así, se ha encontrado alta proporción de casos de TB infantil en población indígena del pueblo Suruí, en la Amazonía brasileña, descrito en un estudio que realizó un análisis descriptivo de los registros disponibles del Programa de Control de Tuberculosis del municipio de Cacoal, Rondônia en el decenio 1991-2002 encontrando una incidencia de tuberculosis de 2.518,9 casos/100.000 habitantes, y el 45% de casos fue notificado en menores de 15 años (Basta, Coimbra Junior, Escobar, & Ventura Santos, 2004), lo que concuerda con el presente estudio. La importancia del diagnóstico de este grupo étnico radica en que la TB puede diseminarse a cualquier órgano, en los lactantes hay un mayor riesgo de TB meníngea en especial si no han recibido la vacuna BCG, mientras que los

niños de mayor edad tienden a desarrollar tuberculosis pulmonar, encefálica, renal y osteoarticular (Arenas-Suárez, y otros, 2010).

Por spoligotyping, se identificaron 2 sub-linajes que de acuerdo a su frecuencia fueron LAM y T con 54,2% y 44,3% respectivamente. Los estudios filogeográficos realizados en Colombia muestran un predominio de los sub-linajes LAM y Haarlem, y en tercer lugar el sub-linaje T; Realpe y colaboradores mostraron que el 82,8% de cepas circulantes pertenecen a los linajes LAM y Haarlem, esto basado en el estudio de 414 aislados clínicos recolectados en tres ciudades (Medellín, Cali y Popayán) de 2005 a 2008 (Realpe, y otros, 2014). De la misma manera, Cerezo y colaboradores determinaron la estructura poblacional de 152 aislados clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos en Bogotá entre 1995 y 2007, encontrando un predominio de los sub-linajes LAM y Haarlem con 49,3% y 25%, respectivamente (Cerezo, y otros, 2012). El presente estudio en la población indígena de Puerto Nariño coincide parcialmente con lo reportado previamente, con predominio del sub-linaje LAM, sin embargo el sub-linaje T tiene gran representación y el sub-linaje Haarlem no se encuentra circulando en la población de estudio. Una posible explicación de este comportamiento puede deberse a la baja diversidad genómica encontrada, pues se obtuvieron tan solo 5 patrones espiligotipo diferentes, incluyendo 1 patrón huérfano; mientras que el estudio de Realpe y colaboradores determinó 84 patrones espiligotipos, incluyendo 20 patrones huérfanos; y el estudio de Cerezo y colaboradores evidenció 43 patrones espiligotipo, vale la pena destacar que esos estudios fueron realizados en población general y no en poblaciones cerradas como lo son las poblaciones indígenas, que en Puerto Nariño por ser zona fronteriza tienen más contacto con la población Peruana y Brasileira que con la población colombiana. Los estudios realizados en Brasil muestran similitudes de los sublinajes. Basta y colaboradores en 2006 muestran que las cepas de *M. tuberculosis* circulantes en el pueblo Suruí, pertenecen todas al genotipo LAM (Basta, Oelemann, Oelemann, de Souza, & Coimbra Jr, 2006), mientras que el estudio realizado en Minas Gerais, Brasil en 2004 muestra que el 55,3% de aislados clínicos pertenecen al sub-linaje LAM, 10,5% pertenecen al sub-linaje T y el 7% al sub-linaje Haarlem, aunque es importante destacar que en dicho estudio se consideró a la población general y no solo a indígenas (Spíndola de Miranda, y otros, 2011).

En este estudio encontramos que dentro del sub-linaje LAM destaca la familia LAM6-SIT95 con el 51,4% del total de aislados clínicos obtenidos. En la revisión de literatura no se

encontró reporte alguno de este genotipo en Colombia, sin embargo en la población de estudio es el clon circulante más frecuente. No obstante, este genotipo sí ha sido reportado en Perú por Taype y colaboradores en el año 2012, en 5/323 (1,55%) aislados clínicos de pacientes con TB pulmonar recolectados en centros médicos de Lima entre 2004 y 2006 (Taype, y otros, 2012). Otro estudio que analizó 794 aislados clínicos provenientes de 4 estudios previos en Lima-Perú entre 1999 y 2005 demostró la presencia de la familia LAM6-SIT95, en un 0,25% (Sheen, y otros, 2013). El mismo comportamiento se observó en estudios realizados en Brasil donde se ha encontrado la familia LAM6-SIT95 en baja proporción. Spíndola de Miranda y colaboradores, estudiaron 114 aislados clínicos obtenidos en la Unidad de Salud de Minas Gerais en el año 2004, encontraron un porcentaje de 1,8% de aislados clínicos pertenecientes a LAM6-SIT95 (Spíndola de Miranda, y otros, 2011).

En Colombia el genotipo LAM9-SIT42 es el de mayor circulación, como se ha evidenciado en estudios previos realizados en el país por Realpe y colaboradores, Puerto y col, Cerezo y col, que reportaron este genotipo en 29,9%, 24.7% y 27.6% respectivamente (Realpe, y otros, 2014), (Puerto, y otros, 2015), (Cerezo, y otros, 2012). Además en el estudio realizado por Puerto, D. que caracterizó exclusivamente aislados clínicos de *M. tuberculosis* en población indígena del país (periodo 2009-2014) se encontró 33/234 (14,1%) genotipos LAM9-SIT42, aunque ninguno de ellos pertenecientes a pacientes del departamento de Amazonas (Puerto D., 2016). En el presente estudio este genotipo tuvo baja representación, con solo un 3% de los aislados obtenidos, lo que podría ser explicado por el poco contacto que tienen los indígenas de Puerto Nariño con la población general colombiana, al habitar una región geográfica muy alejada de las grandes ciudades colombianas.

La familia T2 encontrada, perteneciente al sub-linaje T, presentó dos diferentes SITs: 392 y 1355. No se tiene registro de reporte del SIT 392 en los diferentes estudios realizados en Colombia y el SIT 1355 se encontró, en un estudio descriptivo retrospectivo realizado por Puerto, D. que caracterizó molecularmente 234 aislados clínicos obtenidos de población indígena en Colombia durante el periodo 2009-2014, detectando un caso (0,4%) en un indígena Ticuna, también de Amazonas (Puerto D., 2016). Sin embargo, sí se tienen reportes de ambos genotipos (SIT 392 y 1355) en estudios realizados en Brasil y Perú; en Perú Taype y colaboradores y Sheen y colaboradores, determinaron la presencia de la

familia T2-SIT 1355 en un 4,33% y 3,02%, respectivamente. (Taype, y otros, 2012) (Sheen, y otros, 2013): en Brasil, Dalla Costa y colaboradores, en un estudio de 237 aislados clínicos de diferentes pacientes entre el año 2004 y 2006 en Porto Alegre, Brasil, encontró un aislado clínico (0,42%) perteneciente a la familia T2-SIT 392 aunque no se especifica si el aislado clínico correspondió a un paciente perteneciente a población indígena (Dalla Costa, y otros, 2013). De acuerdo a la base de datos SpolDB4, el espoligotipo T2-SIT 1355 se ha reportado en Italia (55,56%), Estados Unidos (33,33%), y en Latinoamérica solo en Argentina y Perú (5,56% cada uno). La base de datos SpolDB4 indica el reporte de 5 cepas SIT 392, 4 de las cuales se encontraron en Brasil (80%) y una en Argentina (20%).

Es importante destacar que el estudio realizado por Puerto, D es el primero que aborda población indígena en Colombia (Puerto D., 2016) durante los años 2009-2014. El SIT con mayor representación en dicho estudio (14,1%), LAM9-SIT 42, tiene baja representación en este estudio (3%): mientras que T2-SIT 1355 tiene baja representación en el estudio de Puerto, D (0,4%), sin embargo en el presente estudio 14/74 (18,9%) aislados clínicos pertenecían al genotipo T2-SIT 1355 indicando la posibilidad de que dicho genotipo se encuentre circulando en población de la Amazonía Colombiana

La tipificación por MIRU-VNTR de 24 loci, permitió la identificación de infección policlonal en 2 pacientes que cohabitaban en la misma comunidad (Atacuari), indicando la importancia del uso de esta metodología para detección de infecciones causadas por dos o más genotipos diferentes de *M. tuberculosis*. En varios estudios se ha demostrado la utilidad clínica de la técnica MIRU-VNTR, no solo para la tipificación molecular sino también para ajustar tratamientos clínicos debido a la heterogeneidad que puede presentar la población micobacteriana dentro del huésped (Shamputa, y otros, 2006) (Braden, y otros, 2001).

Aunque se determinó un mayor número de genotipos por MIRU (14), que incluyeron 8 patrones únicos, se observa una baja diversidad genómica, debida a que estas comunidades son cerradas. La combinación de las técnicas de tipificación empleadas elevó el número de genotipos a 19 incluyendo 11 patrones únicos. El índice discriminatorio Hunter-Gaston para la combinación de las metodologías empleadas fue de 0,855. Esta baja diversidad sugiere que probablemente los clones de *M. tuberculosis* circulantes en las comunidades indígenas en Puerto Nariño se han mantenido a lo largo del tiempo debido

al deficiente control de la enfermedad, por lo que se han diseminado debido a la interacción de sus pobladores, puesto que la organización social se basa en el matrimonio entre alianzas exogámicas (tribus) dentro del pueblo Ticuna. (Molina Echeverri & Herrera Noboa, s.f.). Los análisis de agrupamiento determinaron que 59 aislados formaron 8 clusters, y de ellos 40/59 (67.79%) pertenecían a individuos que convivían bajo el mismo techo, o en la misma comunidad, indicando posibles cadenas activas de transmisión.

Un solo aislado (1,4%) proveniente de un menor presentó resistencia a los fármacos de primera línea rifampicina e isoniazida, definiéndose como tuberculosis multi-drogo-resistente (TB-MDR). Un factor importante en el manejo de la actual epidemia de TB-MDR es la transmisión directa de cepas MDR lo que ocasiona gran cantidad de pacientes nuevos con TB-MDR. La presencia de aislados clínicos MDR se convierte es un desafío para el control de la tuberculosis y se requiere un rápido diagnóstico e iniciación de tratamiento adecuado para evitar la propagación de estas cepas (Dominguez, y otros, 2016). En el caso presentado en el estudio el paciente nunca había recibido diagnóstico o tratamiento previo para tuberculosis, hallazgo diferente a otros estudios que muestran mayor número de casos MDR en pacientes previamente tratados (Culqui, y otros, 2010), sin embargo, la comparación no es posible debida al bajo número de aislados MDR detectados en el presente estudio. Además las mutaciones encontradas en el aislado clínico MDR, son las más frecuentes descritas en el país, de acuerdo al estudio realizado por Llerena y Medina que utilizó el kit comercial GenoType® MTBDRplus 2.0 a partir de 837 muestras (670 aislados clínicos y 167 muestras de esputo). En 60 muestras que presentaron resistencia a rifampicina la mutación más frecuente (36,6%) fue Ser531Leu, mientras que en 98 muestras con resistencia a isoniazida la mutación Ser315Thr1 fue la más frecuente (91,9%) (Llerena & Medina, 2017).

8 Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

- Se encontró una alta prevalencia de tuberculosis activa en la población de estudio, 48,6 veces mayor que la encontrada en la población general de Colombia que para el año 2015 fue de 26,8 casos/100.000 habitantes.
- El grupo etario con mayor número de casos diagnosticados estuvo entre los 5 – 9 años (17,1%) y la mitad de casos se encontró en individuos menores de 19 años, indicando gran cantidad de casos en población infantil.
- Todos los casos fueron causados por *Mycobacterium tuberculosis*
- Aunque en este estudio se determinó la presencia de dos sub-linajes encontrados en estudios previos colombianos (LAM y T), no se encontró el sub-linaje Haarlem, de gran prevalencia en Colombia.
- La alta proporción de casos agrupados 40/59 (69,8%), puede indicar una cadena de transmisión activa, pues los pacientes conviven en las mismas casas y/o comunidades. Sin embargo en los casos restantes (19/59) tampoco se descarta una posible transmisión activa puesto que los habitantes de todas las comunidades tienen alta convivencia entre ellos.
- Se confirmó 10 casos de transmisión activa reciente en 4 hogares en las comunidades de San Francisco (n=3), Ticoya (n=2 y n=3) y Puerto Nariño (n=2).
- La combinación de las técnicas de genotipificación molecular permitió determinar 2 casos de infección mixta. Los individuos que poseen la infección mixta comparten un mismo clúster y conviven en la misma comunidad.
- Se determinó la presencia de 1 caso de TB-MDR confirmado por métodos fenotípicos y genotípicos. Las mutaciones que confieren resistencia a isoniazida y rifampicina se encuentran en los genes *katG* (Ser315Thr) y *rpoB* (Ser531Leu), respectivamente.
- Este estudio intervino a toda la población del Municipio de Puerto Nariño.

8.2 Recomendaciones

- Se muestra la necesidad de implementar una búsqueda activa de sintomáticos respiratorios en población indígena, pues sin esta búsqueda muchos casos de TB activa son ignorados.
- En este tipo de población debe re-evaluarse la definición de sintomático respiratorio, ya que este estudio evidenció casos de TB activa en individuos con o sin expectoración de cualquier tiempo de duración
- Se debe garantizar la realización de cultivos, normado en la circular 058 de 2013, para población vulnerable puesto que el cultivo posee mayor sensibilidad diagnóstica que la baciloscopia. Además el cultivo permite la realización de pruebas moleculares como genotipificación, importante para esclarecer cadenas de transmisión activa o reinfecciones exógenas en población vulnerable.
- Los programas nacionales de tuberculosis deben contemplar la atención diferencial a poblaciones específicas, como población indígena ya que sus dinámicas y cosmovisión varían respecto a la población general.
- La gran cantidad de casos hallados en población infantil muestra la necesidad de mejorar los estudios de contactos, incluyendo contactos escolares.
- Considerar la toma de esputo inducido como una posibilidad para el diagnóstico de tuberculosis activa en menores y adultos que no expectoren, ya que en el presente estudio tuvo buen rendimiento.
- Continuar con investigaciones operativas en poblaciones específicas, ya que en el país existe, en general, un desconocimiento de la enfermedad tuberculosa así como de la dinámica de transmisión en estas poblaciones vulnerables

9. Bibliografía

- Ardito, F., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Zanetti, S., & Fadda, G. (2001). Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4440-4444. doi:10.1128/JCM.39.12.4440-4444.2001
- Arenas-Suárez, N., García-Gutiérrez, A., Coronado-Ríos, S., Beltrán- Bocanegra, C., Acosta-Botero, S., Gómez-Marín, J., & Quintero-Álvarez, L. (2010). Prevalencia de tuberculosis infantil en Armenia, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 12(6), 1000-1009.
- Arnold, C. (2007). Molecular evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 120-128. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01637.x
- Bartek, I., Rutherford, R., Gruppo, V., Morton, R., Morris, R., Klein, M., . . . Voskuil, M. (2009). The DosR regulon of M. tuberculosis an antibacterial tolerance. *Tuberculosis*, 89(4), 310-316. doi:10.1016/j.tube.2009.06.001.
- Basta, P. C., Oelemann, M., Oelemann, W., de Souza, L., & Coimbra Jr, C. (2006). Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum from Suruí Indian subjects, Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(6), 581-584.
- Basta, P., Coimbra Junior, C., Escobar, A., & Ventura Santos, R. (2004). Aspectos epidemiológicos da tuberculose na população indígena Suruí, Amazônia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(4), 338-342.
- Bifani , P., Moghazeh, S., Shopsis, B., Driscoll, J., Ravikovitch, A., & Kreiswirth, B. (2000). Molecular Characterization of Mycobacterium tuberculosis H37Rv/Ra Variants: Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3200-3204.
- Braden, C., Morlock, G., Woodley, C., Johnson, K., Colombel, A., Cave, M., . . . Crawford, J. (2001). Simultaneous infection with multiple strains of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 42-47.
- Brennan, P. (2003). Structure, function and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 83, 91-97. doi:10.1016/S1472-9792(02)00089-6
- Brennan, P., & Nikaido, H. (1995). The envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 29-63. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333
- Brites, D., & Gagneux, S. (2015). Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunological Reviews*, 264, 6-24.
- Brudey, K., Driscoll, J., Rigouts, Prodinger, W., Gori, A., Al-Hajoj, . . . Gazzola. (2006). Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth

- international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*, 6(23).
- Canetti, G., Froman, S., Grosset, J., Hauduroy, P., Langerová, M., Mahler, H. T., . . . Šula, L. (1963). Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, 29(5), 565-578.
- Cardona-Arias, J., & Hernández-Petro, A. (2013). Conocimientos, actitudes y prácticas sobre tuberculosis en indígenas zenúes y habitantes de una zona rural colombiana. *Revista Ciencias de la Salud*, 11(2), 157-171.
- Cerezo, I., Jiménez, Y., Hernandez, J., Zozio, T., Murcia, M., & Rastogi, N. (2012). A first insight on the population structure of Mycobacterium tuberculosis complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 657-663.
- Coimbra Jr, C., & Basta, P. (2007). The burden of tuberculosis in indigenous peoples in Amazonia, Brazil. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 635-636.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., . . . Barrell, B. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 537-544.
- Comas, I., Chakravarti, J., Small, P., Galagan, J., Niemann, S., Kremer, K., . . . Gagneux, S. (2010). Human T cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis are evolutionarily hyperconserved. *Nature Genetics*, 42, 498-503. doi:10.1038/ng.590
- Coscolla, M., & Gagneux, S. (2014). Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Seminars in Immunology*, 431-444. doi:dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.012
- Coscolla, M., Lewin, A., Metzger, S., Calvignac-Spencer, S., Nitsche, A., Radonic, A., . . . Gagneux, S. (2013). Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Isolate from a Wild Chimpanzee. *Emerging Infectious Diseases*, 19(6), 969-976.
- Culqui, D. R., Trujillo, O. V., Cueva, N., Aylas, R., Salaverry, O., & Bonilla, C. (2010). Tuberculosis en la población indígena del Perú 2008. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27(1), 8-15.
- Culqui, D., Zavaleta, C., Romero, J., Bonilla, C., Trujillo, O., & Cueva, N. (2009). Tuberculosis en poblaciones indígenas del Perú: Los Aimaras del Perú, 2000-2005. *Revista Peruana de Epidemiología*, 13(1).
- Dalla Costa, E., Oliveira Lazzarini, L., Perizzolo, P., Acosta, C., Spies, F., Laux Costa, L., . . . Rossetti, M. (2013). Mycobacterium tuberculosis of the RDRio Genotype Is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1071-1077. doi:10.1128/JCM.01511-12

- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*.
- Deshpande, A., Gans, J., Grave, S., Green, L., Taylor, L., Bok Kim, H., . . . White, P. (2009). A rapid multiplex assay for nucleic acid-based diagnostics. *Journal of Microbiological Methods*, 155-163.
- Dominguez, J., Boettger, E., Cirillo, D., Cobelens, F., Eisenach, K., Gagneux, S., . . . Lange, C. (2016). Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(1), 24-42.
- El-Hajj, H., Marras, S., Tyagi, S., Kramer, F., & Alland, D. (2001). Detection of Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis in a Single Tube with Molecular Beacons. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4131-4137. doi:10.1128/JCM.39.11.4131-4137.2001
- Frothingham, R., & Meeker-O'Connell, W. A. (1998). Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 144, 1189-1196. doi:10.1099/00221287-144-5-1189
- García, C. (2008). Tuberculosis en grupos de riesgo en la Región Metropolitana. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 105-111.
- Garrigó, M., Aragón, L., Alcaide, F., Borrell, S., Cardeñosa, E., Galán, J., . . . Coll, P. (2007). Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45(6), 1766-1770. doi:10.1128/JCM.02162-06
- Gordon, S., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., & Cole, S. (1999). Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular Microbiology*, 643-655.
- Groenen, P., Bunschot, A., van Soolingen, D., & van Embden, J. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*, 1057-1065.
- Guerra, J. (2016). *Situación de la Tuberculosis en la Población Privada De La Libertad (PPL) interna en el establecimiento penitenciario y carcelario La Esperanza del Municipio de Guaduas – Cundinamarca (Tesis de maestría)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Hampshire, T., Soneji, S., Bacon, J., James, B., Laing, K., Richard, A., & Butcher, P. (2004). Stationary phase gene expression of Mycobacterium tuberculosis following

a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms? *Tuberculosis*, 84, 228-238.

- Hermans, P., van Soolingen, D., Bik, E., de Haas, P., Dale, J., & van Embden, J. (1991). Insertion Element IS987 from Mycobacterium bovis BCG Is Located in a Hot-Spot Integration Region for Insertion Elements in Mycobacterium tuberculosis Complex Strains. *Infection and Immunity*, 59(8), 2695-2705. doi:0019-9567/91/082695-11\$02.00/0
- Hernández Sarmiento, J., Dávila Osorio, V., Martínez Sánchez, L., Restrepo Serna, L., Grajales Ospina, D., Toro Montoya, A., . . . Robledo, J. (2013). Tuberculosis in Indigenous Communities of Antioquia, Colombia: Epidemiology and Beliefs. *Journal of Immigrant and Minority Health*, 15(1), 10-16. doi:DOI 10.1007/s10903-012-9688-1
- Herrera, T. (2015). Grupos de riesgo para tuberculosis en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 15-18.
- Hillemann, D., Rüsck-Gerdes, S., & Richter, E. (2007). Evaluation of the GenoType MTBDRplus Assay for Rifampin and Isoniazid Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis Strains and Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2635-2640. doi:10.1128/JCM.00521-07
- Instituto Nacional de Salud. (11 de junio de 2014). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. *Tuberculosis*. Colombia.
- Instituto Nacional de Salud. (2016). *Informe Evento. Tuberculosis*. Bogotá.
- Instituto Nacional de Salud SIVIGILA. (2015). *Informe final del evento tuberculosis, Colombia, 2015*. Informe evento, Instituto Nacional de Salud.
- Jagielski, T., van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J., Mazur, P., & Bielecki, J. (2014). Current Methods in the Molecular Typing of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2014/645802
- Johnson, R., Streicher, E., Louw, G., Warren, R., van Helden, P., & Victor, T. (2006). Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(2), 97-111.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., . . . Goyal, M. (1997). Simultaneous Detection and Strain Differentiation of Mycobacterium tuberculosis for Diagnosis and Epidemiology. *Journal Of Clinical Microbiology*, 35(4), 907-914.
- Karginov, F. V., & Hannon, G. (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.033

- Kochi, A. (1991). The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*, 72.
- Korzeniewska, M., Krysl, J., Müller, N., Allen, E., & FitzGerald, M. (1993). Tuberculosis in Young Adults and the Elderly. *Chest*, 28-32.
- Lamrabet, O., & Drancourt, M. (2012). Genetic engineering of Mycobacterium tuberculosis: A review. *Tuberculosis*, 365-376.
- Llerena, C., & Medina, R. (2017). Descripción de las mutaciones de Mycobacterium tuberculosis que confieren resistencia a rifampicina e isoniazida detectadas mediante GenoType® MTBDRplus V.2 en Colombia. *Biomédica*, 37, 28-33. doi:<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3174>
- Maes, M., Kremer, K., van Soolingen, D., Takiff, H., & de Waard, J. (2008). 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis*, 490-494.
- Mahairas, G., Sabo, P., Hickey, M. J., Singh, D., & Stover, C. (1996). Molecular Analysis of Genetic Differences between Mycobacterium bovis BCG and Virulent M.bovis. *Journal of Bacteriology*, 178(5), 1274-1282.
- Mahillon, J., & Chandler, M. (1998). Insertion Sequences. (A. S. Microbiology, Ed.) *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 62(3), 725-774.
- Makarova, K., Haft, D., Barrangou, R., Brouns, S., Charpentier, E., Horvath, P., . . . Koonin, E. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas System. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 467-477. doi:[doi:10.1038/nrmicro2577](https://doi.org/10.1038/nrmicro2577)
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., . . . Supply, P. (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1901-1906. doi:[10.1073/pnas.98.4.1901](https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1901)
- Molina Echeverri, H., & Herrera Noboa, B. (s.f.). *Ministerio del Interior*. Recuperado el 17 de Septiembre de 2017, de Dirección de Asuntos Indígenas, Rom y Minorías: http://siic.mininterior.gov.co/sites/default/files/upload/SIIC/PueblosIndigenas/Caracterizaciones/pueblo_tikuna.pdf
- Montenegro, R., & Stephens, C. (3 de Junio de 2006). Indigenous Health 2. Indigenous health in Latin America and the Caribbean. *Lancet*, 367, 1859-1869.
- Montenegro, R., & Stephens, C. (2006). Indigenous health in Latin America and the Caribbean. *Lancet*, 367, 1859-1869.
- Mostowya, S., & Behr, M. (2005). The Origin and Evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Clinics In Chest Medicine*, 26(2), 207-216.

- MPS, INS, & OPS. (2009). *Plan Estratégico Colombia Libre de Tuberculosis 2010-2015. Para la Expansión y Fortalecimiento de la Estrategia Alto a la TB.*
- MPS, INS, ACDI, OPS, OMS. (2007). *Experiencia en Colombia de la Estrategia DOTS/TAS para el manejo de la tuberculosis en pueblos indígenas ubicados en los departamentos del Amazonas, Cesar, Nariño, Guainia, Guaviare, la Guajira y Vichada.* Arao Taller Creativo.
- Mukhopadhyay, S., & Narayanaswamy, K. (2011). The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 441-447.
- Municipio de Puerto Nariño-Amazonas. (2012). *Plan de Desarrollo Municipal 2012-2015.* Puerto Nariño.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2006). *Microbiología Médica* (Quinta ed.). Madrid, España: Elsevier.
- Niemann, S., Merker, M., Kohl, T., & Supply, P. (2016). Impact of Genetic Diversity on the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Microbiology Spectrum*. doi:doi:10.1128/microbiolspec.TBTB2-0022-2016
- Niemann, S., Richter, E., & Rüsç-Gerdes, S. (1999). Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns and Spoligotypes Determined by Analyzing Serial Isolates from Patients with Drug-Resistant Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 409-412.
- O'Garra, A., Redford, P., McNab, F., Bloom, C., Wilkinson, R., & Berry, M. (2013). The Immune Response in Tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31, 475-527. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095939
- Organización Panamericana de la Salud. (2004). *Encuentro Regional para el Análisis del Acceso a Tratamiento Anti-Tuberculoso en Poblaciones Indígenas.* Documento memoria, Ciudad de Panamá.
- Pawelczyk, J., & Kremer, L. (Agosto de 2014). The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. *Microbiology Spectrum*, 2(4). doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0003-2013
- Puerto, D. (2016). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* CAUSANTE DE ENFERMEDAD ACTIVA EN PUEBLOS INDÍGENAS DE COLOMBIA (tesis de maestría). *Universidad Nacional de Colombia*. Bogotá, Colombia.
- Puerto, G., Erazo, L., Wintaco, M., Castro, C., Ribón, W., & Inírida Guerrero, M. (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. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0124308

- Rachow, A., Zumla, A., Heinrich, N., Rojas-Ponce, G., Mtafya, B., Reither, K., . . . Hoelscher, M. (2011). Rapid and Accurate Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum Samples by Cepheid Xpert MTB/RIF Assay—A Clinical Validation Study. *PlosOne*, 6(6). doi:10.1371/journal.pone.0020458
- Realpe, T., Correa, N., Rozo, J., Ferro, B., Gomez, V., Zapata, E., . . . Robledo, J. (2014). Population Structure among Mycobacterium tuberculosis Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Colombia. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0093848
- Renshaw, P., Panagiotidou, P., Whelan, A., Gordon, S. V., Williamson, R., & Carr, M. (2002). Conclusive Evidence That the Major T-cell Antigens of the M. tuberculosis Complex ESAT-6 and CFP-10 Form a Tight, 1:1 Complex and Characterization of the Structural Properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6 CFP-10 Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 21598-21603.
- Roberts, G., Goodman, N., Heifets, L., Larsh, H., Lindner, T., McClatchy, J., . . . Wright, P. (1983). Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from acid-fast smear-positive specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 18(3), 689-696.
- Romero García, L., Gondres, K., Paez Candelaria, Y., Bacardí, P., & Jones Romero, O. (2016). Factores de riesgo asociados a la tuberculosis en Santiago de Cuba durante el quinquenio 2007-2011. *Scielo*.
- Romero-Sandoval, N., Flores-Carrera, O., Sánchez-Pérez, H., Sánchez-Pérez, I., & Mateo, M. (2007). Pulmonary tuberculosis in a indigenous community in the mountains of Ecuador. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 11(5), 550-555.
- Sanchez, A., Gerhardt, G., Natal, S., Capone, D., Espinola, A., Costa, W., . . . Larouzé, B. (2005). Prevalence of pulmonary tuberculosis and comparative evaluation of screening strategies in a Brazilian prison. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9(6), 633-639.
- Schaaf, H. S., Michaelis, I. A., Richardson, M., Booyesen, C. N., Gie, R. P., Warren, R., . . . Beyers, N. (2003). Adult-to-child transmission of tuberculosis: household or community contact? *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7(5), 426-431.
- Shamputa, I., Jugheli, L., Sadradze, N., Willery, N., Portaels, P., Supply, F., & Rigouts, L. (2006). Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *BioMed Central*, 7(99).
- Sheen, P., Couvin, D., Grandjean, L., Zimic, M., Dominguez, M., Luna, G., . . . Moore, D. (2013). Genetic Diversity of Mycobacterium tuberculosis in Peru and Exploration

- of Phylogenetic Associations with Drug Resistance. *PLoS ONE*, 8(6). doi:10.1371/journal.pone.0065873
- Sousa, A., Salem, J., Lee, F., Vercosa, M., Cruaud, P., Bloom, B., . . . David, H. (1997). An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13227-13232.
- Spíndola de Miranda, S., da Silva Carvalho, W., Suffys, P., Lineu Kritski, A., Oliveira, M., Zarate, N., . . . Gicquel, B. (2011). Spoligotyping of clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 267-273.
- Stucki, D., Malla, B., Hostettler, S., Huna, T., Feldmann, J., Yeboah-Manu, D., . . . Gagneux, S. (2012). Two New Rapid SNP-Typing Methods for Classifying Mycobacterium tuberculosis Complex into the Main Phylogenetic Lineages. *PLoS ONE*, 7(7). doi:10.1371/journal.pone.0041253
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsck-Gerdes, S., Willery, E., . . . van Soolingen, D. (2006). Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4498-4510.
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., & Locht, C. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology*, 26(5), 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. *Molecular Microbiology*, 36(3), 762-771.
- Tanaka, M., & Francis, A. (2004). Methods of quantifying and visualising outbreaks of tuberculosis using genotypic information. *Infection, Genetics and Evolution*, 35-43. doi:10.1016/j.meegid.2004.06.001
- Taype, C., Agapito, J., Accinelli, R., Espinoza, J., Godreuil, S., Goodman, S., . . . Shaw, M. (2012). Genetic diversity, population structure and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in Peru. *Infection, Genetics and Evolution*, 577-585.
- Thierry, D., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Crawford, J., Bates, J. H., Gicquel, B., & Guesdon, L. (1990). IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex. *Nucleic Acids Research*, 18(1), 188.

- Tollefson, D., Bloss, E., Fanning, A., Redd, J., Barker, K., & McCray, E. (2013). Burden of tuberculosis in indigenous peoples globally: a systematic review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 1139-1150.
- van Soolingen, D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*, 1-26.
- Vázquez, J., & Berrón, S. (2004). Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(2), 113-119. doi:10.1016/S0213-005X(04)73045-1
- Voskuil, M., Visconti, K., & Schoolnik, G. (2004). Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis*, 84, 218-227. doi:10.1016/j.tube.2004.01.002
- Wayne, L., & Sohaskey, C. (2001). Nonreplicating Persistence of Mycobacterium Tuberculosis. *Annual Review of Microbiology*, 55, 139-163.
- World Health Organization . (2006). *The Stop TB Strategy*. World Health Organization .
- World Health Organization. (2011). Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational 'How-to'; practical considerations. *Rapid Implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test*.
- World Health Organization. (2014). *The End TB Strategy*.
- World Health Organization. (2016). *Global Tuberculosis Report 2016*.
- World Health Organization. (2017). *Global Tuberculosis Report*.
- Zhang, Y., & Yew, W. (2009). Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(11), 1320-1330.

A. Anexo 1: Genotipificación molecular por Spoligotyping

- Se obtuvo ADN de cada muestra mediante extracción por GenoLyse® (Hain Lifescience, Germany)
- Se realizó la amplificación mediante PCR. Para la amplificación del locus DR se utilizó el kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen), los primers utilizados están dirigidos al locus DR y fueron suministrados por la misma casa comercial fabricante de la membrana (Mapmygenome India Limited). Las siguientes tablas muestran la mezcla pre-PCR y los ciclos térmicos utilizados para la PCR del locus DR, respectivamente. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad C1000.

Tabla 9. Mix pre-PCR para amplificación del locus DR

Reactivo	Concentración final	Volumen (1X)
Agua MQ		14,2 µl
Buffer	10 X	2,5 µl
Primer DRa	20 pmol	2 µl
Primer DRb	20 pmol	2 µl
dNTPs	2,5 mM	2 µl
Cloruro de magnesio	1,5 mM	0,75 µl
Taq Polimerasa	0,04 U/ul	0,05 µl
ADN aislado clínico		1,5 µl
TOTAL		25 µl

Tabla 10. Ciclos térmicos para PCR del locus DR.

Temperatura y tiempo	Número de ciclos
96°C por 3 minutos	1 X
96°C por 1 minuto	30 X
55°C por 1 minuto	
72°C por 30 segundos	
72°C por 5 minutos	1 X (Extensión final)

- Para la hibridación de los productos de amplificación se agregó 150 μ L de buffer 2xSSPE/0.1% SDS a cada producto de PCR, se elevó la temperatura a 99°C por 10 minutos en el termociclador C100 (Bio-Rad) e inmediatamente se enfrió en hielo.
- Durante el lapso de 10 minutos del paso anterior se realizó el lavado de la membrana con 250 ml de buffer 2xSSPE/0.1%SDS durante 5 minutos a 60°C y posteriormente la membrana se ubicó sobre una cámara miniblitter con su respectiva cubierta, de forma que se separen independientemente 45 canales que contienen los 43 oligonucleótidos inmovilizados.
- Con la ayuda de una bomba de vacío se aspiró todos los canales del miniblitter para eliminar los residuos de buffer que están presentes en la membrana.
- Se sembró aproximadamente 150 μ l del producto de PCR en cada canal formado en la membrana, evitando la formación de burbujas. Como control negativo se empleó buffer 2xSSPE/0.1% SDS, que se sembró en los canales 1 y 45, y como control positivo se utilizó DNA de la cepa de referencia H37Rv, que se colocó en el segundo canal. La cámara miniblitter se colocó en un horno de hibridación durante una hora a 60°C en una superficie completamente horizontal.
- Por aspiración con una bomba de vacío, se retiró la solución de cada canal y se retiró la membrana del miniblitter con la ayuda de pinzas, evitando manipular la membrana con las manos.
- La membrana se lavó con 250 ml de buffer 2xSSPE/0.5% SDS por 10 minutos a 60°C dos veces en un horno con agitación.

- 2.5 μ L de conjugado streptavidin-peroxidase (500U/ml) se añadió a 10 mL de buffer 2xSSPE/0.5% SDS y esta mezcla se incubó con la membrana durante 45 minutos a 42°C.
- La membrana se lavó 2 veces con 250 mL de buffer 2xSSPE/0.5% SDS por 10 minutos a 42°C y posteriormente 2 veces con 250 mL de 2xSSPE durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- La detección por quimioluminiscencia se realizó utilizando el kit ECL Pierce™ Fast Western Blot (Thermo Fisher Scientific) incubando 10 ml del substrato con la membrana por 40 segundos.
- Se expuso la membrana a una película sensible CL-XPosure™ (Thermo Fisher Scientific) por 5 minutos y se reveló mediante el equipo de revelado.
- La membrana puede ser regenerada por la disociación de los productos de PCR hibridados. Se lava la membrana dos veces con SDS 1% a 80°C durante 30 minutos cada una. Posteriormente se lava la membrana en EDTA 20mM pH 8 durante 15 minutos a temperatura ambiente y se guarda la membrana en un recipiente con EDTA 20mM pH8 a 4°C para evitar la deshidratación de la membrana. La membrana puede ser reutilizada aproximadamente 5 veces.
- La lectura de la membrana se realiza observando y registrando la presencia o ausencia de hibridación con un código binario 1 o 0, respectivamente
- Unas consideraciones importantes en el ensayo:
 - Los primers deben ser almacenados en pequeñas alícuotas. Los continuos cambios de temperatura afecta el primer biotinilado y puede causar patrones de spoligotyping débiles.
 - Los buffers SDS deben ser frescos, preferiblemente no tener una fecha de preparación mayor a una semana.
 - Puede ser necesario modificar los tiempos de exposición y revelado si se utiliza diferente reactivo ECL o películas sensibles. Revisar las recomendaciones del fabricante.

B. Anexo 2: Genotipificación por MIRU-VNTR de 24 loci

- Se realizó la extracción de ADN de cada muestra utilizando el kit GenoLyse® (Hain Lifescience, Germany).
- La mezcla pre-PCR se realizó utilizando el kit HotStartTaq™ DNA polymerase (Qiagen, Germany) para un volumen final de 10 µl con la siguiente composición:

Tabla 11. Mix pre-PCR para amplificación de los 24 loci MIRUs

MIRU	26, 40, 47, 52	4	53	10, 16, 31, 46, 48, 49	20, 24, 27, 42, 43, ETR-A	QUB-11b, 1955, QUB-26	2, 23, 39
Concentración MgCl ₂	3mM	3mM	3mM	2mM	1,5 Mm	1,5 Mm	2,5mM
H ₂ O	4,3	3,0	2,0	4,7	4,9	3,6	4,5
Buffer 10X	1	1	1	1	1	1	1
Q 5X	2	2	2	2	2	2	2
MgCl ₂ 25mM	0,6	0,6	0,6	0,2	0	0	0,4
dNTPs 5mM	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Primers	0,2	1,5	2,5	0,2	0,2	1,5	0,2
Taq	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Total mix	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
ADN	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Vol. Total	10	10	10	10	10	10	10

- La amplificación por PCR de cada uno de los 24 loci a caracterizar se realizó en un termociclador Bio-Rad C1000 con los siguientes ciclos térmicos:

Tabla 12. Ciclos térmicos para PCR de los 24 loci MIRUs

Temperatura y tiempo	Número de ciclos
95°C por 15 minutos	1 X
94°C por 1 minuto	30 X
59°C por 1 minuto	
72°C por 1,5 minutos	
72°C por 10 minutos	1 X (Extensión final)

- Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando UltraPure™ Low Melting Point Agarose (Invitrogen) durante 180 minutos a 120 V.
- La visualización se realizó mediante el equipo fotodocumentador de geles ChemiGenius Syngene y el software GeneSnap®. La determinación del peso molecular se realizó con el software GeneTools® versión 6.07.
- Una vez determinado el peso molecular de cada amplicón se utilizó la tabla de conversión peso molecular - número de copias presentes (anexo 3) para cada loci evaluado.
- Se realizó el registro en una base de datos de Microsoft® Excel para los análisis posteriores.

C. Anexo 3. Correspondencia entre peso molecular y número de copias en cada loci

Tabla 13. Correspondencia entre peso molecular y copias de loci

Repeticiones	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40	WVTR42 (MIRU04)	WVTR43 (ETRC)	1955	QUB-11b	ETRA	Mtub 29 (WVTR46)	Mtub 30 (WVTR47)	WVTR48 (ETRB)	Mtub 34 (WVTR49)	Mtub 39 (WVTR52)	QUB-26 (WVTR53)	QUB-4156	
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354	537	171	116	67	195	335	252	347	326	272	153	563	
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408	588	208	149	136	270	392	305	404	380	330	264	622	
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462	639	266	206	205	345	449	363	461	434	388	375	681	
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516	690	324	263	274	420	506	421	518	488	446	486	740	
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570	741	382	320	343	495	563	479	575	542	504	597	799	
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624	792	440	377	412	570	620	537	632	596	562	708	858	
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678	843	498	434	481	645	677	595	689	650	620	819	917	
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732	894	556	481	550	720	734	653	746	704	678	930	976	
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786	945	614	548	619	795	791	711	803	758	736	1041	1035	
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840	996	672	605	688	870	848	769	860	812	794	1152	1094	
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894	1047	730	662	757	945	905	827	917	866	862	1263	1153	
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948	1098	788	719	826	1020	962	885	974	920	910	1374	1212	
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002	1149	846	776	895	1095	1019	943	1031	974	968	1485	1271	
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056	1200	904	833	964	1170	1076	1001	1088	1028	1026	1596	1330	
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110	1251	962	890	1033	1245	1133	1059	1145	1082	1084	1707	1389	
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164	1302	1020	947	1102	1320	1190	1117	1202	1136	1142	1818	1448	

Se muestra resultado en color azul las repeticiones que corresponden a la cepa control *M. tuberculosis* H37Rv.

D. Anexo 4. Prueba de susceptibilidad por método de proporciones múltiples

- Preparación de los medios de cultivo
 - Se realizó la preparación de las soluciones stock de cada uno de los antibióticos, utilizando agua destilada para la preparación de isoniazida, mientras que para rifampicina se utiliza metanol, utilizando en ambos casos la mínima cantidad posible para la disolución de los antibióticos. Para completar el volumen final se utilizó agua destilada. La concentración stock a preparar es 20000 ug/mL para la rifampicina y 10000 ug/mL para la isoniazida. Las soluciones stock pueden almacenarse durante 6 meses a -20°C y un año a -70°C
 - Las soluciones stock, una vez preparadas se esterilizan por filtración y se preparan alícuotas de 1 mL. en frascos estériles perfectamente rotulados con el nombre del antibiótico, concentración y fecha de preparación.
 - Posteriormente se prepara el medio L.J. en tubos, estériles tanto con antibióticos como sin antibióticos. Ambos medios de cultivo (con y sin antibiótico) deben prepararse simultáneamente en el mismo lote. La concentración del antibiótico en el medio de cultivo es: isoniazida 0,2 µg/ml y rifampicina 40 µg/ml.
 - Los medios preparados perfectamente rotulados se incuban durante 48 horas para descartar contaminación durante la preparación de dichos medios y posteriormente se almacenan a 4 °C durante un máximo de 2 meses.
- Inoculación e incubación
 - Mediante una espátula de madera estéril se recolecta aproximadamente 20 colonias de un cultivo puro de aproximadamente un mes de incubación y se deposita en un frasco de vidrio tapa rosca que contiene perlas de vidrio (diámetro aproximado 3 mm.) y agua destilada estéril.
 - Mezclar en vórtex por un tiempo aproximado de un minuto
 - Con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril se deposita la suspensión en otro tubo de vidrio estéril y mediante la adición de agua destilada se prepara una suspensión con una turbidez igual al patrón McFarland # 3.
 - A partir de esta suspensión se realizan 6 diluciones base 10 con agua destilada estéril, obteniéndose de esta manera diluciones 10^{-1} hasta 10^{-6}
 - Se transfiere 0,2 ml de la dilución 10^{-3} a dos tubos control (medio sin antibiótico) y a un tubo con cada antibiótico.

- Se realiza el mismo proceso con la dilución 10^{-5}
 - Se distribuye el inóculo por toda la superficie del medio de cultivo girando el tubo suavemente.
 - Los medios de cultivo son ubicados en una bandeja de incubación en posición horizontal y se incuban a 37°C con las tapas sueltas por 48 horas o hasta que se evapore el líquido.
 - Una vez evaporado se ajustan las tapas y se realiza la lectura a los 28 y 42 días.
- Interpretación y resultados
 - Es importante revisar los cultivos los primeros 2-3 días para comprobar la ausencia de contaminación
 - Después de las 3 semanas se examina los tubos inoculados. Si los tubos control no presentan crecimiento, se descarta el ensayo y se repite la prueba de sensibilidad.
 - Se realiza el recuento del número de colonias en los tubos control 10^{-3} y 10^{-6} . Se determina el número de colonias en dichas diluciones multiplicando por el factor de dilución y se calcula el promedio de colonias (existen dos tubos control para cada dilución)
 - Es necesario que se puedan contar el número de colonias en uno de los tubos control. Para esto el número de colonias debe estar en el rango de 50-200 colonias. La dilución que contenga este rango de colonias se utilizara para la lectura de crecimiento en los medios con antibiótico.
 - El porcentaje de resistencia se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de colonias, medio con antibiotico}}{\text{Número de colonias, medio control}} \times 100$$
 - Si existe crecimiento en el tubo control y no se observa crecimiento en los medios con antibióticos, se puede interpretar como sensible para el antibiótico ensayado.
 - Se considera resistente al antibiótico ensayado cuando el porcentaje de resistencia calculado es mayor al 1% en la concentración estudiada.
 - Es importante tomar en cuenta el desarrollo de microcolonias, las cuales se deberán contabilizar.

E. Anexo 5: Prueba de susceptibilidad por BACTEC™ MGIT™ SIRE

- Todos los aislados clínicos a evaluar se repican en medio LJ durante 4 semanas.
- A partir de este medio se realizan una dilución de acuerdo al patrón McFarland # 1 y a partir de esta dilución se realizan diluciones 1:5 y 1:100.
- Se utilizan 3 tubos MGIT™ los cuales se ordenan de la siguiente manera: CC (control de crecimiento), I (isoniazida) y R (rifampicina)
- Se adicionan 800 µl de suplemento SIRE a todos los tubos, adicionalmente se añade 100 µl de cada fármaco a su respectivo tubo.
- Se añade 500 µl de la dilución 1:5 a cada tubo marcado como S-I-R-E, y de la dilución 1:100 se añade 500 µl en el tubo control de crecimiento CC.
- Se ingresan los tubo en el equipo BACTEC™ MGIT™ 320 y se registra la información en el software del equipo, EpiCenter™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Se realiza el mismo procedimiento para una cepa de control H37Rv.
- El equipo determinará el crecimiento de acuerdo al consumo de oxígeno del medio de cultivo e informa como susceptible o resistente, y si existió alguna falla en el procesamiento informa como error, en cuyo caso es necesario repetir la prueba.

F. Anexo 6: Prueba de susceptibilidad por GenoType®MTBDR plus 2.0

- Se realiza la extracción de ADN de cada muestra con el kit GenoLyse® (Hain Lifescience, Germany).
- Se realiza una pre-mezcla de PCR con las soluciones de amplificación denominadas AM-A y AM-B, incluidos en el kit comercial, para un volumen final de 50 µl. AM-A contiene la polimerasa y AM.B contiene los iniciadores biotinilados. Estas mezclas incluyen todos los reactivos necesarios para la PCR. La composición fue la siguiente: 10 µl de solución AM-A, 35 µl de solución AM-B y 5 µl de ADN del aislado clínico.
- La amplificación por PCR se realizó en un equipo Bio-Rad C1000, con los siguientes ciclos térmicos:

Tabla 14. Ciclos térmicos para PCR de los genes a evaluar por GenoType®

Temperatura y tiempo	Número de ciclos
95°C por 15 minutos	1 X
95°C por 30 segundos	10 X
65°C por 2 minutos	
95°C por 25 segundos	20 X
50°C por 40 segundos	
70°C por 40 segundos	
70°C por 8 minutos	1 X (Extensión final)

- La hibridación de los productos de PCR se realizó con el equipo TwinCubator® Hain LifeScience, de acuerdo a instrucciones del fabricante.
- En una bandeja de 48 pocillos, se coloca en cada pocillo 20 µl de solución de desnaturalización DEN y 20 µl del producto de amplificación y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se añade a cada pocillo 1 ml de buffer de hibridación HYB, la cual esta precalentada a 45°C, se homogeniza y se añade la tira de nitrocelulosa. La tira de nitrocelulosa debe estar previamente marcada e identificada con la ayuda de un lápiz.

- Se incubó durante 30 minutos a 45°C en el equipo TwinCubator®.
- Se aspiró la solución y se añadió 1 ml de solución de lavado astringente STR incubando por 15 minutos a 45°C en el equipo TwinCubator®.
- Se eliminó completamente la solución astringente y se lavó a temperatura ambiente con 1 ml de solución de aclarado RIN durante 1 minuto y se descartó la solución.
- Se añadió la solución conjugado y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en el equipo TwinCubator® y se descartó la solución.
- Posterior a dos lavados con solución de aclarado RIN por un minuto y un lavado con agua destilada por un minuto se añade 1 ml de sustrato diluido y se incuba durante 8 minutos protegiendo las tiras de la luz.
- Se detuvo la reacción aclarando dos veces con agua destilada y las tiras de nitrocelulosa fueron retiradas de la bandeja y secadas para su lectura.
- La interpretación de los resultados se realizó observando la presencia de los controles de la tira (Control de conjugado CC, control de amplificación AC y control de locus en cada uno de los tres loci investigados: *rpoB*, *katG* e *inhA*), la presencia de hibridación en TUB y la presencia o ausencia de hibridación en las sondas wild type o sondas de mutación, como se visualiza en la siguiente figura:

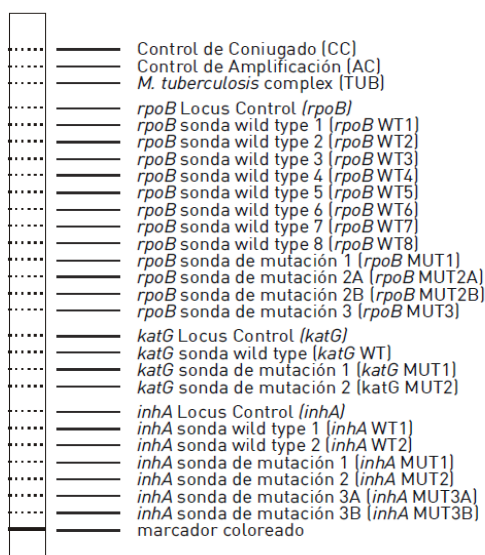


Figura tomada del inserto del Kit GenoType MTBDR*plus* versión 2.0

- Para la validación del ensayo, en el caso de miembros del complejo *M. tuberculosis*, deben estar presente las 5 bandas control (CC, AC, *rpoB*, *katG* e *inhA*), banda TUB (zona específica gen ARNr 23S miembros del complejo *M. tuberculosis*) e hibridación en las bandas wild type WT y/o bandas MUT de acuerdo a la ausencia o presencia de

mutaciones en los genes analizados. Una cepa sensible a rifampicina e isoniazida, de acuerdo a los genes analizados, debe tener todas las bandas WT de las sondas *rpoB*, *katG* e *inhA* lo que indica que no poseen mutaciones en los genes analizados. Cualquier cambio de este patrón de bandas ocasionado por la presencia de mutaciones en las regiones analizadas nos permite inferir sobre resistencia a rifampicina (*rpoB*) e isoniazida (*katG* e *inhA*).

G. Anexo 7: Número de repeticiones de los 24 loci analizados en cada aislado clínico.

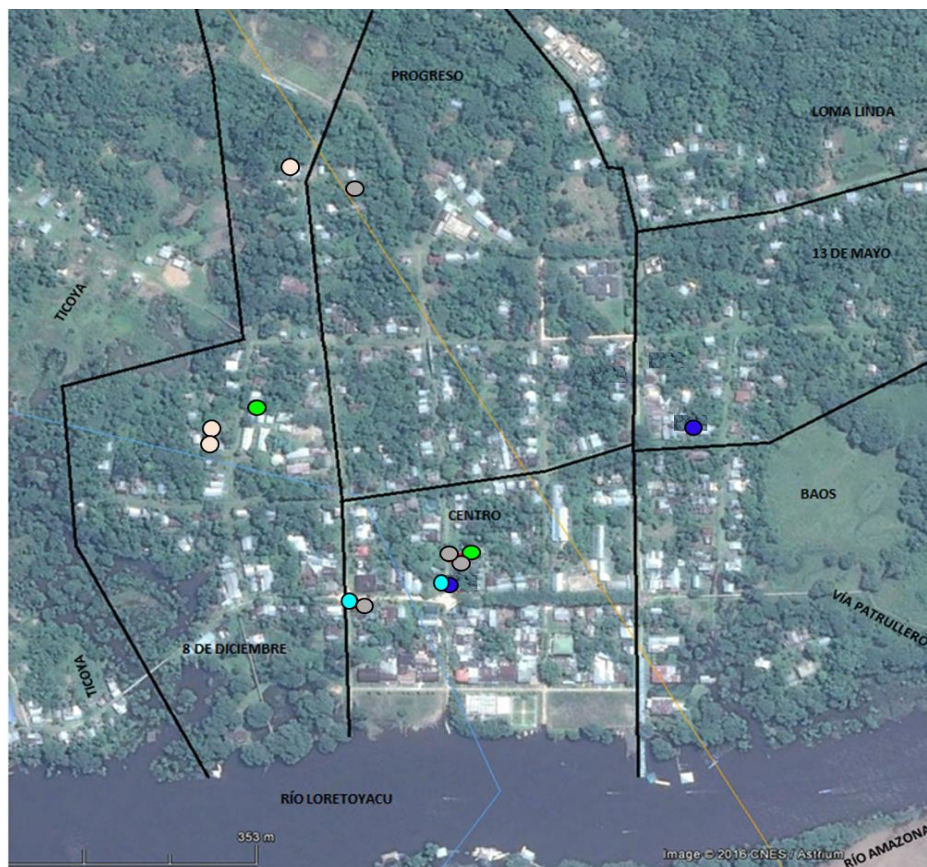
Tabla 15. Repeticiones MIRU-VNTR en aislados clínicos

		NÚMERO REPETICIONES MIRU-VNTR AISLADOS PUERTO NARIÑO-AMAZONAS																							
		2	42	43	4	40	10	16	1955	20	QUB-11b	ETRA	46	47	48	23	24	26	27	49	31	52	QUB-26	53	39
3	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
11	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
30	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
73	1	1	4	2	0	4	3	3	2	2	2	4	1	2	6	1	3	3	3	2	2	6	2	2	
79	1	1	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2	
92	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
98	1	1	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
106	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2	
117	1	1	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
122	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
124	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
130	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
142	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
143	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
144	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
149	1	3	4 y 5	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6 y 5	3	2 y 3	2	2	3	2	2	
151	1	3	4 y 5	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6 y 5	3	2 y 3	2	2	3	2	2	
157	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
159	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2	
160	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2	
161	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2	
170	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
172	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	2	2	2	7	2	2	
176	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
193	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
194	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
195	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
200	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
202	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
207	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
213	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
219	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
251	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
252	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2	
257	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
259	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
266	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
269	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
277	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
286	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
294	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
302	1	3	4	2	2	4	3	3	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	6	2	2	
336	1	3	4	2	0	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
344	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	7	2	2	
346	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
372	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
381	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	3	3	3	2	2	7	2	2	
392	1	3	4	2	0	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
416	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
426	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
434	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
446	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
458	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
462	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
497	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
520	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
532	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
558	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
565	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
576	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
583	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
590	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
604	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
610	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
633	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	6	3	3	2	2	3	2	2	
641	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
642	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
743	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
764	1	3	4	2	2	4	3	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	
882	1	3	4	2	0	4	3	3	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	6	2	2	

Se destaca los loci que tuvieron variación de repeticiones con respecto la mayoría de aislados clínicos.

H. Anexo 8: Georreferenciación de los casos de tuberculosis por genotipo (clusters)

Casco urbano - Puerto Nariño

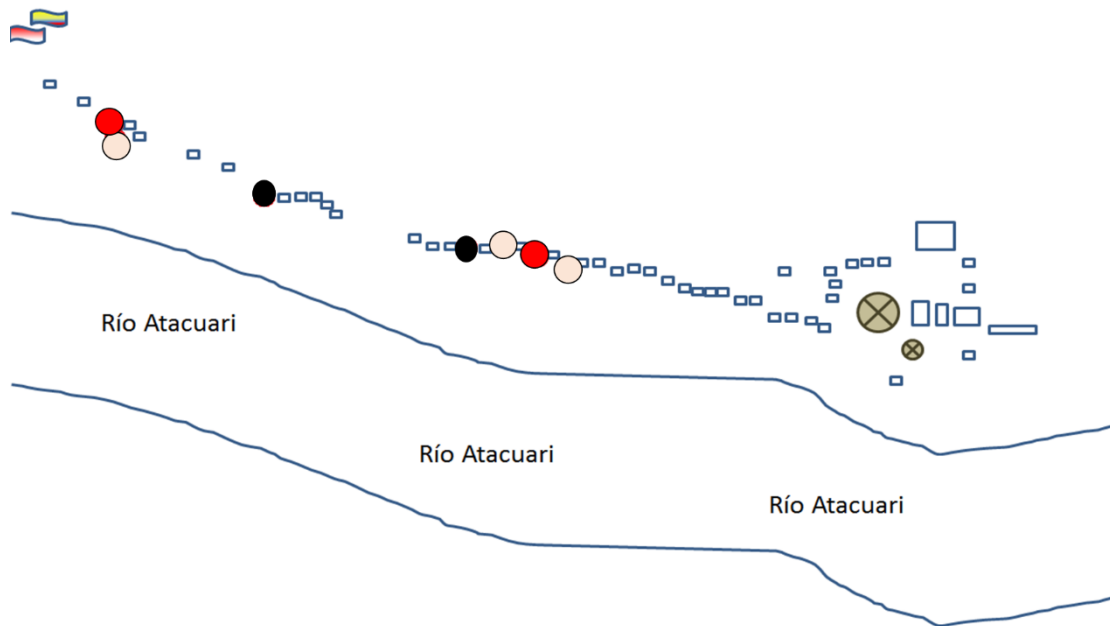


Nomenclatura

- Patrones huérfanos: 4 aislados clínicos
- Clúster 3: 2 aislado clínico
- Clúster 4: 2 aislados clínicos
- Clúster 5: 3 aislados clínicos
- Clúster 6: 2 aislados clínicos

Comunidades Río Amazonas

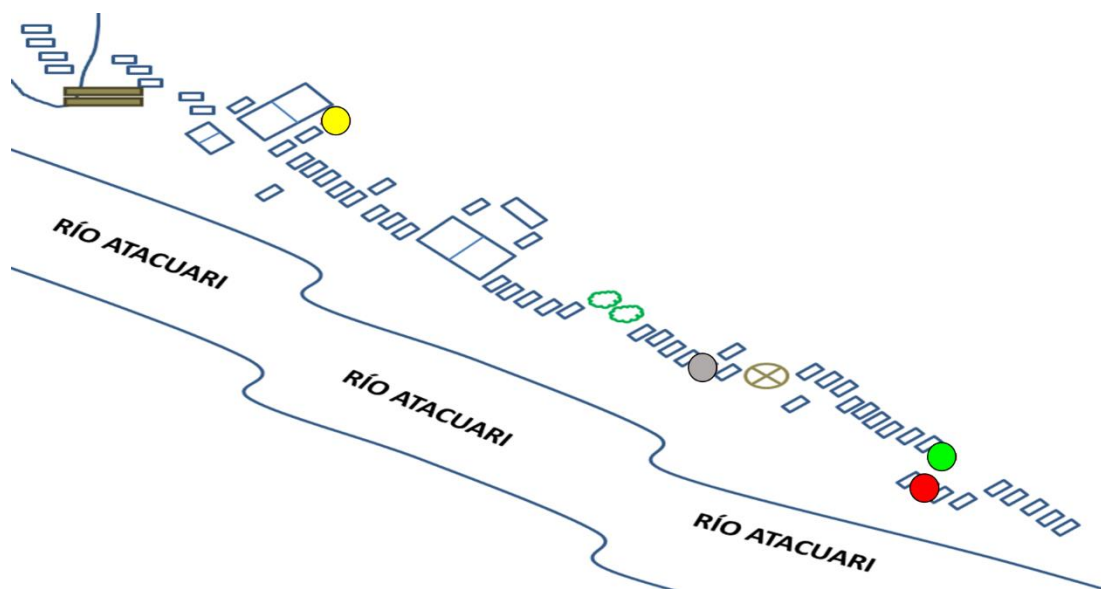
Atacuari



Nomenclatura

- Clúster 1: 2 aislados clínicos
- Clúster 5: 3 aislados clínicos
- Clúster a (infección mixta): 2 aislados clínicos
- Cluster b (infección mixta): 2 aislados clínicos

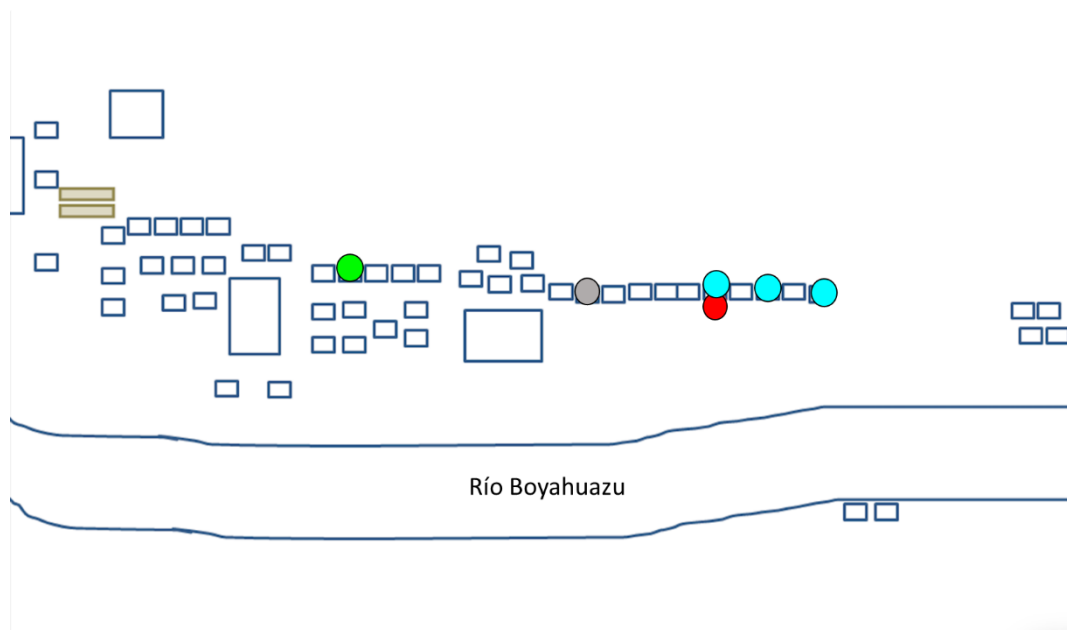
7 de Agosto



Nomenclatura

- Clúster 1: 1 aislado clínico
- Clúster 2: 1 aislado clínico
- Clúster 4: 1 aislado clínico
- Patrón huérfanos: 1 aislado clínico

Boyahuazu



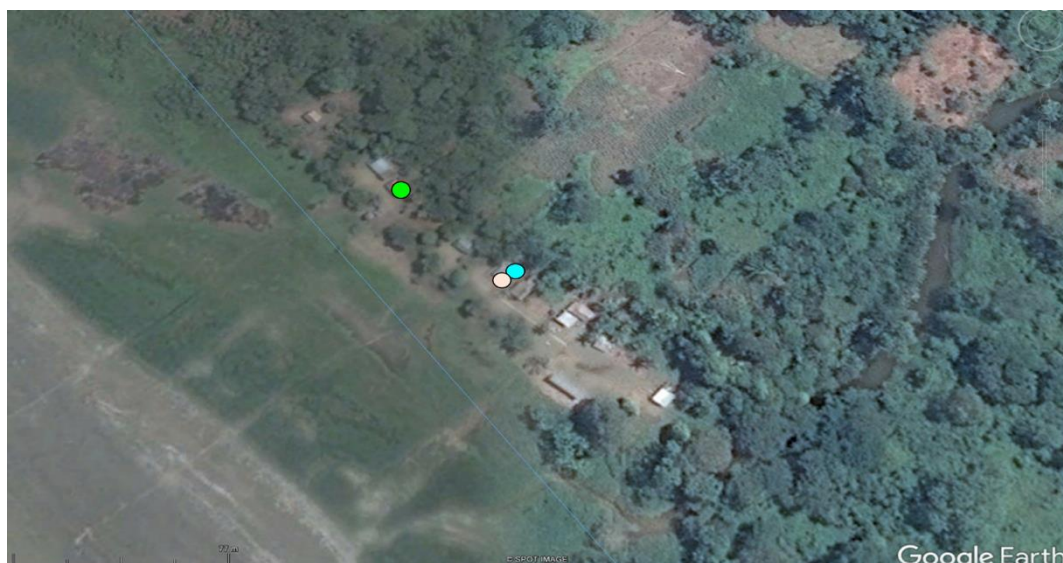
Nomenclatura

- Clúster 1: 1 aislado clínico
- Clúster 3: 3 aislados clínicos
- Clúster 4: 1 aislado clínico
- Patrón huérfanos: 1 aislado clínico

Naranjales



Barrio Santa Clara, Naranjales



Nomenclatura

- Clúster 3: 2 aislados clínicos
- Clúster 4: 1 aislado clínico
- Clúster 5: 1 aislado clínico

20 de Julio



Nomenclatura

- Clúster 5: 3 aislados clínicos
- Clúster 6: 1 aislado clínico

Puerto Esperanza



Nomenclatura

- Clúster 1: 1 aislado clínico
- Clúster 3: 1 aislado clínico
- Patrón huérfano: 1 aislado clínico

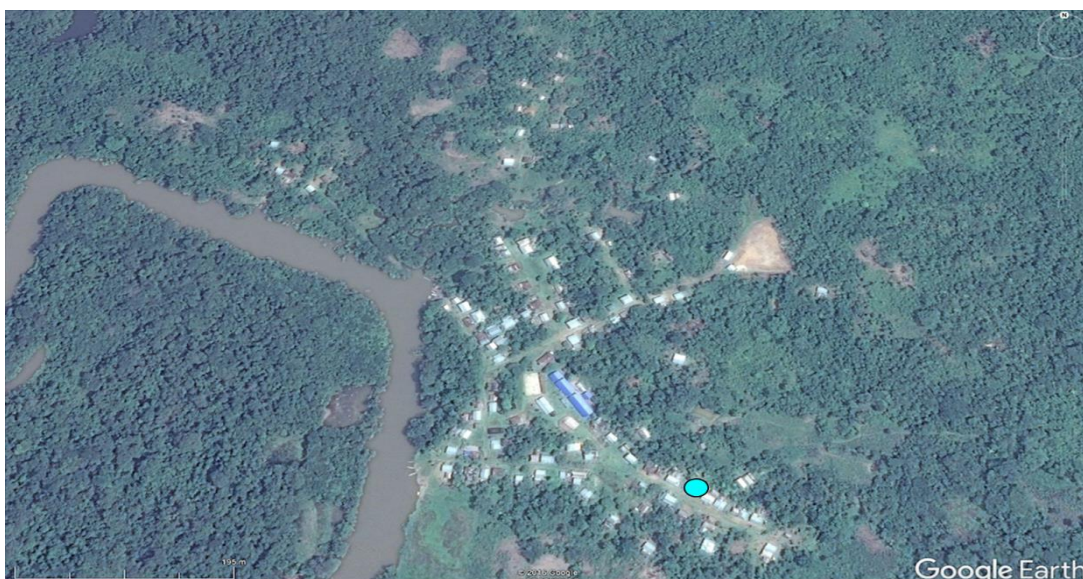
Valencia



Nomenclatura

- Clúster 4: 1 aislado clínico
- Patrón huérfano: 1 aislado clínico

San Martín de Amacayacu

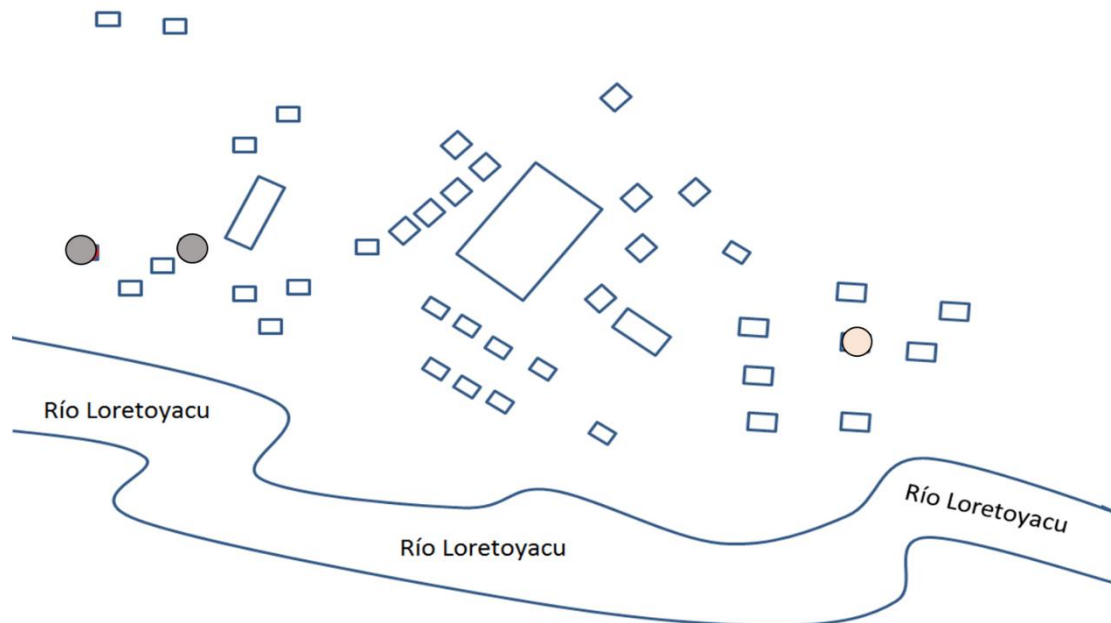


Nomenclatura

- Clúster 3: 1 aislado clínico

Comunidades río Loretoyacu

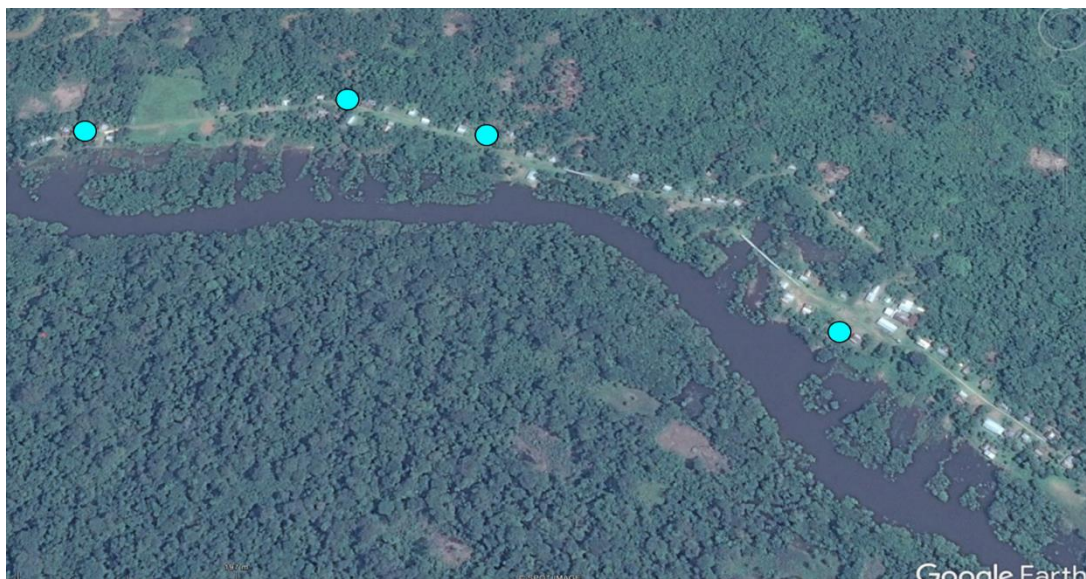
San José de Tipisca



Nomenclatura

- Clúster 5: 1 aislado clínico
- Patrón huérfano: 2 aislados clínicos

12 de Octubre



Nomenclatura

- Clúster 3: 4 aislados clínicos

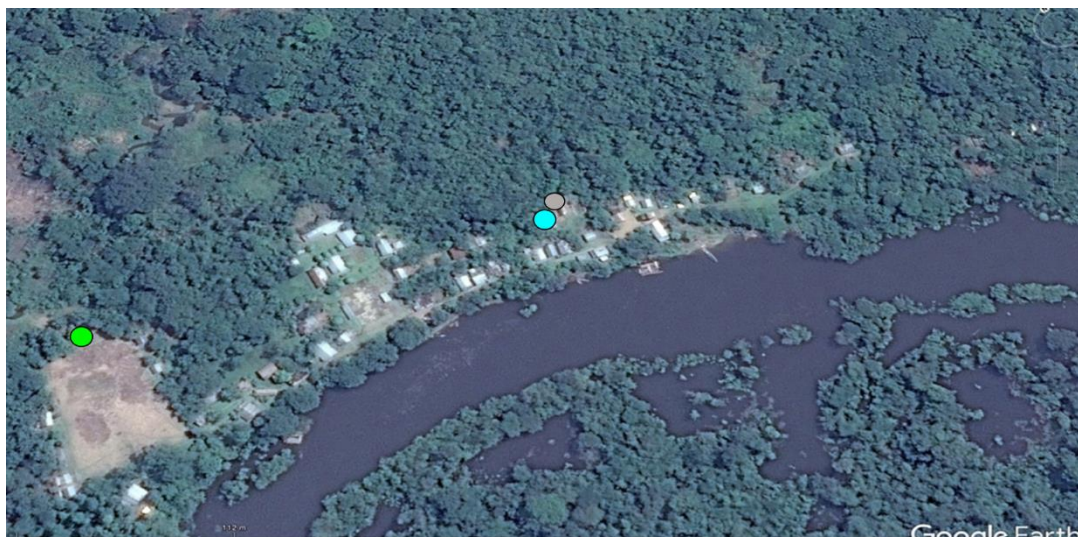
Puerto Rico



Nomenclatura

- Clúster 3: 1 aislado clínico
- Clúster 4: 2 aislados clínicos

San Juan del Soco



Nomenclatura

- Clúster 3: 1 aislado clínico
- Clúster 4: 1 aislado clínico
- Patrón huérfano: 1 aislado clínico

Santa Teresita



Nomenclatura

- Clúster 3: 1 aislado clínico

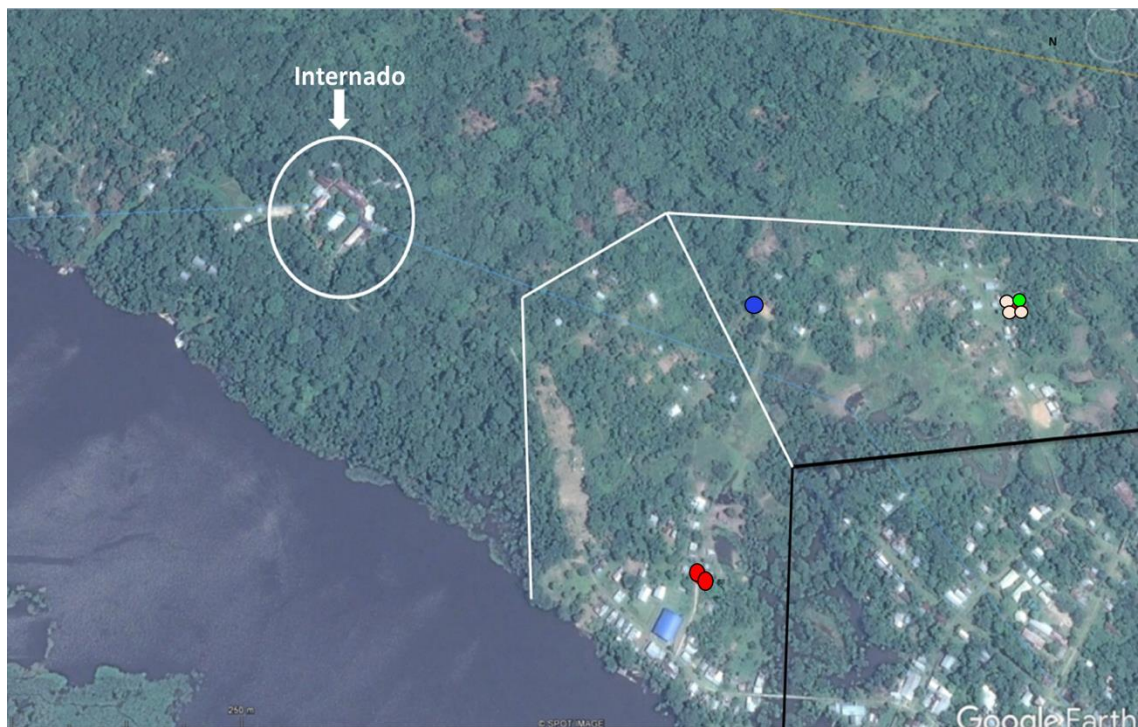
San Francisco



Nomenclatura

- Clúster 2: 2 aislados clínicos
- Clúster 3: 5 aislados clínicos
- Clúster 4: 1 aislado clínico
- Clúster 5: 1 aislado clínico

Ticoya



Nomenclatura

- Clúster 1: 2 aislados clínico
- Clúster 4: 1 aislado clínico
- Clúster 5: 3 aislados clínicos
- Clúster 6: 1 aislado clínico