

Tipificación molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en los departamentos de Cochabamba, La Paz y Santa Cruz

Molecular tipification of *Mycobacterium tuberculosis* in Cochabamba, La Paz and Santa Cruz

Zulema Bustamante G. ¹, Michal Svoboda²

¹Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón.

²Laboratorio de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad Libre de Bruselas

Dirección para Correspondencia: Zulema Bustamante M.Sc. Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad Mayor de San Simón. Av. Aniceto Arce s/n.

Tel: 4250651

E mail: zulebust@hotmail.com

Recibido para publicación en 6/07/09

Aceptado en 2/12/09

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar los genotipos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de los departamentos de Cochabamba, La Paz y Santa Cruz, aplicando la técnica IS6110-PCR, previamente adecuada y validada por la técnica IS6110-RFLP. Se trabajó con 72 aislamientos, los resultados mostraron nueve perfiles de bandas diferentes, permitiendo agrupar a *Mycobacterium tuberculosis*, en 9 genotipos, encontrando variabilidad de acuerdo al área geográfica. En el departamento de Cochabamba predomina el genotipo I, seguido del III y VII; en Santa Cruz el I y en La Paz los genotipos III y II. La técnica estandarizada IS6110-RFLP permitió validar la IS6110-PCR, existiendo correlación entre ambas técnicas; demostrando además la presencia de varias copias de IS6110, generalmente en un número mayor a 6 y menor a 10.

Palabras Clave: IS6110; genotipos, PCR-RFLP

ABSTRACT

This work aims to determine the *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Cochabamba, La Paz, and Santa Cruz by applying the IS6110-PCR technique, previously standardized and later validated by the IS6110-RFLP technique.

Seventy two samples of the bacteria under study were tested and the results revealed nine profiles of different bands. Thus, *Mycobacterium tuberculosis* could be grouped in nine genotypes that show variability according to the geographical area. Genotype I, followed by III and VII, predominates in the area of Cochabamba; genotype I

in Santa Cruz; and genotypes III and II in La Paz.

The IS6110-RFLP standardized technique allowed the validation of the IS6110-PCR, revealing a correlation between both techniques. Moreover, The IS6110-RFLP standardized technique also showed the presence of several copies of IS6110 in a number greater than six and lesser than ten.

Key Words: IS6110; genotypes, PCR-RFLP

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad de los pulmones, contagiosa, crónica y severa, que presenta un cuadro clínico inmunológico complejo; ataca a un alto porcentaje de la población y es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, conocido como Bacilo de Koch.

A pesar de que hace muchos años se conocen drogas, tratamientos eficaces y procedimientos para su control, actualmente nos encontramos ante un recrudecimiento de la enfermedad en el ámbito mundial, constituyéndose en la infección que más muertes provoca en el mundo^{1,2}.

Bolivia es un país que se caracteriza porque todavía tiene una alta incidencia de la tuberculosis pulmonar y cada año se reportan casos nuevos notificados. En el año 2001 se notificaron 10.044, de los cuales el 85% correspondió a tuberculosis pulmonar y el 15% a tuberculosis extrapulmonar, sin embargo, también existen casos que no son reportados, especialmente en las poblaciones rurales³. En nuestro país se han desarrollado varios trabajos microbiológicos con este bacilo, pero trabajos a nivel molecular fueron pocos; por lo que es necesario realizar estudios para conocer las características genéticas y tipificar las cepas de *M. tuberculosis* que provienen de

Cochabamba y de otros departamentos, con el propósito de identificar genotipos circulantes y buscar correlación con zonas geográficas; estos ensayos permitirán realizar estudios epidemiológicos a nivel molecular y, posteriormente, emprender nuevos retos en la solución del problema.

Para los estudios de genotipificación en *M. tuberculosis* el marcador molecular más utilizado es la secuencia de inserción IS6110, que se caracteriza porque se presenta en número variable de copias y en diferentes regiones del cromosoma. En base a este marcador la técnica estandarizada es la que se basa en los fragmentos de restricción de longitud polimórfica, después de una extracción de ADN y digestión con la enzima *Pvu II*; conocida como IS6110-RFLP⁴.

Debido a algunos inconvenientes que presenta la técnica IS6110-RFLP, como ser, el requerimiento de un cultivo masivo de la bacteria, difícil de lograr, el tiempo y costo, se han ido desarrollando otros métodos alternativos para la tipificación de *M. tuberculosis*, así como para los estudios epidemiológicos^{5,6,7,8}. Entre estos se encuentra la técnica IS6110-PCR, utilizada para la tipificación de esta bacteria, que se basa en el polimorfismo de las regiones continuas a IS6110.

Por lo tanto el propósito de esta investigación fue el de determinar el polimorfismo genético en cepas de *M. tuberculosis*, provenientes de los departamentos de Cochabamba, La Paz y Santa Cruz, utilizando como marcador molecular la secuencia de inserción IS6110.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con 72 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenidos de esputos de pacientes con tuberculosis pulmonar, en la Escuela Técnica de Salud de Cochabamba y el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) y derivados al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Simón.

Para la genotipificación de este microorganismo, se utilizaron dos técnicas de tipificación molecular: La IS6110-PCR⁸ y la IS6110-RFLP⁴, que fue utilizada para validar la primera. Las técnicas fueron:

Técnica IS6110-PCR. Se adecuó en nuestras condiciones de laboratorio, los métodos descritos por Otal⁸; Yates⁹ y Neimark¹⁰.

Extracción del ADN:

Del cultivo de *M. tuberculosis*, se tomó una colonia grande o cuatro pequeñas, se colocaron en el buffer Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, se las hicieron hervir por un tiempo 30 minutos, se agregó cloroformo y se centrifugó a 12.000 rpm, separando la fase acuosa que contenía el ADN.

PCR para la tipificación de IS 6110:

Se utilizaron los cebadores CAR 2 A (5'-GAC-TCA-CCG-

GGG-TTC-A-3') y CAR 2 B (5'-GAC-ATG-CCG-GGG-CGG-TTC-A-3'), descritos por Otal⁸. Los mismos que fueron sintetizados por EUROGENTEC. Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa fueron: 1 ciclo a 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 62 °C por 20 segundos, 72 °C por 1 minuto y 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos. Los productos de la amplificación fueron separados en gel de agarosa al 1,4% y visualizados con bromuro de etidio de 0,5µg/ml, en un transiluminador de luz UV.

Técnica IS6110 RFLP. Para esta técnica de tipificación se procedió de acuerdo al método descrito por Van Emden, *et al.*⁴, y las técnicas generales según los procedimientos descritos por Sambrook, *et al.*¹¹.

Extracción de ADN:

Se tomó aproximadamente 3 asas de cultivo bacteriológico, que fueron transferidas al buffer Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM, la mezcla fue calentada, por 20 minutos, se adicionó lisozima de 10 mg/ml y se incubó por 1 hora a 37 °C. Se colocó SDS al 10% y proteinasa K de 10 mg/ml, luego NaCl y N-cetil-N-N-N-trimetil amonio CTAB, (4,1 g de NaCl y 10 g de CTAB), se incubó por 10 minutos a 65°C. Se adicionó un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se llevó a un vortex. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm. La precipitación del ADN se realizó con isopropanol.

El ADN bacteriano se cuantificó por espectrofotometría de luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm.

Digestión del ADN con la enzima *Pvu II*. Para la digestión se utilizó 2 µg del ADN cromosómico de la bacteria y se incubó con 5 unidades de enzima *Pvu II* de 10 U/µl, en un volumen final de 10 µl. Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Transferencia del ADN a membrana de nitrocelulosa. Para la transferencia de los fragmentos de restricción, el gel de agarosa se realizó una desnaturalización alcalina, luego una neutralización y la transferencia, utilizando membrana de nitrocelulosa SIGMA de 0,45 µm de poro y una solución de transferencia.

Preparación de la sonda IS6110. Para la preparación de la sonda se siguió el procedimiento descrito por Van Emden, *et al.*⁴, se utilizó el ADN de una cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv y los cebadores: INS 1 e INS 2, que corresponden respectivamente a las regiones 631-650 y 856 a 875 de la secuencia de Inserción IS6110, para la amplificación se utilizó el kit – “PCR DIG PROBE SYNTHESIS KIT” de Roche. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C por 3 min; 25 ciclos: 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo a 72°C por 7 minutos. Se obtuvo una sonda de 245 pb, marcada con digoxigenina.

Hibridación con la sonda IS6110. La hibridación con la

sonda IS6110, se realizó por 12 horas a una temperatura de 55°C en una solución de hibridación. Para la detección de la sonda, la membrana se incubó con TBS 0,5% leche en polvo, luego se cubrió con una solución de antiDIG-fosfatasa alcalina en TBS-0,5% leche y se incubó durante 2 horas, a temperatura ambiente. Para la revelación se utilizó como sustrato Nitroazul de tetrazolium y 4-cloro-5-bromo-Indoifosfato (BCIP).

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de los resultados de IS6110-PCR, se utilizó el programa SAS para realizar una inferencia estadística, determinando el

intervalo de confianza a 95% de seguridad y estimar la frecuencia relativa de los genotipos a nivel poblacional. Para la asociación entre genotipos y departamentos, se realizó un análisis de Chi-cuadrado, en el programa SPSS.

RESULTADOS

Tipificación por la técnica IS6110-PCR. Los productos de la PCR, mostraron diferentes tamaños y número de bandas, observando la variabilidad genética entre las diferentes cepas provenientes de los departamentos de Cochabamba, La Paz y Santa Cruz. Figura 1.

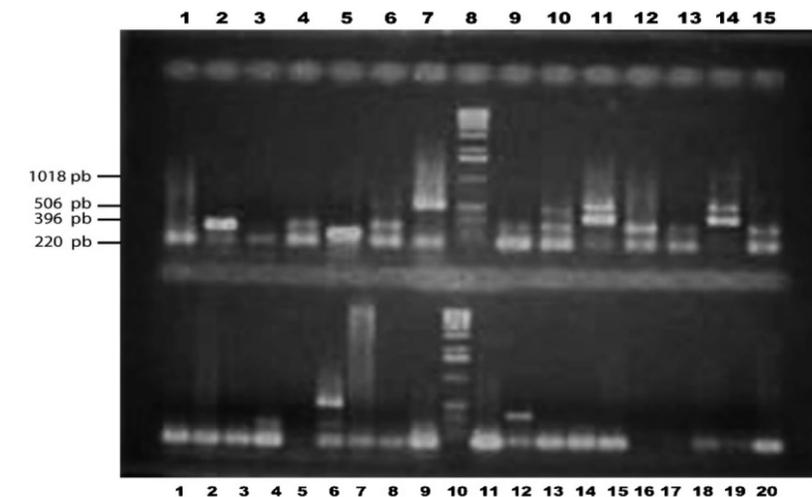


Figura 1. Perfil de bandas, producto de amplificación de muestras de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*.

El detalle de las muestras es:

Superior 1, 2, cepas de Cochabamba; 3, Santa Cruz, 4-7, 9-15 cepas de La Paz, 8, Marcador de tamaño. Inferior; 1-9; 11-20 cepas de Cochabamba, 10, Marcador de tamaño. Para verificar la reproducibilidad de la técnica se amplificó las mismas muestras obteniendo el mismo número de bandas.

Como resultado de esta tipificación por PCR, se observaron 9 perfiles diferentes denominados I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX, que se diferenciaron por el número y tamaño de bandas. La distribución porcentual de los genotipos en las muestras analizadas se encuentra en Figura 2.

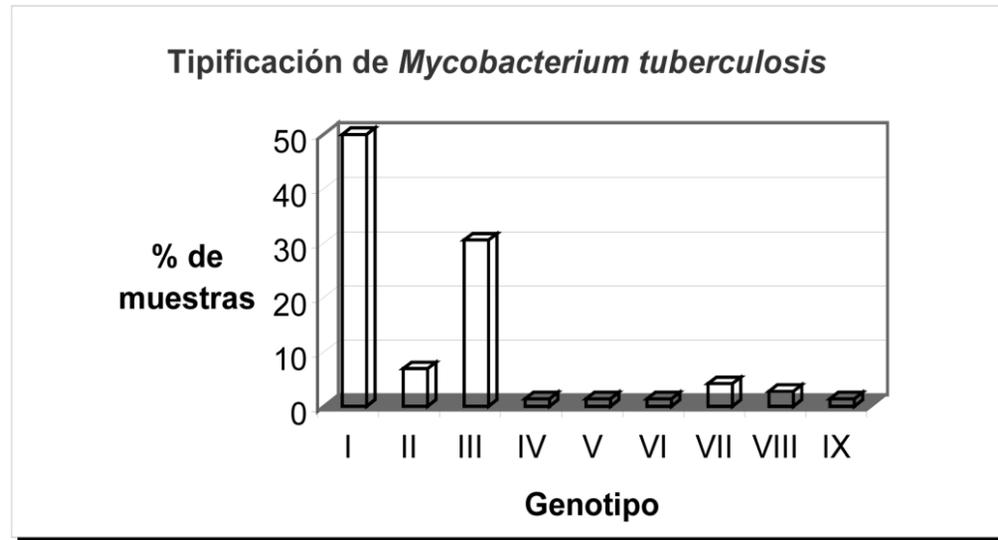


Figura 2. Distribución de los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* en Cochabamba, La Paz y Santa Cruz.

En base a los resultados de la técnica IS6110-PCR, se realizó un análisis estadístico para determinar, la frecuencia relativa de los genotipos y realizar una estimación poblacional de los mismos.

El análisis estadístico, indica la existencia de un genotipo predominante que es el I, con porcentaje de 50%, siguiendo en importancia el genotipo III con 30,6%, luego el II con 6,9%, el VII con 4,2%, el grupo VIII con 2,8%. Los grupos IV, V, VI y IX, se presentaron en una sola muestra representando sólo el 1,4%.

Respecto a la estimación poblacional, con un intervalo de confianza del promedio a un 95%, se puede concluir que el genotipo I, tiene un intervalo comprendido entre 38,5 y 61,5%, el III, entre 19,9 y 41,2% y el II, entre 1,1 y 12,8%; el resto de los genotipos se encuentran en intervalos de confianza muy bajos.

Para determinar la distribución de genotipos de la bacteria en los tres departamentos se consideró las muestras provenientes de estos lugares. La distribución porcentual de los genotipos se expresa en la Figura 3.

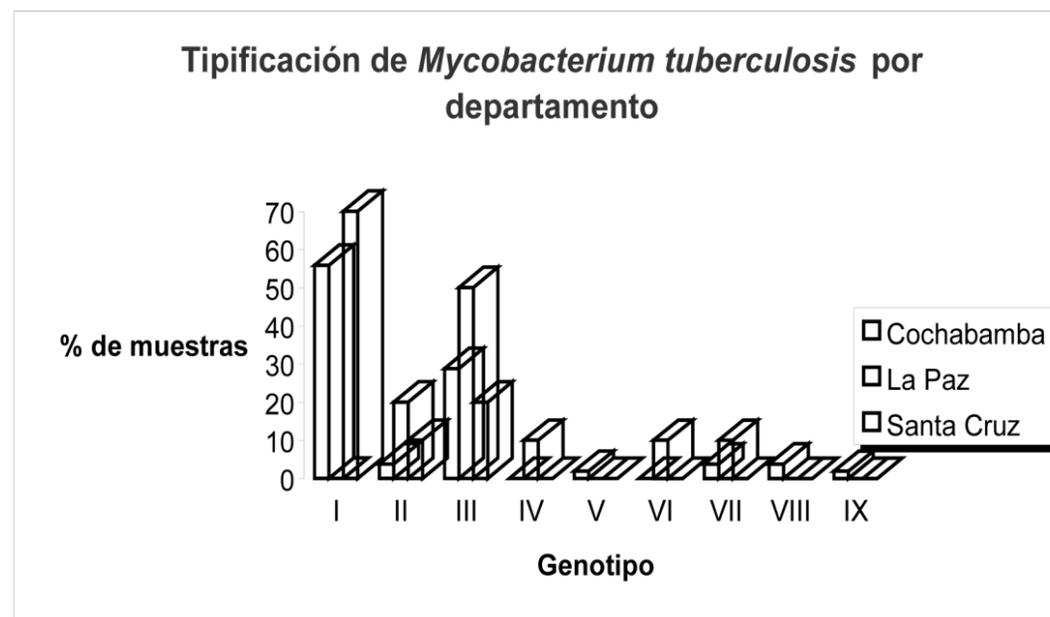


Figura 3. Distribución de genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* por departamento.

En la Figura 3, de distribución de los genotipos por departamento, se puede observar, que en los departamentos de Cochabamba y Santa Cruz, predomina el grupo I, que parece ser el genotipo responsable del mayor número de casos en dichos departamentos, pero se encuentra ausente en La Paz; el genotipo II, se presenta en los tres departamentos, sin embargo en un porcentaje muy bajo en Cochabamba; el genotipo III, es predominante en La Paz, con un porcentaje del 50%, pero también se encuentra presente en Cochabamba y Santa Cruz en menor proporción; el resto de los genotipos se presentan con

frecuencias relativas muy bajas. El análisis estadístico de "chi-cuadrado de pearson" y "Likelihood ratio", con 95% de confianza, dio como resultado un p-value de 0,05 y 0,041 respectivamente, permitiendo concluir, que existe relación entre los genotipos predominantes que circulan y el área geográfica.

Resultados de IS6110-RFLP. Una vez adecuada la técnica, se procedió a trabajar con 25 muestras tomadas al azar. Los resultados de la hibridación se expresan en la Figura 4.

RFLP DE IS 6110 CON LA SONDA IS 6110

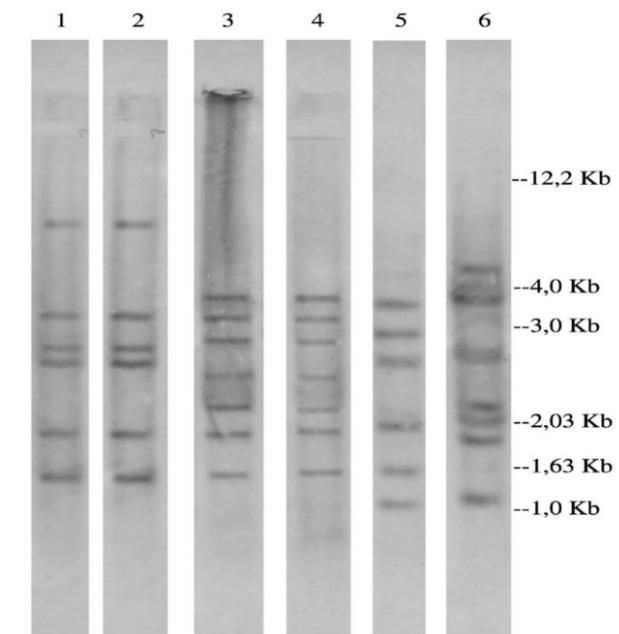


Figura 4. Perfil de fragmentos de restricción de longitud polimórfica de IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, reconocidos por hibridación con la sonda IS6110, marcada con digoxigenina.

El detalle de muestras es: 1, La Paz; 2-6, Cochabamba. Observando los resultados de la hibridación de los fragmentos de longitud polimórfica de IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*, con la sonda IS6110, se observó la presencia de varias copias de la secuencia de inserción IS6110, en un número igual o mayor a 6, pero menor a 10. Es importante destacar que aquellas muestras que presentaron el mismo genotipo por la técnica IS6110-PCR, presentaron el mismo perfil de fragmentos de restricción de longitud polimórfica de IS6110.

DISCUSIÓN

El número de genotipos encontrados en nuestro estudio por la técnica IS6110-PCR, muestra claramente el predominio

de un genotipo en relación a los otros. Esta situación puede explicarse porque en Bolivia existe una alta prevalencia de la enfermedad y en estudios previos se ha observado que los países donde la prevalencia es alta, el grado de parentesco entre las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* es mayor a causa de la transmisión activa y reciente en una comunidad como indican Sechi, et al.¹² y Van Soolingen, et al.¹³.

En relación a los perfiles encontrados en los tres departamentos en estudio, se puede observar que son similares en el tamaño y número de bandas encontrados en otros trabajos realizados con la misma técnica¹⁴.

Como se ve en la Figura 2, los genotipos I y III, son los responsables del mayor número de casos, situación que ha sido reportada para otros países como Tanzania, donde

indican que en algunas regiones sólo 2 ó 3 genotipos son responsables del mayor número de casos en una determinada región (Bauer, *et al.*¹⁵). Así también Zeng, *et al.*¹⁶ con la misma técnica, determinaron 8 grupos polimórficos de *Mycobacterium tuberculosis* en la China, de los cuales tres son predominantes en esa región.

Respecto a la distribución y predominio del genotipo I en Cochabamba y Santa Cruz, podría deberse a la alta movilidad de las personas entre el valle y el oriente; sin embargo el grupo III, que es predominante en el departamento de La Paz, también se encuentra en Cochabamba y Santa Cruz y el grupo II en La Paz y Santa Cruz, esta situación muestra la diseminación de algunos grupos entre los tres departamentos, debido al frecuente traslado de personas infectadas de una región a otra.

Estos resultados nos permiten concluir que existe relación entre los genotipos predominantes que circulan y la región geográfica, como explican Reniero¹⁷ y varios autores^{12,18}. Así mismo la diseminación de genotipos de un lugar a otro, debido a la frecuente emigración de pacientes fue establecida por Borgdorff, *et al.*¹⁹.

En relación a la técnica PCR-RFLP, observando los patrones de bandas de hibridación, se puede concluir que todas las cepas analizadas por ésta técnica, tienen varias copias de la secuencia de inserción IS6110, que se observan como fragmentos de longitud polimórfica con tamaños mayores a 0,9 Kb como indica Van Emden, *et al.*⁴; que los productos obtenidos no deberán ser menores a este tamaño debido a que la enzima *PvuII*, corta la IS6110 produciendo fragmentos de 0,45 a la izquierda de la secuencia y 0,9 a la derecha y la sonda IS6110 híbrida con la región derecha de la IS, el número de copias de IS6110, varía entre 6 y 9, aspecto muy importante puesto que se han reportado cepas que tiene de 2 hasta 20 copias; la mayoría de las cepas tienen esta secuencia y el número puede variar significativamente de acuerdo a la región, incluso algunos países como en la India, encontraron cepas que no poseen esta secuencia de inserción.

El número de bandas encontradas es bastante frecuente y ha sido reportado en estudios realizados en otros países, es así que Hwang²⁰ en Taiwán encuentra que la mayoría de las cepas circulantes en ese país, tiene un número de 6-16 copias, en Italia Sechi, *et al.*¹² indica que los *Mycobacterium tuberculosis* de esa región presentan un número mayor a 6 copias. A nivel de Iberoamérica, Díaz, *et al.*²¹ encuentra en Cuba que las cepas tienen de 6-20 copias, y en Colombia Gomez-Marin, *et al.*²², observó que la mayoría de las cepas de la región del valle tienen un promedio de 10±3 copias, existiendo correlación con la zona geográfica.

Respecto a la validación de la técnica IS6110-PCR por la técnica IS6110-RFLP, se encontró muy buena relación entre ambas técnicas, puesto que los grupos que

presentaron perfiles diferentes y grupos diferentes por la IS6110, también por la técnica IS6110-PCR, aquellos que se encontraban por RFLP en el mismo grupo, también se agruparon en un solo genotipo por PCR.

AGRADECIMIENTOS

Al Convenio UMSS-CIUF, que apoyo económicamente la realización del presente trabajo de investigación; al Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) y a la Escuela Técnica de Salud de Cochabamba, que proporcionaron los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*.

REFERENCIAS

- Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. Microbiología. Mecanismo de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante resolución de problemas. Panamericana: Buenos Aires; 1994.
- López V, Lorente A, Anzola JM, Blanco J, Del Portillo P, Zambrano M. Identificación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* que se expresan bajo condiciones de estrés anaerobio. Infectio. 2001; 5(4):213-22.
- Mancilla, R. Descifran el Código genético del Bacilo de Koch. [Monografía en Internet]; 1998 [Acceso 20 de diciembre de 2003]. Disponible en: <http://www.biomedicas.unam.mx/html/gaceta98/jun1.htm>
- Van Embden J, Cave MD, Crawford J, Dale J, Eisenach K, Gicquel B, *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendation for a Standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993 Feb; 31(2): 406-40.
- Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, Haas W.H, Hermans P.W, Martin C, *et al.* Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. J Clin Microbiol. 1999 Aug; 37(8):2607-18.
- Barnes P and Cave D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. N England J Med. 2003 Sep; 18; 349(12):1149-56.
- Lok K, Willam H, Benjamin Jr, Kimerling M, Pruti V, Lathan M, *et al.* Confirmation and Molecular Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strain without IS6110 insertions. Emer Infect Dis. 2002; 8 (11).
- Otal I, Samper S, Asencion MP, Vitoria MA, Rubio MC, Gomez R and Martin C. Use of a PCR Method Bases on IS6110 Polymorphism for Typing *Mycobacterium tuberculosis* Strains from BACTED Cultures. J Clin Microbiol. 1991 Jun; 29(6):1252-54.
- Yates M, Drobnowski F and Stuart W. Evaluation of a Rapid, PCR-Based Epidemiological Typing Method for Routine Studies of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002 Feb; 40(2):712-4.
- Neimark H, Ali Baig M, and Carleton S. Direct Identification and Typing of *Mycobacterium tuberculosis*.

- J Clin Microbiol. 1996 Oct; 34(10): 2454-9.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sechi L, Zanetti S, Delogu G, Montinaro B, Sanna A. and Fadda G. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from Different Regions of Italy and Pakistan. J Clin Microbiol. 1996 Jul; 34 (7):1825-8.
- Soolingen Van D, Hermans P, Haas P, Soll D and Van Emden J. Occurrence and Stability on Insertion Sequence in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA polymorphism as a Tool in the Epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1991 Nov; 29(11):2578-86.
- Torrea G, Offredo C, Simonet M, Gicquel B, Berchi P and Pierre-Audigier C. Evaluation of Tuberculosis Transmission in a Community by 1 Year of Systematic Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. J Clin Microbiol. 1996 May; 34(5):1043-9.
- Bauer J, Yang Z, Poulsen S and Andersen A. Results from 5 years of National DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex Isolates in a Country with a Low incidence of *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Clin Microbiol. 1998 Jan; 36(1): 305-6.
- Zeng NH, Wang ZB, Tang BH, Xiao H, Wang SS, Li XG, Huang JL, Jiang PL. and Wu, CG. Study on molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Chinese army with PCR amplified fingerprinting methods. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2003 May; 24(5): 377-80.
- Reniero A. Las Mycobacterias. *Mycobacterium tuberculosis*. [Monografía en Internet]. [Acceso 24 de enero de 2009]. Disponible en: http://www.rutasalud.com.ar/para_profesionales/5htm.
- Coll P, Costa R, March F. y Prats G. IS6110 en la tipificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*: aplicación de un protocolo estandarizado con análisis informatizado de las imágenes. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1995; 13: 391-7.
- Borgdorff MW, Beher MA, Nagelkelker NJ, Hopewell PC and Small PM. Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. Int J Tuberc Lung Dis. 2000 Apr; 4(4): 287-94.
- Hwang HY, Chang CY, Chang LL, Chang SF, Chang YH and Chen YJ. Characterization of Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J Med Microbiol. 2003 Mar; 52 (Pt 3): 293-45.
- Díaz R, Gomez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Couyt J, Valdivia JA, Dvan S. Transmission of tuberculosis in Havana Cuba: a Molecular Epidemiological Study by IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001 May; 96(4): 437-443.
- Gomez-Marin JE, Leon Franco CI, Inirida Guerrero M, Rigouts M and Portaels F. IS6110 fingerprinting sensitive and resistant strain (1991-1992) of *Mycobacterium tuberculosis* in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Oct; 97(7): 1005-8.