

Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* y susceptibilidad a drogas

Dras. Trina Matín, Licia Azócar

RESUMEN

Objetivos. Conocer la epidemiología de la tuberculosis y transmisión de cepas resistentes en la población estudiada.

Diseño y ambiente. Estudio prospectivo de cohortes, 150 pacientes sintomáticos respiratorios que acudieron a la consulta de Neumotisiología del Distrito Sanitario N° 3 (n= 115) y a la emergencia de Medicina Interna del Hospital Miguel Pérez Carreño (n= 35), desde junio de 1995 hasta agosto de 1996. Se tomaron 2 muestras sucesivas de esputo para baciloscopia, cultivo, susceptibilidad a drogas y genotipificación por análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

Resultados. Se obtuvieron 14 baciloscopias positivas (9,3%) y 16 cultivos positivos para *Mycobacterium tuberculosis*, de los cuales 10 fueron baciloscopias positivas y 6 baciloscopias negativas. Se encontró resistencia en 3 cepas: isoniacida (1), estreptomina (1) y thioacetazona (1), lo que representa una resistencia global del 20%. El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción realizado en 14 cepas demostró patrones diferentes.

Conclusiones. No hay relación epidemiológica entre las cepas aisladas; la resistencia global fue del 20% y no se encontró multirresistencia.

INTRODUCCIÓN

El surgimiento de la tuberculosis (TBC) resistente a nivel mundial es un hecho epidemiológico de gran magnitud, que ha sido estudiado en Norteamérica, Europa, Asia, Australia y en Latinoamérica, específicamente en Argentina y Colombia, mediante métodos diagnósticos tradicionales y con herramientas innovadoras de biología molecular, que han permitido identificar las fuentes de infección, la presencia de microepidemias, factores de riesgo condicionantes de éstas y el fenómeno de resistencia, cada vez más grave debido a la presencia de multirresistencia.

En la gran mayoría de los trabajos publicados, que han demostrado multirresistencia, las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MT), han sido aisladas en hospitales, cárceles, institutos correccionales, geriátricos y otras comunidades cerradas, donde existen condiciones que favorecen la presencia de microepidemias; muchos de los pacientes que forman parte de estos brotes, son portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), aun cuando no se ha demostrado una asociación causal entre la infección por VIH y la resistencia a drogas antituberculosas.

Son estos hechos, los que nos han motivado a estudiar el comportamiento de esta enfermedad en la comunidad donde trabajamos, mediante baciloscopia según técnica estándar, y cultivo por la técnica de Kudoh (esta última constituye una innovación en Venezuela). Posteriormente, evaluamos el patrón de susceptibilidad a drogas y la diferenciación de las cepas circulantes responsables de la *M. tuberculosis*, por medio del análisis de polimorfismo de fragmentos de las secuencias de inserción IS6110 para determinar si hay transmisión

de cepas resistentes en la comunidad estudiada.

Marco teórico

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infectocontagiosa que representa un problema de salud de gran magnitud. Ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud como emergencia mundial en abril del año 1993. Para esta década se han estimado 88 millones de nuevos casos de tuberculosis, de los cuales 8 millones serán atribuidos a infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y 30 millones de personas morirán por tuberculosis de los cuales 2,9 millones corresponderán a infección por VIH (1,2), lo cual expresa el impacto que tiene la epidemia del SIDA en la epidemiología de la tuberculosis, enfermedad activa en un período muy corto después de la infección inicial.

En Latinoamérica el número de casos de tuberculosis estimado para esta década es de 6 065 000, con una mortalidad aproximada de 1 210 000, cifras que superan a otras regiones como Norteamérica y Oeste de Europa, y a su vez son superadas por África y Asia, donde las cifras sobrepasan los 15 millones de casos y 5 millones de muertes (1).

En Venezuela, donde la tuberculosis es considerada una endemia, tiene una incidencia global de 5 364 casos, que corresponde a una tasa de 24/100 000 habitantes para el año 1996, distribuidos en: tuberculosis pulmonar 4 638 casos (tasa de 20,79/100 000 habitantes) y formas extrapulmonares 726 casos (tasa de 3,25/100 000 habitantes). Estos datos pudieran corresponder a un subregistro, debido a que en primera instancia la mayoría de la población que consulta a los ambulatorios y hospitales generales son sintomáticos respiratorios con formas avanzadas de la enfermedad, quienes constituyen, en el tiempo, fuentes de infección para un grupo humano susceptible muy numeroso, dado el hacinamiento en que se encuentra la mayoría de la población, de tal manera que estos contactos no acuden a consulta por desconocimiento de la enfermedad, por difícil acceso a los servicios de salud o por carencias del sistema sanitario para localizarlos, diagnosticarlos y tratarlos precozmente; se mantiene así la cadena epidemiológica. En segundo lugar, existe un déficit en la aplicación de los métodos diagnósticos tradicionales, debido a carencias de recursos humanos y materiales que trae como consecuencia que a menos de la mitad de los pacientes sintomáticos respiratorios se les practique

baciloscopia de esputo.

En el Distrito Federal se observa un aumento del 35% en la incidencia de la tuberculosis en los últimos años, de 26 casos registrados por cada 100 000 habitantes en el año 1989, hasta 33,2 por cada 100 000 en el 1996 (3).

El análisis de estas cifras, permite evidenciar el resurgimiento de la tuberculosis, debido a un conjunto de factores de índole económica y social, que conducen a pobreza crítica, desnutrición y hacinamiento, los cuales facilitan su transmisión, aunado a la presencia de infección por HIV, alcoholismo y drogadicción que crean el sustrato favorable para el desarrollo de la enfermedad. Estas variables, además de las insuficientes medidas de control que impiden eliminar las fuentes potenciales de infección, coexisten en nuestro país y en particular en el Distrito Federal, hechos demostrados en un estudio epidemiológico preliminar realizado en Caracas (Toro y col., no publicado), con empleo de biología molecular, el cual demostró que al menos el 30% de los casos son de transmisión reciente, lo que expresa la presencia de microepidemias, cifra comparable a las obtenidas en estudios similares realizados en Nueva York y San Francisco (EE.UU.) (4,5).

El procedimiento más importante para detectar casos infecciosos, es la baciloscopia, con una sensibilidad entre 50-65%. Es un examen básico, económico, sencillo y semicuantitativo, de especial utilidad en las formas pulmonares, que son las más frecuentes. Los casos con baciloscopia positiva son muy infecciosos y el tratamiento oportuno sería la piedra angular para interrumpir la cadena epidemiológica.

El cultivo, de mayor sensibilidad que la baciloscopia (80%), permite diagnosticar casos baciloscopia negativos, confirmar casos baciloscopia positivos (6), tipificar las cepas y realizar pruebas de resistencia a drogas antituberculosas.

En Venezuela, en general, no se realizan cultivos, por lo que obtenemos poca información sobre el estado de resistencia global del *M. tuberculosis*, aspecto que cobra mucha importancia en la actualidad por el posible número elevado de casos que han desarrollado resistencia.

El factor más importante para la resistencia lo constituye la falla de tratamiento, bien sea por prescripción incorrecta por parte del personal de salud o la falta de cumplimiento por parte del

paciente, a pesar de haberse establecido regímenes cortos que permiten el cumplimiento del tratamiento en su totalidad (7-10). Alternativamente, los pacientes pueden infectarse por cepas resistentes a drogas debido a la exposición a una fuente con tuberculosis resistente.

Se han descrito en Nueva York, brotes de tuberculosis intrahospitalaria en pacientes infectados por HIV, causadas por cepas multirresistentes (11,12). En Argentina y Paraguay se han realizado estudios epidemiológicos que han demostrado la presencia de tuberculosis multirresistente y nosocomial (13-15). En África, especialmente en Túnez (16), hay evidencias de epidemias persistentes por *M. tuberculosis*. En Europa se ha documentado la transmisión activa de la *M. tuberculosis* resistente, al observar brotes en población susceptible como: usuarios de drogas intravenosas, pacientes con VIH y población hacinada, por no cumplir los esquemas de tratamiento (17).

Estos hechos, mencionados en la literatura, demuestran el desarrollo de microepidemias ante pacientes infectados por *M. tuberculosis*. Se han identificado brotes clonales en prisiones, instituciones geriátricas, hospitales y otras poblaciones cerradas (18-20).

La mayoría de los estudios previamente mencionados utilizan como instrumento epidemiológico el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de las secuencias de inserción IS6110 (RFLP) desarrollado desde 1990 por van Soolingen (21-23), que permite distinguir a nivel molecular las diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

Constituye, por ello, una herramienta promisoría para conocer la epidemiología de la enfermedad al permitir calcular el número de casos debidos a reactivación o transmisión reciente. Además, este método puede ser utilizado en laboratorios centrales o nacionales de referencia a un bajo costo, de aproximadamente 5,00 dólares americanos por muestra y, si se considera la utilidad de su aplicación, la relación costo beneficio es muy favorable y justifica ampliamente la inversión, por conducir a medidas de control más eficaces (24).

La técnica permite identificar pacientes infectados por una fuente común, pues las cepas aisladas tienen patrones de distribución de bandas semejantes, mientras que las cepas que provienen de fuentes diferentes exhiben patrones distintos. Estos

patrones de RFLP se mantienen estables en el tiempo e inclusive permanecen sin modificaciones cuando el bacilo adquiere resistencia a las drogas, por lo que es útil para el reconocimiento y seguimiento de fuentes de infección, la identificación de brotes como en caso de infecciones intrahospitalarias, y de cepas con alta virulencia, particularmente resistentes (12). Recientemente los RFLP se han utilizado para hacer estudios sobre transmisión comunitaria en Estados Unidos, Suiza y Australia (18,19,24-26).

En Colombia, se realizó un estudio epidemiológico con RFLP, y se encontró que un solo paciente podría explicar todos los casos de resistencia inicial a la combinación isoniazida y estreptomycin (24). En los trabajos de Kreiswirth (citado en 27), la tipificación por RFLP mostró que una cepa estuvo comprometida en al menos tres diferentes centros de control de enfermedad, que identificaron brotes de tuberculosis multirresistente en Nueva York, y se demostró que los patrones de resistencia fueron muy similares en al menos 100 individuos infectados con esta cepa, lo cual sugiere el uso potencial de la tipificación RFLP para el control comunitario de cepas resistentes (26).

Es este último aspecto, el punto cardinal del planteamiento de nuestra hipótesis mediante la cual suponemos que los patrones de RFLP podrían relacionarse con el patrón de susceptibilidad a drogas, para así ofrecer un tratamiento oportuno y precoz además de realizar seguimiento de cepas resistentes de la población en estudio.

POBLACIÓN Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo en la población de sintomáticos respiratorios (pacientes mayores de quince años de edad que consultaron por tos y expectoración de tres o más semanas de evolución), previa aceptación para participar en el estudio. Se realizó interrogatorio dirigido a fin de conocer las características demográficas de la población, hábitos sexuales, uso de drogas ilícitas, antecedentes de prisión, número de personas con quienes cohabitaban, contactos previos con TBC, antecedentes de tuberculosis y régimen de tratamiento recibido, otras enfermedades concurrentes (diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección de VIH y tratamiento inmunosupresor), antecedentes de vacunación con BCG y aplicación de PPD.

GENOTIPIFICACIÓN DE *M. TUBERCULOSIS*

Se recolectaron dos muestras sucesivas de esputo que fueron procesadas en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Miguel Pérez Carreño (HMPC), mediante baciloscopia por la técnica de Zeehl Nielsen (28) y cultivo en medio de Ogawa con modificación de Kudoh y Kudoh (29), mantenidas en estufa a 37°C durante 8 semanas y vigilado el crecimiento cada semana. A los cultivos que resultaron con crecimiento se les practicó una segunda baciloscopia (coloración de Zeehl Nielsen) y si ésta resultaba positiva para bacilos ácido alcohol resistentes, se procedía a realizar las pruebas de identificación especificadas a continuación: pruebas de niacina, catalasa y reducción de nitratos, según la metodología estándar recomendada por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta (30) para clasificarla o no como *Mycobacterium tuberculosis*.

A los que resultaron cultivo positivo se les determinó la sensibilidad a drogas antituberculosas (rifampicina, isoniacida, pirazinamida, tioacetazona y ethambutol), según la metodología de las proporciones múltiples de Canetti y col. (31) en el laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud de Santa Fe de Bogotá, Colombia.

Posteriormente, se realizó la genotipificación mediante el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (32) en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, según los siguientes procedimientos:

aislamiento del DNA cromosómico del cultivo micobacteriano, estimación del DNA extraído, digestión del DNA por la enzima de restricción PVU II, separación de los fragmentos en gel de agarosa por electroforesis, transferencia de fragmentos de DNA a una membrana de nitrocelulosa e hibridización del DNA con sonda IS6110 marcada con fósforo 32.

RESULTADOS

Se recolectaron 150 muestras de esputo desde junio de 1995 hasta agosto de 1996 de pacientes sintomáticos respiratorios que acudieron a la consulta de Tisiología del Distrito Sanitario N° 3, del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social y al Servicio de Medicina Interna del HMPC. Hubo 14 baciloscopias positivas (9,3%) y 16 cultivos positivos para *Mycobacterium tuberculosis* (10,6%),

de los cuales 10 resultaron de muestras baciloscopia positiva (62,5%) y los restantes 6 resultaron de muestras baciloscopias negativas (37,5%). De las 14 muestras baciloscopias positivas, 10 resultaron cultivo positivo (71,4%), 3 cultivos negativos (21,4%) y 1 cultivo contaminado (7,14%) que fue descartado, el resto de cultivos contaminados resultaron de muestras baciloscopias negativas (Cuadro 1).

Cuadro 1
Relación entre baciloscopia y cultivo

Baciloscopia	Cultivo			Total n(%)
	Positivo	Negativo	Contaminado	
Positivo	10	3	1	14(9,3)
Negativo	6	128	2	136(90,7)
Total n(%)	16(10,7)	131(87,3)	3(2,0)	150

No se identificaron cepas diferentes a *Mycobacterium tuberculosis*.

El grupo de pacientes que demostró tuberculosis pulmonar por cultivo fueron 9 masculinos (56,25%) y 7 femeninos (43,75%) con edades comprendidas entre 15 y 69 años de edad (media: 45 años) (Cuadro 2), 7 procedían de la Unidad Sanitaria N° 3 y 9 de del Hospital Miguel Pérez Carreño. Los primeros provenían de la Parroquia San Juan, donde se ubica la Unidad Sanitaria y los segundos provenían de diversas áreas distantes entre si (Antímano, Baruta, Guarenas) (Cuadro 3).

Cuadro 2
Distribución de pacientes según edad y sexo

Edad (años)	Sexo		Total (n)
	Masculino	Femenino	
15-30	1	3	4
31-60	4	1	5
61-80	4	3	7
Total (n)	9	7	16

Cuadro 3

Distribución de pacientes según procedencia

Procedencia	n	(%)
Unidad Sanitaria N° 3	7	(43,75)
Hospital Miguel Pérez Carreño	9	(56,25)
Total	16	

Antecedentes de tuberculosis pulmonar se registraron en 3 pacientes (18,75%), de los cuales 2 recibieron 4 drogas durante 6 meses con egreso por curación y el restante recibió 3 drogas durante 5 meses con aparente evolución satisfactoria (Cuadro 4).

Cuadro 4

Distribución de pacientes según antecedente TBC

TBC	n	(%)
Si	3	(18,75)
No	13	(81,25)
Total	16	

Entre las patologías asociadas se encontraron diabetes mellitus en 2 pacientes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica en 1 paciente, asma bronquial en 1 paciente, paracoccidiodomicosis en un paciente e infección por VIH en un paciente. No se realizó serología para VIH en todos los pacientes por dificultades económicas.

Los patrones de sensibilidad a drogas antituberculosas, se realizaron en 15 de los 16 cultivos positivos por presentar crecimiento escaso la cepa restante. Los antibióticos estudiados fueron: isoniacida, rifampicina, estreptomycinina y thioacetazona y ethambutol. Tres cepas resultaron resistentes a drogas distintas: isoniacida, estreptomycinina y thioacetazona, lo que representa una resistencia global del 20%. El paciente resistente a estreptomycinina había recibido tratamiento antituberculoso previamente con 3 drogas por 5 meses y los dos pacientes restantes no tenían antecedentes de tratamiento anti TBC. No se encontró multirresistencia.

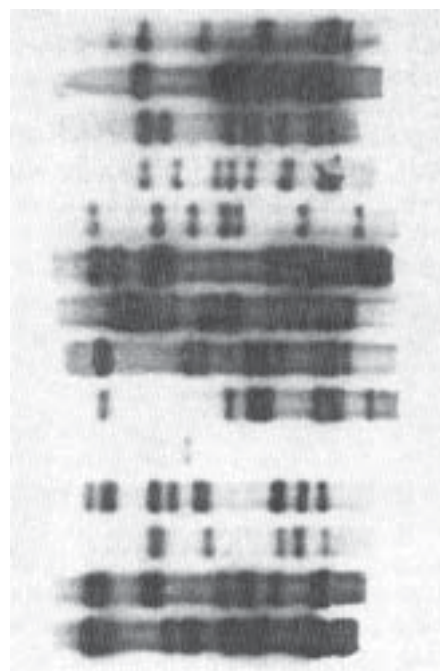


Figura 1. Autorradiografía de los polimorfismos de tamaño de los fragmentos IS6110 de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas.

La genotipificación mediante RFLP se realizó en catorce cepas (por escaso material en las dos restantes) y se encontraron patrones diferentes de distribución de los elementos de inserción del IS6110.

No se logró comparar estos patrones con los registrados en el Banco Mundial de patrones de RFLP, por no disponer de marcadores internos estandarizados para el momento del procesamiento, necesarios para ser incorporados al programa de computación destinado para tal fin.

DISCUSIÓN

La reactivación de la enfermedad tuberculosa a nivel mundial, y especialmente en nuestro país, constituye uno de los problemas de salud que mayor prioridad tiene en la actualidad, lo que nos obliga a afrontarla mediante la ejecución de medidas establecidas por el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, dirigidas a prevenir, diagnosticar y tratar oportuna y eficazmente a fin de lograr el control y disminuir así las tasas de morbimortalidad.

El presente trabajo muestra un porcentaje alto

(10,6%) de cultivos positivos para *M. tuberculosis*, si comparamos con lo esperado en el Distrito Federal (2%) (3), debido a que se procesaron muestras de esputo provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios con enfermedad avanzada, que son en su mayoría, los que acuden a los Centros de Salud, bien sea porque no reconocieron la enfermedad en sus etapas iniciales o no tuvieron acceso precozmente al servicio médico.

De los cultivos positivos, 37,5% provienen de muestras baciloscopia negativas, lo que expresa la importancia de la confirmación bacteriológica por cultivo para el diagnóstico de tuberculosis. Por otra parte, notamos la presencia de 3 cultivos negativos de muestras baciloscopias positivas (21,4%) que resultaron pacientes sin tuberculosis. La contaminación del medio de cultivo observada (2%) resulta baja, como fue demostrado por Kudoh y Kudoh (28), lo que asociado a una técnica fácil, mínimo tiempo de ejecución (3-5 minutos por muestra) y poco nivel de especialización, constituyen excelente y económico método a poner en práctica para aumentar la capacidad diagnóstica de esta enfermedad.

La gran cantidad de baciloscopias negativas se pueden atribuir, en un 50%, a la calidad de las muestras, secreción mucosa o líquida, que disminuyen la eficiencia de la baciloscopia para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis.

La población afectada correspondió a los grupos entre 31 a 70 años, lo que expresa compromiso de población activa que repercute directamente en la estabilidad socioeconómica de sus respectivas familias. Por otra parte, el estado de hacinamiento que muestra este grupo de pacientes es significativo (6,5 personas por paciente) lo que redundará en un mayor número de contactos y consecuente extensión de la cadena epidemiológica. El control de los contactos en el Distrito Federal, en los últimos cinco años, mantiene un promedio de 2,75 contactos por paciente diagnosticado (3).

Se mantiene presente la comorbilidad de tuberculosis con otras entidades como diabetes mellitus, paracoccidiodomicosis e infección por VIH en un 25% del total de pacientes diagnosticados. Desafortunadamente, no pudimos estudiar el status de infección por VIH, lo que nos limita establecer la relación TBC-VIH, estudiada desde esta década en casi todas las regiones del mundo (1,17,32-34).

Con respecto a la resistencia encontrada (20%), no podemos establecer comparaciones, en vista de que no disponemos de información escrita sobre

resistencia. Podemos inferir la existencia de resistencia secundaria en el paciente resistente a estreptomycin, porque había recibido tratamiento con 3 drogas durante cinco meses y consideramos como resistencia inicial o primaria las dos restantes por no informar antecedentes de tratamiento previo.

La identificación de las cepas mediante el análisis RFLP determinó la ausencia de relación epidemiológica al encontrar diferentes patrones de distribución de los elementos de inserción IS6110, lo que puede atribuirse a mayor frecuencia de casos de reactivación dada la coexistencia con enfermedades debilitantes y a la presencia de cepas aisladas de pacientes con domicilios distantes, ejemplo: Baruta, Guarenas, donde es poco probable que exista algún nexo epidemiológico, aunque tampoco existió entre pacientes que provenían de la misma comunidad, lo que refleja una amplia diversidad de cepas circulantes. Al comparar estos hallazgos genotípicos con el único estudio de análisis de RFLP realizado en el área metropolitana de Caracas (Toro y col. no publicado) encontramos que en 64 cepas estudiadas, el 30% fueron compartidas en al menos uno de varios pacientes, lo que revela que se trata de infecciones de transmisión reciente que indican microepidemias. Según nuestros resultados no existen microepidemias entre pacientes que proceden del área de afluencia del Distrito Sanitario N° 3 y mucho menos entre pacientes que fueron hospitalizados en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Miguel Pérez Carreño, debido a que no coincidieron en el tiempo, ni en la zona de procedencia para hacer factible la detección de las mismas.

No es posible tratar de relacionar los patrones de RFLP con los patrones de sensibilidad a drogas, en vista de no existir enlace epidemiológico entre las cepas que muestran resistencia a diferentes drogas, a diferencia de otros trabajos donde se han encontrado cepas multirresistentes con patrones similares de RFLP. Sin embargo, a pesar de no poder demostrar relación entre RFLP y patrones de resistencia, se ha establecido que la identificación de cepas por medio del RFLP podrá aplicarse en futuros estudios para determinar la frecuencia con la cual aparecen cepas multirresistentes y para evaluar la presencia de microepidemias y de los factores que favorecen la propagación de la tuberculosis en la comunidad. Se debe resaltar que en el grupo de pacientes estudiados no encontramos infecciones por otras mycobacterias.

REFERENCIAS

1. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. WHO Bulletin OMS, 1994;72(2):213-220.
2. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. JAMA 1995;273:220-226
3. Indicadores epidemiológicos 1995-1996. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Caracas, Venezuela.
4. Small P, Hopewell P, Singh S, Paz A, Parsonnet J, Ruston D, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. N Engl J Med 1994;330:1703-1709.
5. Alland D, Kalkut G, Moss A, Mc Adam R, Hahn J, Bosworth W, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. N Engl J Med 1994;330:1710-1716.
6. Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, Dellagi K. Large-scale DNA fingerprintings of Mycobacterium tuberculosis strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1993;31:2446-2450.
7. Warren N, Body B. Bacteriology and diagnosis. En: Rossman M, Mac Gregor R, editores. Mycobacterium tuberculosis. Nueva York: McGraw-Hill;1995.p.35-53.
8. O'Brien. Drug resistant tuberculosis: etiology, management and prevention. Semin Respir Infect 1994;9:104-112.
9. Hart C, Beeching N, Duerden B. Tuberculosis into the next century. J Med Microbiol 1996;44:1-34.
10. Chawla P, Klapper P, Kamholz S, Pollack A, Heurich A. Drug-resistant tuberculosis in an urban population including patients at risk for human immunodeficiency virus infection. Am Rev Respir Dis 1992;146:280-284.
11. Edlin B, Tokars J, Grieco M, Crawford J, Williams J, Sordillo E, et al. An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1992;326:1514-1521.
12. Shafer R, Small P, Lakin Ch, Sing S, Kelly P, Sierra M, et al. Temporal trends and transmission patterns during the emergence of multidrug-resistant tuberculosis in New York City: a molecular epidemiologic assessment. J Infect Dis 1995;171:170-176.
13. Aita J, Barrera L, Reniero A, López B, Biglione J, Weisburd G, et al. Hospital transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Rosario, Argentina. Medicina (Buenos Aires) 1996;56:48-50.
14. Rittacco V, Reniero A, Ambroggi M, Dambrosi A, Garone D, Barrera L, et al. Transmision intra e interhospitalaria de cepas multirresistentes de Mycobacterium tuberculosis entre pacientes con SIDA en Argentina: análisis genómico por fingerprinting. J Infect Dis 1997;176:637-642.
15. Galeano JA. Tuberculosis y SIDA en Paraguay. Bol Oficina Sanit Panam 1995;118:248-253.
16. Chevrel-Dellagi D, Abderrahman, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, Dellagi K. Large-scale DNA fingerprintings of Mycobacterium of M. tuberculosis. J Clin Microbiol 1993;31:2446-2450.
17. Genewin G, Telenti A, Brenasconi C. Molecular aproach to identifyng route of transmission of M. tuberculosis in the community. Lancet 1993;342:841-844.
18. Daley Ch, Small P, Schecter G, Schoolnik G, McAdam R, Phil D, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. N Engl J Med 1992;326:231-235.
19. Snider D, Kelly G, Cauthen G, Thompson N, Kilburn J. Infection and disease among contacts of tuberculosis cases with drug-resistant and drug-susceptible bacilli. Am Rev Respir Dis 1985;132:125-132.
20. García ML, Valdespino J, García MC, Salcedo R, Zacarías F, Sepúlveda J. Epidemiología del SIDA y la tuberculosis. Bol Of Sanit Panam 1994;116:546-565.
21. van Soolingen D, Hermans P, de Haas P, Soll D, van Embden J. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence -dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991;29:2578-2586.
22. Cave M, Eisenach K, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates J, Crawford J. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 1994;32(1):262-266.
23. van Soolingen D, De Hass P, Hermans P, Groenen P, van Embden. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 1993;31:1987-1995.
24. Gómez J, Rigouts L, Villeas L, Portaels F. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analisis and tuberculosis epidemiology. Bull of PAHO 1995;29:226-236.
25. Schiffman P, Ashkar B, Bishop M, Cleary M. Drug resistant tuberculosis in a large southern California hospital. Am Rev Respir Dis 1977;116:821-825.
26. Dwyer B, Jackson K, Raios K, Sievers A, Wilshire E, Ross B. DNA restriction fragment analysis to define and extended clusters of tuberculosis in homeless and their associates. J Infect Dis 1993;167:490-494.

27. Small P, Moss A. Molecular epidemiology and the new tuberculosis. *Infect Agents Dis* 1993;2:132-138.
28. Freeman B. *Microbiología de Burrows*. 22ª edición. México: Interamericana; 1986.p.691-696.
29. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ* 1974;51:71-82.
30. CDC Atlanta, Georgia. Procedures for the isolation and identification of Mycobacterias. 1995.
31. Canetti G, Wallace F, Khomenko A. Advances in techniques of testing Mycobacterial drugs sensitivity and the use of sensitivity test in tuberculosis control programs. *Bull World Health Organ* 1969;41:21-43.
32. van Soolingen D, Haas PEW, Hermans PWM, van Embden JDA. RFLP analysis of Mycobacteria. *Protocols MMB*, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Holanda.
33. Fujiwara P, Huberman R. Relación entre virus de la inmunodeficiencia humana, SIDA y tuberculosis en la ciudad de Nueva York. *Bol Of Sanit Panam* 1994;117:438-451.
34. Lazlo A, Kantor I. A random sample survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin América. *WHO* 1994;72:603-610.

“Sociedad Estudiantes de Medicina de Caracas Premio “Luis Razetti”

Caracas, 16 de marzo de 1935

En la sesión del 14 de marzo de 1935, el Br. Humberto García Arocha propuso la creación de un Premio que se habría de otorgar anualmente al mejor trabajo presentado en un Concurso promovido como Homenaje a la memoria del Doctor Razetti en el día aniversario de su muerte.

Acogida la proposición con gran entusiasmo, quedó encargada la Mesa Directiva de ultimar los detalles de su realización, comisión que ha sido cumplida de la manera siguiente:

La Sociedad de Estudiantes de Medicina

Considerando:

Que el 14 de mayo, día aniversario de la muerte del Doctor Luis Razetti, ha sido designado por nosotros “Día de Razetti”, y consagrado a honrar la memoria del esclarecido Maestro, que fue en vida personificación de actividad y sigue siendo aún para nosotros modelo de iniciativas y meta de aspiraciones, y estimando que nada habrá más digno de su memoria que un homenaje de trabajo.

Acuerda:

Único. Se establece con carácter definitivo que entre los actos conmemorativos de ese día se lleve a efecto un Certamen entre los Miembros de esta Sociedad, cuyo Premio será una medalla “La Medalla Luis Razetti”, la cual será otorgada al mejor trabajo según veredicto de un Jurado formado por tres Médicos, previamente designados al efecto.

Los componentes del Jurado, las bases del Concurso y los otros detalles pertinentes, serán comunicados por la Junta Directiva, cada año, con la debida anticipación.

Por su carácter permanente, este Acuerdo pasa a ser artículo de los Estatutos y como tal debe ser considerado.

Por la S.E.M.

Pablo Izaguirre
(Presidente)

Hernán Hedderich
(Secretario)” (*Gac Méd Caracas* 1935;42:122)