

Invest. Medicoquir 2020 (mayo-agosto); 12 (2)

ISSN: 1995-9427, RNPS: 2162

ARTICULO DE REVISION

Tuberculosis. Epidemiología Molecular.

Tuberculosis. Molecular epidemiology

Ariadna Calzado Benítez,¹ Nereyda Oliva Núñez,¹ Rolando Vergara Águila.¹

¹ Servicios Médicos. Playa, La Habana.Cuba

RESUMEN

La reemergencia de la Tuberculosis (TB) en el mundo ha despertado el interés en el entendimiento de la epidemiología y patogénesis de esta enfermedad. Con el uso y el establecimiento de la epidemiología molecular como nueva disciplina se adicionó otra dimensión a la epidemiología clásica de la TB y ha incrementado el conocimiento de la dinámica de la transmisión de *M. tuberculosis* dentro de una población. El descubrimiento de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) repetitivas en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis*, como la IS6110, ha permitido desarrollar técnicas moleculares confiables en la caracterización de cepas de esta especie, así como la determinación de linajes y su distribución geográfica. En Cuba ha sido útil en el estudio de brotes en Instituciones Cerradas y la determinación de los patrones genéticos circulantes en el país. Aún existen grandes retos que implican incorporar la Epidemiología Molecular en los Programas de Prevención y Control de la TB.

Palabras clave: tuberculosis, epidemiología molecular, transmisión reciente.

ABSTRACT

The reemergence of tuberculosis in the world has sparked interest in understanding the epidemiology and pathogenesis of this disease. With the use and establishment of molecular epidemiology as a new discipline, another dimension was added to the classical epidemiology of tuberculosis and the knowledge of the dynamics of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* within a population has increased. The discovery of repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) sequences in the *Mycobacterium tuberculosis* chromosome, such as IS6110, has allowed the development of reliable molecular techniques in the characterization of strains of this species, as well as the determination of lineages and their geographical distribution. In Cuba, it has been useful in the study of outbreaks in closed institutions and in determining the circulating genetic patterns in the country. There are still great challenges that involve incorporating molecular epidemiology in tuberculosis prevention and control programs

Key words: tuberculosis, molecular epidemiology, recent transmission.

INTRODUCCIÓN

La epidemiología molecular es una disciplina que emplea elementos de la epidemiología clásica apoyado en resultados obtenidos mediante herramientas moleculares.¹ En el campo de las enfermedades transmisibles ha sido definida como el uso de diversos métodos moleculares para agentes infecciosos con el objetivo de determinar su distribución, dinámica y determinantes de salud y enfermedad en poblaciones humanas.²⁻⁷

Los métodos de tipificación molecular son utilizados en el estudio de la organización del genoma y la evolución de los patógenos para identificar las fuentes de infección y de transmisión, como componente estándar de la vigilancia de enfermedades infecciosas y como soporte en la investigación de brotes. Estos métodos no sustituyen una investigación epidemiológica, los estudios de laboratorio y epidemiológicos deben ser analizados en paralelo y sus resultados integrados como componentes complementarios a la investigación.²⁻⁷

La reemergencia de la Tuberculosis (TB) en el mundo ha despertado el interés en el entendimiento de la epidemiología y patogénesis de esta enfermedad. Con el uso y el establecimiento de la epidemiología molecular como nueva disciplina se adicionó otra dimensión a la epidemiología clásica de la TB y ha incrementado el conocimiento de la dinámica de la transmisión de *M. tuberculosis* dentro de una población. En el proceso han sido identificados problemas en los programas de control, contribuyendo a la obtención de recursos para su mejoramiento e implementación. Aún más, se ha resaltado la necesidad de la continua vigilancia esta enfermedad.²⁻⁷

El descubrimiento de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) repetitivas en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis*, como la IS6110, ha permitido desarrollar técnicas moleculares confiables en la caracterización de cepas de esta especie. Un ejemplo de estas es el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, siglas en inglés) que es considerada actualmente como la técnica de referencia en estudios de epidemiología molecular. Con el RFLP-IS6110 se han detectado y estudiado varios brotes de TB en poblaciones.⁸⁻¹²

En Cuba la aplicación de estas modernas tecnologías en la tipificación genética de micobacterias se inició en 1994 en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Mycobacteria del Instituto Pedro Kourí (LNRITM-IPK). Desde entonces el RFLP-IS6110 ha sido empleado en el estudio de brotes de TB en Instituciones Cerradas y en la comunidad.¹³⁻¹⁶

Estudio de la dinámica de transmisión de tuberculosis

La dinámica de transmisión se refiere básicamente a la velocidad de propagación de una enfermedad infecciosa a través de la población, que es medida mediante la tasa de reproducción de la infección. Este parámetro toma en cuenta la locación espacial, la tasa de contagio entre grupos y la infecciosidad entre cada caso. La epidemiología clásica utiliza el estudio de los contactos tuberculosos para aproximarse a la dinámica de transmisión de la TB, investigando familiares, compañeros de trabajo, convivientes y personas cercanas a un caso de TB

confirmado, midiendo la carga de TB entre contactos, los factores de riesgo y el tiempo de ocurrencia de un caso secundario. Así, ha sido posible determinar el riesgo de contraer TB de forma intra-domiciliar y en la comunidad.¹⁷⁻²²

Reactivación endógena y reinfección exógena

En países donde existe un gran porcentaje de la población expuesto al *Mycobacterium tuberculosis* es difícil encontrar cifras exactas, pero muchos de los expuestos al bacilo no llegan a ser infectados por éste o lo eliminan rápidamente, mientras que otro grupo desarrolla la infección por TB. Según el paradigma convencional, dentro de este grupo es posible encontrar los siguientes estadios de la enfermedad: la primoinfección o TB primaria (generalmente en la niñez), la TB posprimaria temprana dentro de los primeros años del contagio (cerca del 10% de las personas infectadas), y la TB latente, en la cual los pacientes pueden mantener inactiva la enfermedad por largos periodos. Si el paciente con TB latente desarrolla la infección activa, se denomina reactivación endógena. Existe además la posibilidad de que un mismo paciente con antecedente de TB pueda adquirir nuevas infecciones por; lo que se denomina reinfección exógena.¹⁷⁻²²

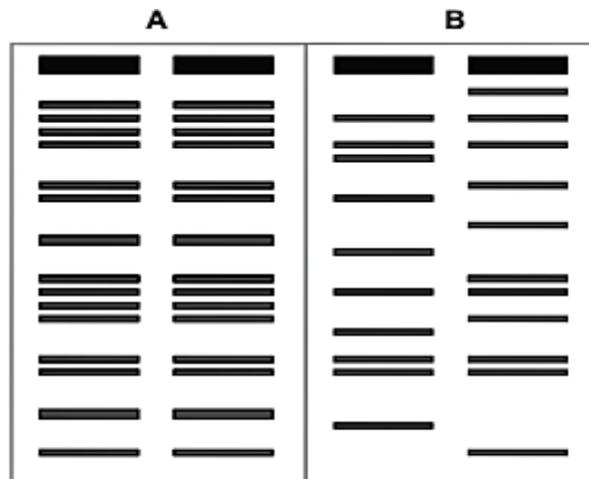
En lugares de baja prevalencia, el 80% de los casos de TB activa provienen de una infección latente reactivada. En estos lugares, el criterio epidemiológico es muy útil para determinar cómo TB reactivada a la presencia de enfermedad activa en un paciente con antecedente de TB. Sin embargo, en países de alta prevalencia, la de las formas se deben a TB posprimaria temprana y a reinfecciones exógenas.

Aportes del estudio molecular a la epidemiología clásica

- Discriminación de recurrencias debidas a reactivaciones o reinfecciones e identificar casos con infecciones mixtas.
- Identificación de casos infectados por una misma cepa (transmisión reciente) y agruparlos en clusters.
- Definición de la distribución internacional de linajes de *M. tuberculosis*, de cepas de alto riesgo o analizar aspectos evolutivos ⁽¹⁷⁻²²⁾.

En la Figura 1 se aprecia cómo se puede diferenciar una reinfección exógena de una reactivación endógena mediante métodos moleculares ⁽²²⁾.

Figura 1.



A. Se muestra la comparación entre dos muestras con huellas idénticas de RFLP del IS6110. En este caso, se podrían esperar nexos epidemiológicos entre los pacientes y suponer que se trata de transmisión activa de la enfermedad por una fuente común o reinfección exógena. **B.** Cuando las muestras proveen patrones diferentes de RFLP IS6110 no se esperarían que estén relacionadas epidemiológicamente se podría suponer que corresponde a una reactivación endógena.

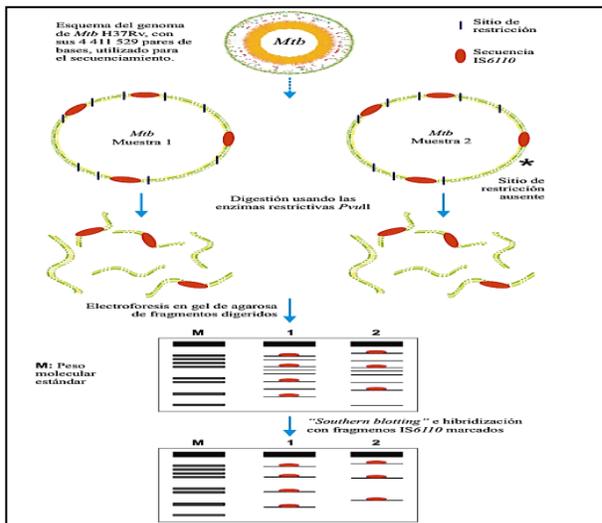
Métodos Moleculares para el estudio de la Tuberculosis

El mejoramiento de los sistemas de estudio, donde el acceso a la información de los diferentes genotipos es clave, permite a los investigadores no sólo realizar evaluaciones retrospectivas, sino también estudios prospectivos que generen intervenciones oportunas para la mejora del programa de control de la enfermedad. Los métodos moleculares no sólo han contribuido en el diagnóstico sino también en la tipificación y la detección de resistencia a drogas en el estudio de TB.²³⁻²⁶

La mayoría de los primeros estudios de epidemiología molecular aplicados en TB se basaron en el uso del método RFLP de la secuencia de inserción IS de y -debido a su reproducibilidad, poder discriminatorio y relativo bajo costo- fue considerado por varios años el método de referencia, permitiendo caracterizar genéticamente aislamientos de discriminando entre cepas relacionadas y no relacionadas, en la identificación y estudio de resistencia.²³⁻²⁶

En los últimos años se han desarrollado métodos alternativos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales podría mejorar los sistemas de intervención, utilizando los VNTR (variable number tandem repeat). En paralelo, investigaciones más tradicionales han sido mejoradas con la inclusión de marcadores fluorescentes en el análisis IS-Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).²³⁻²⁶

La integración de nuevas herramientas para el estudio de genotipo incluye el spoligotipo y Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTRs) locus 12, 15 o 24. Esto ha permitido mejorar las investigaciones epidemiológicas clásicas sobre todo por la posibilidad de contar con una base de datos disponible para comparar los datos a partir de MIRU-VNTR (23-26).



Métodos para estudio de ácidos nucleicos

IS6110-RFLP

Figura 2_ muestra un esquema de la prueba de RFLP IS6110 para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* (*Mtb*) de dos muestras

La secuencia de inserción 6110 (IS6110) que se detecta en las especies

del complejo tiene 1 361 pares de bases (pb). En un inicio, esta secuencia fue utilizada para la detección de en muestras clínicas mediante la amplificación de ADN. El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del gen IS6110 ha contribuido en el estudio epidemiológico discriminando cepas relacionadas y no relacionadas de modo clonal.^{14-16, 22, 24} Este método está basado en las variaciones encontradas en el número de copias y localización en el genoma de la secuencia de inserción IS6110 que ocurren de una cepa a otra, patrones diferentes de RFLP-IS6110 sugieren cepas epidemiológicamente no relacionadas y patrones idénticos representan la transmisión reciente de la cepa dentro de la población.^{14-16, 22, 24}

Pruebas basadas en PCR

• Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Se basa en la ligación de adaptadores a fragmentos de restricción selectivos y posterior amplificación de los mismos mediante PCR con iniciadores específicos que se unen a dichos adaptadores. Para ello se requiere una pequeña cantidad de DNA genómico purificado (10-100 ng) que es digerido con enzimas de restricción y los adaptadores de doble cadena se ligan a los fragmentos de restricción obtenidos. Posteriormente, se realiza una amplificación mediante PCR con iniciadores marcados radiactivamente, y los productos de tal amplificación son separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida. Debido a los problemas derivados del uso de iniciadores marcados radiactivamente, también se han desarrollado iniciadores fluorescentes que permiten la detección de los fragmentos en aparatos de secuenciación automática.²⁶⁻²⁸

• Spoligotyping

Consiste en la amplificación del locus DR, el cual contiene múltiples secuencias bien conservadas de un tamaño de 36 pb y que se encuentran separadas por secuencias no repetitivas de 34 a 41 pb llamados espaciadores; solo 43 de 94 espaciadores son usados para genotipificación.²⁶⁻²⁸

• MIRU-VNTRs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeats):

Tiene reproducibilidad y poder discriminativo cuando se usa en asociación. La técnica basa en la amplificación mediante PCR de una región locus DR (direct repeat) altamente polimórfico, obteniéndose un patrón (perfil de espoligotipo) Mediante una PCR se amplifica una selección de loci MIRU-VNTR. Estos loci (locus 12, 15 y 24) son elementos que se repiten en tándem (de 40 a 120 pares de bases) y están localizados en regiones intergénicas del genoma de los miembros del complejo Este método está siendo considerado como referencia en el estudio epidemiológico de cepas de. *Mycobacterium tuberculosis*.²⁶⁻²⁸

Métodos comerciales

- **GenoType® MTBDRplus**

Prueba de hibridación en fase sólida, puede detectar e identificar el complejo a partir de aislamientos en cultivos y muestras clínicas. Sin embargo, su aplicación mayor es la detección de resistencia rifampicina e isoniacida.

- **GeneXpert System**

Mediante PCR en tiempo real, amplificación y detección simultánea mediante sondas marcadas. A partir de muestras clínicas con la adición de hidróxido de sodio y alcohol, utiliza un cartucho y permite detectar la secuencia blanco. El sistema GeneXpert MTB/RIF incluye la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y de la resistencia a rifampicina en un mismo análisis.²⁶⁻²⁸

Linajes del Mycobacterium tuberculosis

Los métodos de epidemiología molecular han sido de ayuda para determinar los diversos linajes existentes a nivel mundial con el objetivo de determinar el origen de las cepas circulantes. La expansión humana y la alta densidad de la población en las ciudades sobrepobladas en los siglos XVIII y XIX en Europa, pudieron haber tenido una selección “menos cautelosa” de las bacterias, ya que el acceso a los huéspedes susceptibles no era un factor limitante. Esto podría explicar por qué los linajes modernos son más virulentos y tienen mayor éxito evolutivo, lo que permite inferir una eficiente propagación geográfica comparada con los linajes ancestrales⁽²⁹⁾.

Las inferencias filogenéticas más recientes, revelan que los linajes del complejo *Mycobacterium tuberculosis* adaptados a los humanos tienen una fuerte estructura fitogeográfica, que comprende 7 linajes principales que divergen desde un ancestro común y se diversifican en diferentes regiones del mundo. Desde mediados del año 2000 a través de genómica comparativa y biología molecular, se identificaron polimorfismos de largas secuencias (LSPs) que permitieron diferenciar *M. tuberculosis* en 6 diferentes linajes definidos por su lugar de origen: Linaje 1 (Indo-Oceánico), Linaje 2 (Asia Oriental), Linaje 3 (Oriente de África y centro/sur de Asia), Linaje 4 (Euro-Americano), Linaje 5 (*M. africanum* África Occidental 1) y linaje 6 (*M. africanum* África Occidental 2); recientemente se describió el Linaje 7 (Etiopia), y está restringido a Etiopia, el cual representa una rama filogenética intermedia entre los

linajes ancestrales y modernos . Los Linajes 2 y 4 son geográficamente más expandidos que los demás y dentro de los Linajes, los sublinajes también difieren en su distribución geográfica.³⁰⁻³²

Todos los linajes del CMT son divididos en sublinajes, basados en la metodología de spoligotyping. Las bases de datos creadas alrededor del mundo, incluyen 7.104 spoligotipos correspondientes a 58.187 aislados clínicos obtenidos en 102 países. De los 7.104 spoligotipos, 24 representan la mayoría de los aislados clínicos caracterizados. Esto podría indicar que algunas familias se transmiten más eficientemente que otras.^{33,34} Entre los sublinajes más grandes se reportan los siguientes:

- Beijing: se describió en 1995. Representan alrededor del 50% de las cepas en el Lejano Oriente de Asia y el 13% de los aislados globales.
- CAS (Central Asian): Descrito por Bhanu NV. Esencialmente localizado en el sur de Asia e India; sin embargo, también se encontró en África, América Central, Europa, lejano oriente de Asia, Norte América y Oceanía.
- East African Indian (EAI): Descrito en 1999. Es más prevalente en el sur este de Asia.
- Haarlem (H): descrito en 1999 en Holanda. Representa el 25% de las cepas de Europa y América.
- LAM (Latin American Mediterranean): Su mayor presencia se encuentra en Venezuela, el Mediterraneo y la región del Caribe.
- MANU: nueva familia de la India. Se encuentra principalmente en el lejano Oriente de Asia, Oriente Medio - Asia Central y Oceanía.
- T: conocido como cepas modernas de TB. Fue encontrado en todos los continentes y corresponde al 30% a nivel mundial.
- X: Es prevalente en UK, Estados Unidos y colonias británicas. Está relacionada con ancestros británicos.
- S: es altamente prevalente en Sicilia y Sardinia.

Una de las familias o sublinajes más estudiados ha sido la familia Beijing, denominada así porque se identificó en la provincia de Beijing – República China en

1995. Varios estudios afirman que el genotipo Beijing está asociado con la resistencia a los medicamentos y es responsable de los brotes de TB-Multidrogorresistente. Estos genotipos muestran gran correlación con resistencia a rifampicina y ofloxacina.³⁵

Análisis de resultados obtenidos en Cuba y otros países.

El estudio de la distribución de la TB en una población determinada mediante métodos moleculares persigue tres fenómenos: el primero, se refiere al agrupamiento de los patrones genéticos en una determinada población de pacientes, estimando el grado de reactivación o transmisión activa de una población, el segundo, es la distribución de la clonalidad tratando de identificar focos de infección que ayuden a controlar de una manera más ordenada y óptima la transmisión de la tuberculosis y el tercero, se refiere a determinar genotipos específicos con alto grado de virulencia y patogenicidad.³²

Un estudio realizado, en un hospital referencial del Callao, halló 50 perfiles genéticos, RFLP IS de 70 aislamientos donde 34 (48.6%) se agruparon en 14 y 36 tuvieron ocurrencia única. Los autores concluyeron que esto posiblemente se deba al alto número de infecciones reactivadas.³⁶ Un estudio en Ecuador mediante la técnica AFLPs permitió agrupar a las cepas en doce patrones (P1 a P8, P10, P12, P13, P14), de los cuales los más prevalentes fueron los patrones P1 y P2 con 77 (61,1%) y 27 (21,4%) aislados respectivamente, lo que supone el 82,5% del total de los mismos. Le siguieron en frecuencia el patrón P5 con 5 (3,9%) aislados, los patrones P3, P4 y P6 agruparon a 3 aislados cada uno (2,4%), los patrones P8 y P12 con 2 aislados (1,6%) y finalmente los patrones P7, P10, P13 y P14 con 1 aislado cada uno (0,8%).³⁷

En Cuba, se realizó un estudio con el método RFLP-IS6110 en el año 1998 donde no se incluyó la provincia de la Habana, de los 51 pacientes investigados, 23 (45%) presentaron patrón idéntico y se incluyeron en 7 clusters; consistían en casos que se relacionaban con personas que vivían en Instituciones Cerradas en las provincias de Villa Clara y Camagüey.¹⁵ En el año 2009, una investigación en la Habana arrojó que, de los 186 casos, se agruparon 33 con patrón similar y en 5 clusters donde el 45

% presentaba transmisión reciente y el antecedente de vivir en Instituciones Cerradas estaba fuertemente asociado.³⁸ Otro estudio de un brote en el Hospital Psiquiátrico de La Habana evidenció que los hallazgos moleculares y convencionales permitieron confirmar el carácter del brote, así como definir el caso índice y la posible vía de transmisión.¹⁴

Diversas cepas identificadas en brotes, están asociadas a grandes clusters. Su distribución geográfica y espacial sugieren que hay cepas que pueden causar más transmisión de la enfermedad que otras.³⁹ Se plantea que puede existir un vínculo entre la localización geográfica y el número de IS6110. Un estudio inicial basado en el análisis IS determinó que algunos de las cepas de las regiones de África Central, de zonas de alta incidencia estaban relacionados con casos en Holanda, donde la transmisión es baja y la mayoría de los casos se debe a la reactivación de una TB Latente.³⁹

Una revisión sistemática plantea que existe una distribución geográfica particular de la cepa Beijing/W.^{40,41} Esta cepa multidrogo-resistente fue responsable de causa de muerte en pacientes y en trabajadores de la salud en brotes nosocomiales y otras Instituciones detectados en Nueva York en los años 90, aislándose más tarde en otras áreas de los Estados Unidos.⁴² Una investigación realizada en Beijing, arrojó que del 85% de las cepas aisladas el 66% presentaban similar patrón IS6110 RFLP, esta cepa se ha aislado en proporciones elevadas en otras regiones de Asia ⁽⁴³⁾. En Rusia se detectaron en población civil y en internos.⁴⁴

En Latinoamérica se realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la contribución de la infección con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* genotipo Beijing en la transmisión de la TB en Suramérica. Se detectó que de las 19 cepas tipo Beijing; genotipo RFLP IS y posteriormente confirmadas por Spoligotyping., 11 provenían de Perú, atribuyendo esto a la inmigración China al Perú en el siglo XIX.²²

Una investigación realizada en Colombia, concluyó que se identificaron en total 15 patrones espoligotipo diferentes, de los cuales el 91,8% pertenecían al linaje Euro Americano, con predominio del sub-linaje Haarlem (55%).⁴⁵

Estudios realizados en el territorio nacional, abogan sobre una tipificación con oligonucleótidos espaciadores de *Mycobacterium tuberculosis* durante el 2009-2010;

la investigación concluyó que los patrones genéticos generados por *Spoligotyping* de los 308 aislamientos estudiados fueron muy variables, identificándose siete linajes. De manera individual, predominó la familia Beijing (25,6 %), seguido por los genotipos S (19,2 %), LAM (16,9 %), Haarlem (16,9 %), T (5,8 %), U (0,3 %) y X (0,3 %).⁴⁶ Otra investigación muestra que, de las 160 cepas existentes en el país, 23 de ellas tenían el 80% de similitud con el fenotipo Beijing. Este fenómeno es posible relacionarlo con la inmigración China a nuestro país que comenzó a mitad del siglo XIX.⁴⁷

Es evidente el aporte del estudio molecular de la Tuberculosis en el control de la enfermedad. Se concluye que: existen grandes retos aún para el futuro que incluyen: desarrollar estrategias que integren la epidemiología molecular en los Programas de Prevención y Control, identificar grupos de riesgo, mejorar los estudios de contactos, identificar puntos débiles en los programas de control, evaluar de programas y encontrar técnicas moleculares más rápidas y fácilmente comparables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Arpajón Y, Sosa AL, Doval R Contribuciones de la técnica de la Reacción en Cadenas de la Polimerasa a la Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas en Cuba. Rev haban cienc méd 2014; 13 (6).
- 2) Boccia S, Pasquarella C, Colotto M, Barchitta M, Quattrocchi A, Agodi A, and the Public Health Genomics and GISIO Working Groups of the Italian Society of Hygiene, Preventive Medicine and Public Health (SIItI). Molecular epidemiology tools in the management of healthcare-associated infections: towards the definition of recommendations. Epidemiol Prev. 2015; 39 (5): 21-26.
- 3) Field N, Cohen T, Struelens MJ, et al. Strengthening the Reporting of Molecular Epidemiology for Infectious Diseases (STROME-ID): an extension of the STROBE statement. Lancet Infect Dis 2014; 14: 341–52.
- 4) Struelens MJ, Brisse S. From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases. Euro Surveill 2013;18(4):20386.

- 5) Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Quattrocchi A, Bellocchi P, Poulou A, et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. *J Hosp Infect.* 2014; 86(4): 260-6. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.001.
- 6) Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiol* 2014; 37:1-15.
- 7) Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, Van Dijn Jm, Laurent F, et al, on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18(4):20380.
- 8) Marcos V. Burgos 1, Juan Camilo Méndez 1, Wellman Ribon 1,2. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. *Biomédica* 2004;24(Supl.):188-201.
- 9) Boccia S, Pasquarella C, Colotto M, Barchitta M, Quattrocchi A, Agodi A, and the Public Health Genomics and GISIO Working Groups of the Italian Society of Hygiene, Sujatha Narayanan. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120, October 2004, pp 233-247.
- 10) Daley CL. Molecular epidemiology: a tool for understanding control of tuberculosis transmission. *Clin Chest Med.* 2005 ;26(2):217-31.
- 11) Hernández JE, Murcia MI, de la Hoz F. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en Bogotá en Aislados Clínicos obtenidos durante 11 Años. *Rev. salud pública* 2008; 10(1).
- 12) Murcia MI, Leao SC, Rittaco V, Palenque E, de Oliveira RS, Reniero A, et al. Distribución de patrones PRA en aislamientos clínicos del complejo *Mycobacterium avium* procedentes de España y Suramérica. *Biomédica.* 2004; 25: 22-33.
- 13) Díaz R, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Analysis of *Mycobacterium*. Tuberculosis strains isolated during an outbreak of HIV-infected patients by DNA fingerprinting. *Am J Trop Med Hyg*1995;53(2):155-6
- 14) Gómez RI, Díaz R, García N, Valdivia JA. Estudio epidemiológico-molecular de un brote de tuberculosis en el hospital psiquiátrico de La Habana. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2000;38(3).
- 15) Díaz R, Gómez RI, García N, Valdivia JA, Soolingen G. Transmission of in Havana, Cuba; a molecular epidemiology study by IS6110 restriction fragment

length polymorphism typing. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 2001;96(4):437-43

16) Diaz R, Kremer K, de Haas PE, Gomez RI, Marrero A, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 743-50.

17) Jara B, Navarrete O, Abad A, Calvo J, Pérez A, Ramos A. Tuberculosis en la población inmigrante del Área 10 de Madrid. Rev Patol Respir 2006; 9(3): 120-124.

18) Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. Eur Respir J Suppl. 2002 ;36:54s-65s.

19) Van Helden P. Molecular Epidemiology of TB: Challenging Dogmas and Asking New Questions. IUBMB Life 2002; 53: 219–223.

20) Reinfección exógena en un área con moderada incidencia de TB (Las Palmas de Gran Canaria). 1991-1996: AJRCCM 2001; 163: 717-20)

21) Reinfección exógena en un área con alta incidencia de TB (Sudáfrica) 1992-1998: NEJM 1999; 341: 1174-79.

22) Wong P, Puray M, Gonzales A, Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. 2011; 15 (1).

23) Aranaz A, Romero B, Montero N, Álvarez J, Bezos J, De Juan L, Mateos A, Dominguez L. Spoligotyping Profile Change Caused by Deletion of a Direct Variable Repeat in A Isogenic *Mycobacterium tuberculosis*. Laboratory Strain. 2004; 42(11): 5388-91.

24) Spurgiesz RS, Quitugua TN, Smith KI, Schupp J, Palmer EG, Cox RA, Keim P. Molecular Typing of by Using Nine Novel Variable-Number Tandem Repeats Across the Beijing Family and Low-Copy-Number IS6110 Isolates. 2003; 41(9): 4224-30.

25) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic Diversity in The *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Based on Variable Numbers of Tandem DNA Repeats.1998; 144 (5): 1189-96

26) Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcaide F. Rapid Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex and Rifampin Resistance in Smear-Negative Clinical Samples by use of an Integrated Real-Time PCR Method. 2011; 49(3): 1137-9.

- 27) WHO. UNITAID. Tuberculosis Diagnostic Technology and Market Landscape, 3rd edition. Geneva: World Health Organization., 2014. [Internet]. 2014 [Consultado el 23 de agosto de 2017] Disponible en:http://www.unitaid.eu/images/marketdynamics/publications/UNITAID_TB.
- 28) Frick M., Lessem E., McKenna L. 2016 pipeline report. Tuberculosis (TB) Edition. Diagnostics, treatment, prevention and vaccines in development. Action Group. London/New York [Internet]. 2016 [Consultado el 23 de agosto de 2017] Disponible en:<http://www.pipelinereport.org/sites/g/files/g575521/>.
- 29) Lienhardt C, Glaziou P, Uplekar M, Lonnroth K, Getahun H, Raviglione M. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nature reviews*. 2012;10(6):407-16.
- 30) Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological reviews*. 2015;264(1):6-24 Comas I, Homolka Susanne, Niemann Stefan, Gagneux Sebastien. 2009. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Serquencing in *Mycobacterium Tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLoS ONE*, 4(11): e7815
- 31) Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable hostpathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(8):2869-73.
- 32) Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, et al. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS biology*. 2008;6(12): e311.
- 33) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology*. 2006; 6:23.
- 34) Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(11):1347-9.
- 35) Tao Luo, Iñaki Comas, Dan Luo, Bing Lu, Jie Wu, Lanhai Wei, Chongguang Yang, Qingyun Liu, Mingyu Gan, Gang Sun, Xin Shen, Feiying Liu, Sebastien Gagneux, Jian Mei, Rushu Lan, Kanglin Wan, and Qian Gao. 2015. Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese. *PNAS* 2015 112 (26) 8136-814.

36) Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC, Etha, Inha, and Kat G. Loci of Ethionamide-Resistant Clinical Mycobacterium Tuberculosis Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003; 47: 3799–80.

37) Jiménez AP. Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante herramientas moleculares en Ecuador [Tesis para optar por título de Doctor en Ciencias]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2015.

38) González A, Battaglioli T, Diaz R, Goza R, González Edilberto, Van Der Stuyft P. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Havana, Cuba, 2009. *Trop Med Int Health* 2015;20 (11):1534-1542.

39) Casper C, Singh SP, Rane S, Daley CL, Schechter GS, LW, et al. The transcontinental transmission of tuberculosis: a molecular epidemiological assessment. *Am J Public Health* 1996; 86: 551-3.

40) Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 843-9.

41) Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR, Jr., Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphism. *N Engl J Med* 1992; 326: 231-5.

42) Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V, Stockbauer K, Pan X, Lutfey ML, et al. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* 1996; 275: 452-7.

43) Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gookom T, Kremer K, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotypes emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 302-5.

44) Kurepina N, Shashkina E, Sloutsky A, Naroditskaya V, Safonova S, Chernousova L, et al. RFLP and DST data on Mycobacterium tuberculosis cultures isolated from patients in prison and civilian populations in Russia.

45) Beltrán MY. Genotipificación de Mycobacterium Tuberculosis en aislados clínicos obtenidos de pacientes VIH positivos de los hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá. [Tesis para optar por título de Máster en Ciencias en Infecciones y Salud en el Trópico Bogotá]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia;2016.

46) Herrera YM; Fonseca CM; Gozá R; Martínez IM; Lemus D; Llanes MJ; Marrero A; Díaz R. Tipificación con oligonucleótidos espaciadores de

Mycobacterium tuberculosis en Cuba. Revista Cubana de Medicina Tropical 2015;67(1):85-96.

47) Díaz R. Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y su implicación del control de la Tuberculosis en Cuba. [Tesis para optar por título de Doctor en Ciencias]. La Habana: IPK; 2003.

Recibido 12 de noviembre de **2019**

Aceptado 12 de febrero de 2020

Ariadna Calzado Benítez Dirección de Seguridad Personal. 5ta ave y 222. Playa.

Teléf.: 78582312-14.

Correo electrónico: ariadnacb@infomed.sld.cu.