

## **Patrones genéticos, sublinajes y dinámica de transmisión de tuberculosis en Cuba, país de baja carga**

Genetic patterns, sublineages and dynamics of tuberculosis transmission in Cuba, a low burden country

Ileana Margarita Martínez-Rodríguez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6698-5031>

Yoslany Mercedes Herrera-Avila<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7908-0546>

Roxana Gozá-Valdés<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4801-7816>

Andrea María Rodríguez-Bertheau<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4305-3367>

Raúl Díaz-Rodríguez<sup>5\*</sup> <https://orcid.org/0009-0006-9835-9733>

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Médicas de las Fuerzas Armadas Revolucionarias (FAR), Departamento de Especialidades Médicas, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad de Las Américas (UDLA), Facultad de Medicina, Quito, Ecuador.

<sup>3</sup>Hospital General Docente “Enrique Cabrera”, Departamento de Microbiología, La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>5</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), La Habana, Cuba.

\* Autor para la correspondencia: [raul.diaz@infomed.sld.cu](mailto:raul.diaz@infomed.sld.cu)

### **RESUMEN**

**Introducción:** En Cuba, país con baja incidencia de tuberculosis (TB), no existe información sobre la dinámica de transmisión de la enfermedad desde hace dos décadas.

**Objetivo:** Determinar los patrones genéticos y sublinajes de los aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) circulantes en el año 2009 y su relación con los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes.

**Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo en Cuba con 178 aislamientos de MTBC. Se realizó el espoligotipaje y el tipaje con unidades repetitivas intercaladas de micobacterias con repetición en tándem de número variable (MIRU-VNTR) con 24 *loci*. Para el análisis estadístico, se utilizaron métodos no paramétricos, análisis de varianza y prueba de homogeneidad.

**Resultados:** El espoligotipaje produjo 39 espoligotipos, prevaleciendo los sublinajes S, Beijing, LAM y Haarlem. El rango de agrupamiento fue del 75,84 % y el índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI): 0,8734. El tipaje por MIRU-VNTR con 24 *loci* definió 154 patrones genéticos: seis agruparon 30 aislados y 148 mostraron patrones únicos. El rango de de agrupamiento fue del 14,60 % y el HGDI: 0,9926. Hubo predominio de los sublinajes por región: S, Beijing y LAM en Occidente, Centro y Este, respectivamente.

**Conclusiones:** Se reporta la dinámica de transmisión de la TB en Cuba en el año 2009, infiriéndose que esta ocurre de manera limitada y la pertenencia a grupos de riesgo no favorece la transmisión. Sirve para evaluar un megaproyecto del Fondo Mundial para reducir la transmisión de la TB en este país. La estructura genética poblacional de MTBC se asemeja a la de un país iberoamericano, con la excepción de la alta frecuencia de los sublinajes Beijing y S.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*; tipaje molecular; Cuba; tuberculosis; biología molecular; transmisión; epidemiología molecular; caracterización molecular

## ABSTRACT

**Introduction:** In Cuba, a country with a low incidence of tuberculosis (TB), there is no information about of the dynamics of transmission of the disease for two decades.

**Objective:** Determine the genetic patterns and sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) isolates circulating in 2009 and their relationship with the epidemiological data of the patients.

**Methods:** A retrospective descriptive study was carried out in Cuba with 178 MTBC isolates. Spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive-unit–variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing with 24 *loci* were performed. For statistical analysis, non-parametric methods, analysis of variance and homogeneity test, were used.

**Results:** Spoligotyping produced 39 spoligotypes. The S, Beijing, LAM and Haarlem sublineages prevailed. The clustering rate was 75.84 % and the Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI): 0.8734. MIRU-VNTR typing with 24-*loci* defined 154 genetic patterns: six grouped 30 isolates and 148 showed unique patterns. The clustering rate was 14.60 % and the HGDI: 0.9926. There was a predominance of sublineages by region: S, Beijing and LAM in the West, Center and East, respectively.

**Conclusions:** The dynamics of TB transmission in Cuba in 2009 is reported, inferring that this occurs in a limited manner and belonging to risk groups does not favor transmission. It serves to evaluate a megaproject of the Global Fund to reduce the transmission of TB in this country. The population genetic structure of MTBC resembles that of an Ibero-American country, with the exception of the high frequency of the Beijing and S sublineages.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; molecular typing; Cuba; tuberculosis; molecular biology; *Mycobacterium tuberculosis*/transmission; molecular epidemiology; Molecular characterization.

Recibido: 14/03/2024

Aceptado: 30/04/2024

## Introducción

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa considerada un problema de salud pública de primera magnitud.<sup>(1)</sup>

La epidemiología molecular, surgida como una combinación de las técnicas de tipaje molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) y enfoques epidemiológicos clásicos, ha ganado importancia en los últimos tiempos como un recurso para comprender cuestiones cruciales en la propagación de la TB.<sup>(2)</sup>

El control adecuado de la TB requiere el conocimiento de los aislados (o cepas) que circulan localmente, la capacidad de distinguir entre recaídas y reinfecciones, la identificación de infecciones recientes, los factores de riesgo asociados y la capacidad para rastrear la distribución geográfica y la expansión clonal de aislados o cepas específicas.<sup>(2)</sup>

Las formas insidiosas de TB y la presencia de fuentes no descubiertas apoyan fuertemente el uso de métodos de tipaje para el control efectivo de eventos epidemiológicos, para identificar puntos de infección en situaciones especiales o buscar las razones de la propagación de ciertos tipos de cepas a nivel regional o mundial. El interés en el tipaje del MTBC es reforzado adicionalmente por la creciente amenaza mundial representada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia a múltiples fármacos (MDR, siglas en inglés) y o con resistencia extendida (XDR, acrónimo en inglés).<sup>(3)</sup>

Cuba es uno de los 15 países con más baja carga de la enfermedad en la región de Las Américas<sup>(4)</sup> y trabaja sostenidamente para eliminar la TB. En 2022, la OMS estimó una tasa de incidencia total de 6,6 casos de TB por 100 000 habitantes, siendo 83 % de TB pulmonar confirmada bacteriológicamente.<sup>(5)</sup> La tasa en niños/jóvenes menores de 18 años de edad fue de 1,0 % y la proporción estimada de casos nuevos con TB resistente a rifampicina y multifármacoresistentes (TB RR/MDR) fue de sólo 2,2 %.<sup>(5)</sup> Sin embargo, la tasa de incidencia se ha mantenido alrededor de 6 por 100 000 habitantes desde 2004 hasta la actualidad.<sup>(6)</sup>

En Cuba, se realizaron dos estudios genético-poblacionales, en 1995 y 1998, utilizando la técnica del análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción con la sonda IS6110 (RFLP-IS6110) en los cuales se encontró un rango de agrupamiento (reflejando transmisión reciente de la enfermedad) de 48 y 45 %, respectivamente.<sup>(7,8)</sup> En un estudio de epidemiología molecular realizado por González y colaboradores, (empleando el tipaje con elementos repetitivos en tándem de número variable-unidades repetidas interespaciadas de micobacterias, MIRU-VNTR, siglas en inglés, con 24 *loci*) en 61 aislados de MTBC de 2009 procedentes de unidades de salud de La Habana, permitió corroborar que la transmisión reciente era un fenómeno importante en este lugar y que esta se asociaba fuertemente a la permanencia en instituciones cerradas. También se constató que el estudio convencional de los contactos en esta ciudad falla a la hora de identificar un número relevante de vínculos epidemiológicos.<sup>(9)</sup> Sin embargo, en Cuba, no hay información de la dinámica de transmisión de la TB desde la década de 1990.

En 2009, comenzó en Cuba un megaproyecto (por cinco años) de fortalecimiento del Programa Nacional de Control de TB (PNCT), financiado por el Fondo Mundial de lucha contra el sida, la tuberculosis y la malaria, que abarcó todos los componentes del Programa e incluyó a múltiples sectores de la sociedad cubana.

No obstante, no se sabe el impacto que tuvo este en la reducción de la transmisión reciente de la enfermedad y la circulación de genotipos.

En este estudio que se presenta ahora, se determinaron, utilizando el espoligotipaje y el tipaje MIRU-VNTR-24 *loci*, los patrones genéticos y sublinajes de aislados del MTBC circulantes en Cuba en 2009 y su relación con las características clínico-epidemiológicas de los pacientes, y una estimación de la transmisión reciente de la enfermedad, para establecer una línea base.

## Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo analítico-descriptivo en la Sección de Biología Molecular del Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRITLM) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK).

El universo estuvo constituido por 666 casos de TB diagnosticados en Cuba en 2009.

### Tipo de muestreo y razones para su selección

**Criterio de inclusión:** Todos los aislados de MTBC de Cuba que llegaron al LNRITLM en 2009.

**Criterio de exclusión:** Se eliminaron los aislados repetidos, los que se encontraban contaminados o secos, los que no se obtuvo ADN, o los que no se completó la caracterización molecular.

En el LNRITLM en ese año, se recibieron 383 aislados de MTBC, obtenidos de muestras clínicas procesadas en los laboratorios de TB laboratories de los Centros Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología del país.

En total, se emplearon 178 ADN disponibles (conservados a 4°C en tubos plásticos sellados de 1,5 mL) purificados de los aislados de MTBC mencionados anteriormente. Esta muestra representó 26,72 % del total de pacientes reportados y 46,47 % de los aislados recepcionados.

### Tipaje molecular

En la realización del espigotipaje se empleó el sistema comercial Kit IM9701 (Ocimum Biosolutions Ltd, Hyderabad, India). Se ejecutó con la metodología establecida por Kamerbeek *et al.*<sup>(10)</sup>

El tipaje por MIRU-VNTR-24 *loci* se realizó siguiendo el protocolo internacional de Supply *et al.*<sup>(11)</sup>

### Análisis bioinformático y estadístico

Los genotipos obtenidos por el tipaje MIRU-VNTR-24 *loci* (códigos digitales) y el espigotipaje se analizaron con las herramientas bioinformáticas “en línea” MIRU-VNTR*plus* (Que cuenta con una colección de 186 cepas que representan los principales linajes de MTBC. Disponible en: <https://www.miru-vntrplus.org/>)<sup>(12)</sup> y SITVIT2 (actualmente es la base de datos de genotipaje internacional más grande de un microorganismo infeccioso con una compilación de 111.635 aislamientos clínicos de 169 países de origen de pacientes. Disponible en: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>).<sup>(13)</sup>

Se usaron las definiciones de agrupamientos, aislados únicos o no agrupados y pacientes de un agrupamiento planteadas por Cave *et al.* en 2005.<sup>(14)</sup>

Se empleó la definición de rango o porcentaje de agrupamiento (como estimado mínimo de proporción de casos de TB relacionados a transmisión reciente), según lo descrito por Small et al., siguiendo la siguiente fórmula: Número de Pacientes en agrupamientos- Número de agrupamientos/ No. Total de pacientes.<sup>(15)</sup>

En las herramientas bioinformáticas también se usan los términos:

Diversidad alélica: Tomando en cuenta los valores del polimorfismo genético de cada locus o de diversidad alélica ( $h$ ), se definieron los loci altamente ( $h > 0,6$ ), moderadamente ( $0,3 \leq h \leq 0,6$ ) y pobremente discriminatorios ( $h < 0,3$ ), según Sola et al., 2003.<sup>(16)</sup>

El poder discriminatorio de las técnicas de tipaje se determinó mediante el cálculo del índice discriminatorio de Hunter y Gaston.<sup>(17)</sup>

Sublinaje: Grupo de aislados que comparten características esenciales y descienden de un ancestro común.<sup>(18)</sup>

Para la recolección de los datos epidemiológicos se revisó la base de datos nacionales de TB del Ministerio de Salud Pública (Minsap) del período mencionado y la base de datos creada en el LNRITLM (y actualizada cada año) con los resultados de la encuesta para la vigilancia a la resistencia a fármacos antituberculosos.

En el procesamiento estadístico de los datos epidemiológicos se procedió a la utilización de los siguientes métodos no paramétricos: prueba de análisis de varianza y de homogeneidad utilizando el paquete estadístico *Statgraphics Plus* versión 2.1 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, EE.UU.). Los resultados se expresaron en forma de cuadros y figuras.

## Consideraciones éticas

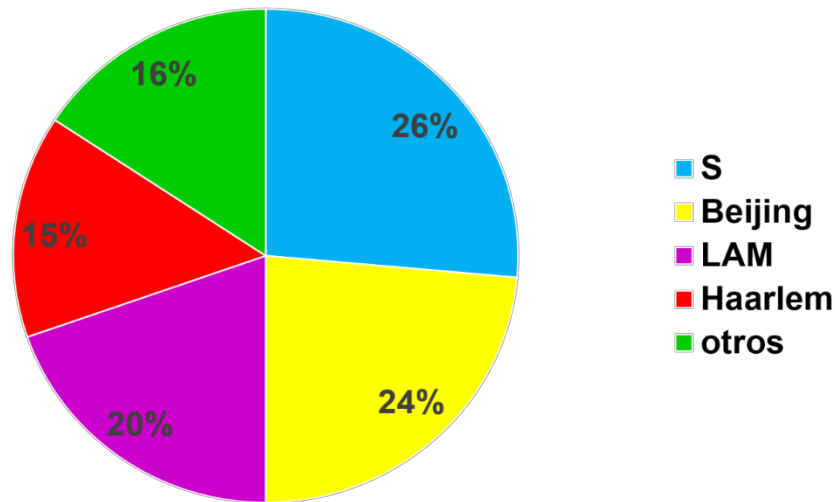


Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del IPK (CEI-IPK-35-12), el 20 de abril de 2012. Se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes contaron con un consentimiento escrito firmado previamente y aprobado por el Comité de Ética. También hablaron con un médico que aclaró cualquier duda asociada con la participación en el estudio. Cuando los pacientes tenían menos de 18 años se obtuvo un consentimiento informado escrito y firmado con la aprobación adicional y firma de uno de los padres. Todos los consentimientos firmados se guardaron en archivos físicos bajo llave bajo la custodia de los investigadores principales para mantener el anonimato de los pacientes. Se siguieron estrictamente las buenas prácticas de laboratorio, así como todas las medidas de bioseguridad para el trabajo y manejo de microorganismos de acuerdo a los niveles de riesgo establecidos por el listado oficial de agentes biológicos que afectan a humanos, animales y plantas de la resolución No 199/2020 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente vigente en Cuba.

## Resultados

El espoligotipaje realizado a 178 ADN obtenidos de aislados de MTBC de Cuba en 2009 produjo 39 patrones de espoligotipos diferentes. El rango de agrupamiento calculado resultó de 75,84 %. Por su parte, el HGDI fue de 0,8734.

Se identificaron cuatro sublinajes predominantes de MTBC, que incluyeron a 84,26 % de los aislados estudiados. De manera individual, predominó el sublinaje S (26,4 %), seguido por los sublinajes Beijing (23,5 %), LAM (19,66 %), y Haarlem (14,6 %). (Fig. 1).



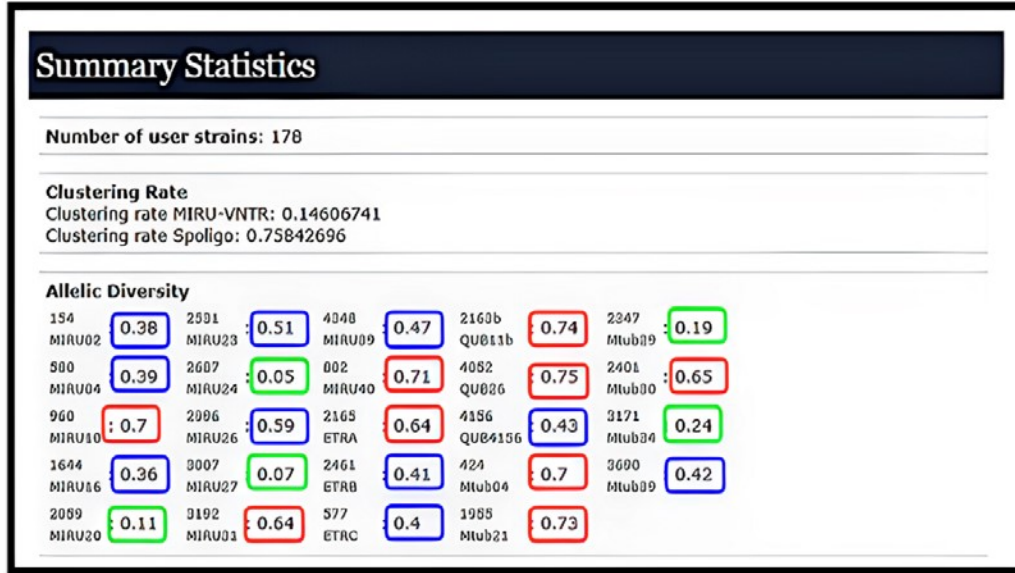
Leyenda:

Fuente: Base de Datos Internacional SITVIT2. (Disponible en: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>).

**Fig. 1-** Principales sublinajes encontrados en 178 aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de pacientes con tuberculosis en Cuba en 2009.

El tipaje con MIRU-VNTR-24 *loci* de los 178 aislados del MTBC definió 154 patrones genéticos diferentes, de los cuales seis agruparon 30 aislados (16,85 %) y 148 mostraron patrones únicos, según la base de datos internacional, de acceso a través de la herramienta bioinformática “en línea” MIRU-VNTR $plus$ .<sup>(12)</sup> El rango de agrupamiento fue de 14,60 % y el HGDI de 0,9926.

En cuanto a la diversidad alélica (h), se observó que de los 24 *loci*, nueve eran altamente discriminativos; diez moderadamente discriminativos y finalmente existieron 5 *loci*, pobremente discriminatorios (Fig. 2).



Fuente: herramienta bioinformática en línea MIRU-VNTRplus (Disponible en: <https://www.miruvntrplus.org/>).

**Fig. 2-** Resultados del cálculo de la diversidad alélica por el tipaje con unidades repetitivas intercaladas de micobacterias con repetición en tándem de número variable (MIRU-VNTR) con 24 loci de 178 aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en Cuba (2009).

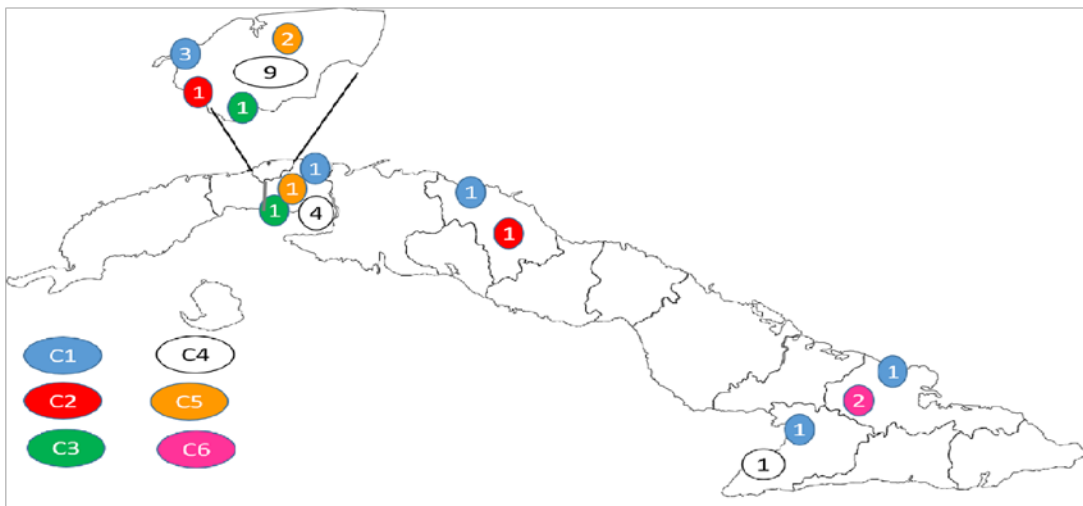
Referente a la información epidemiológica de los casos estudiados, se observó que la edad media de los 178 pacientes fue de 43,19 ±15,18 años. La inmensa mayoría (91,57 %) de los casos se encontraron en el rango de edad de 15 a 64 años, fundamentalmente en el grupo de 30 a 44 años y 8,42 % restante por encima de los 65 años. También se apreció un predominio significativo del sexo masculino (78,65 %). Esta proporción se mantuvo tanto en pacientes en agrupamientos como en los no agrupados (Tabla 1).

**Tabla 1-** Características básicas de los casos de tuberculosis con aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, obtenidos en Cuba en 2009, tipificados por Espoligotipaje y con unidades repetitivas intercaladas de micobacterias con repetición en tándem de número variable (MIRU-VNTR) con 24 *loci*

Variable	Total	No agrupados (148 casos)	Agrupados (30 casos)
Sexo			
Femenino	38	31	7
Masculino	140	117	23
Grupos de edades			
15 – 29 años	41	33	8
30 – 44 años	67	54	13
45 – 64 años	55	47	8
≥65 años	15	14	1
Región de procedencia			
Occidente	89	66	23
Centro	49	47	2
Oriente	40	35	5
Baciloscopia			
Positiva	154	128	26
Negativa	24	20	4
Serología VIH			
Positiva	25	18	7
Negativa	153	130	23
Resistencia a los fármacos antituberculosos			
Resistentes	10	6	4
Sensibles	168	142	26
Permanencia en instituciones cerradas			
Si	9	9	0
No	169	139	30
Mortalidad			
Si	14	10	4
No	164	138	26

Cuando se examinó por regiones se observó que el Occidente acumuló la mitad de los casos ( $p=0,0465$ ). Al comparar la dinámica de transmisión por regiones se distinguió que en el Occidente había una mayor diversidad genética porque se detectó un mayor número de patrones. Además, había una mayor transmisión reciente porque había una mayor tendencia al agrupamiento ( $p=0,0034$ ).

Esta diferencia en el comportamiento de Occidente está condicionada por la provincia Ciudad de la Habana (provincia actual La Habana), que contó con el mayor rango de agrupamiento (29,09 %), mientras que en el resto del país, sólo se encontraron en conglomerados 11,38 % de los casos (Fig. 3).



**Fig. 3-** Distribución geográfica de los casos de tuberculosis según los agrupamientos encontrados por el tipaje con repeticiones en tándem de número variable-unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRU-VNTR) con 24 *loci* y provincias de Cuba.

Al analizar la distribución de sublinajes por regiones, se observó una diferencia en la distribución ( $p=0,0087$ ) predominando en cada una un sublinaje diferente: el sublinaje S en Occidente, Beijing en el Centro del país, y LAM en la región Oriental (Tabla 2).

**Tabla 2-** Distribución geográfica de los sublinajes de los 178 aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de pacientes de TB en Cuba en 2009

Sublinaje	Región			Total
	Occidente	Centro	Oriente	
Beijing	14	<u>20</u>	8	42
Haarlem	13	6	7	26
LAM	12	10	<u>13</u>	35
S	<u>33</u>	8	6	47
Otros	17	5	6	28
Total	89	49	40	178

Fuente: Base de Datos Internacional SITVIT2 (disponible en: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>).

En cuanto a la distribución de los sublinajes según agrupamientos, se observó que 21,43 % de los aislados del sublinaje Beijing y 36,17 % de los aislados de S se encontraron en los conglomerados, a diferencia de los otros sublinajes reportados. Sin embargo, no hubo relación entre el sublinaje Beijing y los agrupamientos ( $p = 0,4496$  con corrección de Yates) a diferencia de S, que si se observó una fuerte asociación entre este sublinaje y los agrupamientos ( $p = 0,0001$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3-** Distribución de los sublinajes de los 178 aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de pacientes de TB en Cuba en 2009.

Sublinajes	En agrupamientos	No agrupados	Total
Beijing	9	33	42
Haarlem	2	24	26
LAM	2	33	35
S	17	30	47
otros	0	28	28
Total	30	148	178

Fuente: Base de Datos Internacional SITVIT2 (disponible en: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>)

Solamente se hallaron diez aislados resistentes al menos a una droga antituberculosa, de los mismos, 40 % se encontraron en agrupamientos. La asociación entre resistencia a los fármacos antituberculosos y los agrupamientos no quedó bien evidenciada. De estos aislados, tres estaban incluidos en el primer agrupamiento por el tipaje MIRU-VNTR-24 *loci*. Es el único con diferencia significativa con respecto al resto de los aislados estudiados ( $p=0,0001$ ). Al analizar la relación entre resistencia al tratamiento y sublinajes, se observó que, de los 10 casos, siete tuvieron aislados del MTBC pertenecientes al sublinaje Beijing, lo que evidenció una relación entre este sublinaje y la resistencia al tratamiento ( $p=0,0103$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4-** Relación entre los resultados de las pruebas de sensibilidad en los aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en Cuba en 2009 y los sublinajes

Sublinajes	Resistentes	Susceptibles	Total
Beijing	7	35	42
Haarlem	0	26	26
LAM	2	33	35
S	0	47	47
Otros	1	27	28
Total	10	168	178

Fuente: Base de Datos Internacional SITVIT2 (disponible en: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>).

Al estudiar algunos factores de riesgo reconocidos, como la infección por VIH o la permanencia en instituciones cerradas se observó que de las 25 personas viviendo con VIH solo siete tenían aislados en los conglomerados y de estas cuatro se encontraron en el agrupamiento C1. Aunque de forma general, no existía diferencia entre los aislados agrupados y no agrupados ( $p=0,1876$ ).

Al asociar la mortalidad de los casos de TB con los agrupamientos determinados con el tipaje MIRU-VNTR-24 *loci*, se observó que no había diferencias entre los casos con aislados del MTBC incluidos en los conglomerados y los no incluidos ( $p=0.3963$ ). En relación a la estancia prolongada en instituciones cerradas, se pudo constatar que todos los patrones fueron únicos (Tabla 5).

**Tabla 5-** Distribución de los aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en Cuba (2009) de los pacientes incluidos en agrupamientos de acuerdo al estatus VIH, los internados, fallecidos

Variable	Porcentaje de presentación	Porcentaje de agrupamiento	Valor de p
Fallecidos	7,86	28,57	$p=0,3963$
Reclusos	5,05	0	$p=0,3528$
Positividad al VIH	14,04	28	$p=0,1876$

## Discusión

En Cuba, se implementan, desde la década de los años 90, técnicas de genotipaje (RFLP-IS6110 y espoligotipaje) para la caracterización molecular de aislados de MTBC obtenidos en este país y realizar estudios genético-poblacionales.<sup>(7,8)</sup> Con estos estudios, se encuentra un rango de agrupamiento (reflejando transmisión reciente) de 48 y 45 %, en Cuba (1995) y La Habana (1998), respectivamente. En 2008, se introduce la técnica de tipaje con los elementos repetitivos MIRU-VNTR-15 *loci* y posteriormente (2009) se hace un estudio de caracterización molecular con esta técnica en 80 aislados de MTBC obtenidos de muestras de pacientes de unidades de salud de La Habana y se encuentra un rango de agrupamiento elevado (53%).<sup>(19)</sup> A continuación, se realiza un estudio de epidemiología molecular más completo en esta ciudad (con aislados de MTBC y pacientes de TB de 2009) y



permite corroborar que la transmisión reciente era un fenómeno importante en este lugar y que esta se asocia fuertemente a la permanencia en instituciones cerradas. También se constata que el estudio convencional de los contactos en La Habana falla a la hora de identificar un número relevante de vínculos epidemiológicos.<sup>(9)</sup> Sin embargo, de toda Cuba, no hay información de la dinámica de transmisión de la TB desde la década de 1990.

Este trabajo, se focaliza en el estudio genotípico de los aislados de MTBC obtenidos en Cuba en 2009 y su interacción con los pacientes relacionados, año en que comenzó un gran proyecto de cinco años de duración con apoyo del Fondo Mundial de lucha contra el sida, la tuberculosis y la malaria para el fortalecimiento del PNCT. Este ha sido el proyecto de mayor financiamiento (7,9 millones de dólares) y más abarcador (integró a todos los componentes del Programa y a múltiples sectores de la sociedad cubana, incluso a la sociedad civil) en la historia del PNCT en 60 años. A pesar de que ha pasado una década de su finalización, no se sabe el impacto que tuvo este en la reducción de la transmisión reciente de la enfermedad y en la circulación de genotipos y sublinajes, sobre todo de algunos notorios internacionalmente por su relación con la virulencia, transmisibilidad y resistencia a fármacos, como el sublinaje Beijing. Entonces, los resultados de este trabajo podrían servir de línea base para conocer estos aspectos mencionados.

Al analizar el rango de agrupamiento de este trabajo se observa que es similar a la investigación realizada por Pedersen *et al.* en los países nórdicos (Dinamarca, Suecia y Finlandia) en el periodo 2012-2013 y 2014-2015.<sup>(20)</sup> Es inferior a lo encontrado en Alemania, Finlandia y Países Bajos, todos países con baja incidencia de TB y programas de control efectivos.<sup>(21-23)</sup>

La identificación rápida de los *loci* más discriminativos permite el ahorro de tiempo y recursos durante el monitoreo de aislados con características particulares, en la investigación en el terreno de brotes pasados o potenciales y rastreando aislados importados. En comparación con un estudio metacéntrico realizado entre 2012 y 2019 que analiza los resultados de 56 artículos que evaluaron el poder discriminatorio de cada *locus* se observa que cinco de los seis *loci* altamente discriminativos encontrados en estos estudios se corresponden con los de esta investigación.<sup>(24)</sup> También se aprecia una gran concordancia con el estudio realizado en Irán donde coinciden seis de los loci muy discriminativos.<sup>(25)</sup>

La identificación de los linajes y sublinajes principales y su distribución geográfica permiten una mejor comprensión de la dinámica de transmisión de la enfermedad. Llama la atención la alta frecuencia de aparición del sublinaje S. Este sublinaje se reporta en Francia, Canadá y Sudáfrica, países con los cuales Cuba incrementa las relaciones comerciales en los últimos años.<sup>(13,26)</sup> En Italia, se considera una familia autóctona, como se pone de manifiesto en un estudio realizado por Garzelli *et al.* en la Toscana donde 92,5 % de los casos de nativos italianos pertenecen a este sublinaje.<sup>(27)</sup>

La proporción elevada de aislados con sublinajes LAM y Haarlem, constituye un reflejo del origen demográfico de la población cubana y los vínculos históricos y persistentes con Latinoamérica y Europa mediterránea, regiones en las que predominan ampliamente dichos sublinajes.<sup>(13,28)</sup>

Aunque Cuba tiene una de las tasas más bajas de TB de América Latina, tiene una alta prevalencia del sublinaje Beijing,<sup>(7,8)</sup> en comparación con otros países de la región, excepto Perú, Colombia y Ecuador.<sup>(29,30)</sup> Es importante resaltar que la presencia de este sublinaje en Cuba se ha incrementado de 11,3 % a 25,6 %, entre 1995 y 2010, sin conocer las causas posibles.<sup>(7,28)</sup>

Al analizar la población incluida en este estudio se observa que la edad media poblacional coincide con lo encontrado en el estado de Veracruz, México, y en el estado de Romaira, Brasil.<sup>(31,32)</sup> Se diferencia de lo reportado en población extranjera en Finlandia donde la media es de 28 años y en Tokio, Japón, en donde se reporta una edad de menos de 40 años.<sup>(22,33)</sup> Resulta evidente que la edad media de los pacientes es menor según es mayor la incidencia de la enfermedad.

En esta pesquisa, se encontró que la Ciudad de la Habana fue la provincia con más agrupamientos, además de contar con los dos grupos más grandes del estudio. Este hallazgo se asemeja a lo planteado por Izumi *et al.*, que encontraron que el hecho de ser residente en ciudades estaba asociado a los agrupamientos o conglomerados.<sup>(33)</sup>

No existe asociación entre el VIH y los agrupamientos, lo cual está dado porque el estatus VIH favorece el desarrollo de la enfermedad, pero no su transmisión. Esto explica la semejanza con el estudio realizado en 505 pacientes con TB en Ciudad del Cabo, Sudáfrica.<sup>(34)</sup> Donde a pesar de tener diferencias en cuanto a la incidencia de TB no hay diferencias entre los casos agrupados y únicos.

La mortalidad por TB está más relacionada con la virulencia de la cepa y las características inmunológicas del paciente que con la transmisión reciente. La ausencia de asociación entre agrupamiento y mortalidad es semejante a lo encontrado en el estudio realizado en Malawi donde tampoco había asociación con la mortalidad.<sup>(35)</sup> En cambio, difiere de lo encontrado en un estudio en Zimbabwe, donde la mortalidad era mayor en los conglomerados.<sup>(36)</sup>

En esta investigación, se obtuvo un porcentaje muy bajo de resistencia al tratamiento antituberculoso, similar al estudio realizado por Pedersen *et al.*<sup>(18)</sup> en países del Norte de Europa y . y al contrario de las investigaciones en algunos países asiáticos o africanos, como India y Mali.<sup>(37,38)</sup> Esta incidencia baja de

resistencia a fármacos puede estar dada por el manejo adecuado del tratamiento de los pacientes y la importación escasa de casos resistentes. La no asociación entre resistencia y conglomerados puede estar dada por la ocurrencia baja de aislados resistentes a los medicamentos antituberculosos.

A manera de conclusión, se puede decir que esta investigación contribuye al conocimiento de la dinámica de transmisión reciente de la TB en Cuba en 2009. El tamaño de los agrupamientos y el alto número de patrones únicos permite inferir que la TB en este país ocurre de forma limitada y la pertenencia a grupos de riesgo no favorece la transmisión de la enfermedad.

Además, sirve de punto de referencia para ayudar a evaluar el impacto positivo que pudo tener la financiación del megaproyecto del Fondo Mundial en la reducción de la diseminación de los aislados de MTBC en la comunidad y la disminución de la transmisión de la TB en este país en los años posteriores.

La estructura genética poblacional de MTBC encontrada en Cuba se asemeja a la de un país Iberoamericano, con la excepción de la gran frecuencia de aparición de los sublinajes Beijing y S.<sup>(29,30)</sup>

Para actualizar los conocimientos sobre la transmisión reciente de la enfermedad en Cuba, está en ejecución un estudio de tipaje molecular con aislados de MTBC obtenidos en 2017-2019, previo a la influencia negativa de la epidemia de la COVID-19 en el país.

### **Limitaciones del estudio**

Este estudio tiene algunas limitaciones. i) No se analizaron todos los aislados de *M. tuberculosis* cultivados durante el período, ya que algunos aislados (o ADN) se perdieron (o no obtuvieron resultados moleculares completos) durante el almacenamiento, transporte, extracción de ADN, espoligotipaje o tipaje con MIRU-

VNTR-24 *loci*. ii) el período fue de sólo un año, faltando aislados agrupados de pacientes vinculados en eventos de transmisión recientes de este corto período.

### Agradecimientos

A todos los miembros de la Red Nacional de Laboratorios de TB de Cuba por su aporte en el procesamiento de las muestras clínicas y en el envío de los aislados de MTBC al LNRITLM imprescindibles para la extracción de ADN.

A los integrantes del LNRITLM del IPK por la excelente asistencia técnica y las facilidades garantizadas en todo momento para la ejecución exitosa de este trabajo.

A Dr. Howard Takiff, Dr. Maria Victoria Mendez, Arnout Mulder y Dr. Jessica de Beer por facilitar el entrenamiento en el tipaje con MIRU-VNTR 24-*loci*.

A Dr. Annelis Bunschoten y Dr. Sofia Samper for ayudarnos en el entrenamiento en Espoligotipaje.

Los autores llevaron a cabo esta investigación con el apoyo de los siguientes proyectos internacionales:

- Desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico, detección de resistencias, caracterización molecular e implementación de sistemas de vigilancia epidemiológica para el control de la tuberculosis Apoyado por Misión Ciencia. Cooperación Cuba-Venezuela. (2008-2012).
- Fortalecimiento del Programa de Tuberculosis en la República de Cuba. Financiación: Fondo Mundial de Lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria (2009-2013).
- Fortalecimiento de capacidades de investigación, conocimientos y acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en Cuba (FA4).

Apoyado financieramente por la Dirección-General de Cooperación Internacional y Desarrollo (DGD), Bélgica (2017-2021).

## Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2011. Geneva: WHO; 2022. [Acceso: 16 Agosto, 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
2. Varma-Basil M, Nair D- Molecular epidemiology of tuberculosis: Opportunities & challenges in disease control. Indian J Med Res. 2017;146:11-4. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_941\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_941_17)
3. Udvardia ZF, Patel JM. New treatments for Drug Resistant TB: Past imperfect, future bright. Lung India. 2023;40(1):1-3. [https://doi.org/10.4103/lungindia.lungindia\\_556\\_22](https://doi.org/10.4103/lungindia.lungindia_556_22)
4. Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2021. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2022. ISBN 978-92-75-32649-7 (PDF). <https://doi.org/10.37774/9789275126493>
5. World Health Organization. Tuberculosis Profile: Cuba. 2022. [Acceso: 10 Diciembre, 2023]. Disponible en: [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb\\_profiles/?\\_inputs\\_&entity\\_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22CU%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22CU%22)
6. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud. 2022. 2023 [Acceso: 10 Diciembre, 2023]. Disponible en: <https://files.sld.cu/dne/files/2023/10/Anuario-Estadistico-de-Salud-2022-Ed-20231.pdf>
7. Díaz R, de Haas P, Gómez RI, Marrero A, Cabanas M, Valdivia JA *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-Jun 1995:

utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism.  
Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2(9):743-50.

<https://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtld/1998/00000002/00000009/art00009>

8. Diaz R, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Valdivia JA, Soolingen D. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba; a molecular epidemiological study by IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96(4):437-43. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000400001>

9. Gonzalez Diaz A, Battaglioli T, Diaz Rodriguez R, Goza Valdes R, Gonzalez Ochoa E, Van der Stuyft P. Molecular epidemiology of tuberculosis in Havana, Cuba, 2009. Trop Med Int Hlth. 2015;20:1534-42. <https://doi.org/10.1111/tmi.12569>

10. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997;35:907-14. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>

11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusgh-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unitvariable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006;44:4498-510. <https://doi.org/10.1128/jcm.01392-06>

12. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol. 2008;46:2692-9. <https://doi.org/10.1128/jcm.00540-08>

13. Couvin D, David A, Zozio T, Rastogi N. Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of

the *Mycobacterium tuberculosis* genotyping database. Infect. Genet. Evol. 2019;72:31-43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.030>

14. Cave MD, Yang ZH, Stefanova R, Fomukong N, Ijaz K, Bates J *et al.* Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. J. Clin. Microbiol. 2005;43:1228-33. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1228-1233.2005>

15. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC. *et al.* The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med. 1994;330:1703-9. <https://doi.org/10.1056/NEJM199406163302402>

16. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Loch C, Supply P. *et al.* Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol. 2003;3:125-33. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00011-X)

17. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988;26:2465-6. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>

18. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microb and Infect Dis. 2007;13:1-46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>

19. Gozá-Valdés R, Díaz-Rodríguez R. Análisis genotípico de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* en La Habana en 2009. Rev Cubana Med Trop. 2014;66(2):263-72. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602014000200011&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602014000200011&script=sci_arttext&lng=pt)



20. Pedersen MK, Lillebaek T, Andersen AB, Soini H, Haanperä M, Groenheit R. *et al.* Trends and differences in tuberculosis incidences and clustering among natives in Denmark, Sweden and Finland: comparison of native incidences and molecular epidemiology among three low-incidence countries. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:717-23. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.005>
21. Sanchini A, Andrés M, Fiebig L, Albrecht S, Hauer B, Haas W. Assessment of the use and need for an integrated molecular surveillance of tuberculosis: an online survey in Germany. *BMC Public Health.* 2019;19:321. <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-019-6631-6>
22. Räisänen PE, Haanperä M, Soini H, Ruutu P, Nuorti JP, Lyytikäinen O. Transmission of tuberculosis between foreign-born and Finnish-born populations in Finland, 2014-2017. *PLoS One.* 2021;16:e0250674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250674>
23. Roof I, Jajou R, Kamst M, Mulder A, de Neeling A, van Hunen R, *et al.* Prevalence and characterization of heterogeneous Variable-Number Tandem-Repeat clusters comprising drug-susceptible and/or variable resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in the Netherlands from 2004 to 2016. *J Clin Microbiol.* 2018;56(2):e00887-18. <https://doi.org/10.1128/jcm.00887-18>
24. Ghavidel M, Tadayon K, Mosavari N, Nourian K, Bahrami, Taghanaki HR, *et al.* Introducing the best six *loci* in Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-VariableNumber Tandem Repeat (MIRU-VNTR) typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *Rep Biochem Mol Biol.* 2019; 8:335-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103078/>
25. Hadifar S, Kargarpour Kamakoli M, Eyboosh S, Nakhaeizadeh M, Kargarpour Kamakoli MA, Ebrahimifard N, *et al.* The shortcut of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing for *Mycobacterium*

*tuberculosis* differentiation. Front Microbiol. 2022; 13: 978355.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.978355>

26. Pichat C, Couvin D, Carret G, Frédénucci I, Jacomo V, Carricajo A, *et al.* Combined Genotypic, phylogenetic, and epidemiologic aof *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in the Rhône Alpes region, France. PLoS ONE 2016; 11: e0153580.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153580>

27. Garzelli C, Lari N, Cuccu B, Tortoli E, Rindi L. Impact of immigration on tuberculosis in a low-incidence area of Italy: a molecular epidemiological approach. Clin Microbiol Infect. 2010; (11):1691-7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03149.x>

28. Herrera Avila YM, Fonseca Gómez CM, Gozá Valdés R, Martínez Rodríguez IM, Lemus Molina D, Llanes Cordero MJ *et al.* Tipificación con oligonucleótidos espaciadores de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2015; 67:85-96.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602015000100009&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602015000100009&script=sci_arttext&lng=pt)

29. MI Cerezo-Cortés, JG Rodríguez-Castillo, R Hernández-Pando, MI Murcia. Circulation of *M. tuberculosis* Beijing genotype in Latin America and the Caribbean, Pathogens Global Health. 2019;113:336-351.  
<https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1710066>

30. Mora Pinoargote C, Garzon Chavez D, Franco Sotomayor G, Leon Benitez M, Granda Pardo JC, Trueba G *et al.* Countrywide rapid screening for the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing sublineage in Ecuador using a single nucleotide polymorphism polymerase chain reaction method. Int J Mycobacteriol. 2019:366-70. [https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_132\\_19](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_132_19)

31. Almaraz-Velasco R, Munro-Rojas D, Fuentes-Domínguez J, Muñiz-Salazar R, Ibarra-Estela MA, Guevara-Méndez AD, *et al.* A first insight into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Veracruz, Mexico. *Int J Mycobacteriol* 2017;6:14-20.

[https://journals.lww.com/ijmy/fulltext/2017/06010/a\\_first\\_insight\\_into\\_the\\_genetic\\_diversity\\_of.3.aspx](https://journals.lww.com/ijmy/fulltext/2017/06010/a_first_insight_into_the_genetic_diversity_of.3.aspx)

32. Tatara MB, Perdigão J, Viveiros M, Kritski A, Silva KED, Sacchi FPC, *et al.* Genetic diversity and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Roraima State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;101:774-9.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0324>

33. Izumi K, Murase Y, Uchimura K, Kaebeta A, Ishihara K, Kaguraoka S, *et al.* Transmission of tuberculosis and predictors of large clusters within three years in an urban setting in Tokyo, Japan: a population-based molecular epidemiological study. *BMJ Open.* 2019;9:e029295.

<https://bmjopen.bmj.com/content/9/5/e029295>

34. Tadokera R, Bekker LG, Kreiswirth BN, Mathema B, Middelkoop K. TB transmission is associated with prolonged stay in a low socio-economic, high burdened TB and HIV community in Cape Town, South Africa. *BMC Infect Dis.* 2020;20:120. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12879-020-4828-z>

35. Houben RM, Crampin AC, Mallard K, Mwaungulu JN, Yates MD, Mwaungulu FD *et al.* HIV and the risk of tuberculosis due to recent transmission over 12 years in Karonga District, Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:1187-9.

<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.03.013>

36. Easterbrook PJ, Gibson A, Murad S, Lamprecht D, Ives N, Ferguson A, *et al.* High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a

molecular epidemiological study. J Clin Microbiol. 2004;42:4536-44.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.42.10.4536-4544.2004>.

37. Malhotra B, Dashora D, Kumar V, Goyal S, Sharma B; Kumar M ; *et al.* Genetic diversity and drug sensitivity profiles of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from two slums of Jaipur city, Rajasthan, India. Indian J Med Res. 2017;145:74-83. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_336\\_14](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_336_14)

38. Togo AC, Kodio O, Diarra B, Sanogo M, Coulibaly G, Bane S, *et al.* The most frequent *Mycobacterium tuberculosis* complex families in Mali (2006–2016) based on spoligotyping. Int J Mycobacteriol. 2017;6:379-86.  
[https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_140\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_140_17)

### Conflicto de Intereses

No hay ningún conflicto de interés por parte de los autores.

### Contribuciones de autoría

*Conceptualización:* Raúl Díaz-Rodríguez, Ileana Margarita Martínez-Rodríguez.

*Curación de datos y validación:* Ileana Margarita Martínez-Rodríguez, Andrea María Rodríguez-Bertheau.

*Análisis formal:* Ileana Margarita Martínez-Rodríguez.

*Adquisición de fondos, administración y supervisión:* Raúl Díaz-Rodríguez.

*Investigación:* Ileana Margarita Martínez-Rodríguez, Yoslany Mercedes Herrera-Ávila, Roxana Gozá-Valdés, Raúl Díaz-Rodríguez.

*Metodología:* Ileana Margarita Martínez Rodríguez, Raúl Díaz-Rodríguez.

*Visualización:* Ileana Margarita Martínez-Rodríguez, Andrea María Rodríguez-Bertheau.

*Redacción del manuscrito original:* Ileana Margarita Martínez Rodríguez, Raúl Díaz-Rodríguez, Andrea María Rodríguez-Bertheau.

*Revisión, edición y aprobación del manuscrito final:* Todos los autores.