

Tipificación con oligonucleótidos espaciadores de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba

Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis* in Cuba

Dra. Yoslany M. Herrera Avila^I; Dr. Carlos M. Fonseca Gómez^I; Dra. Roxana Gozá Valdés^I; Dra. Ileana M. Martínez Rodríguez^{II}; Dra. Dihadenys Lemus Molina^I; Dra. María Josefa Llanes Cordero^{III}; Dr. Antonio Marrero Figueroa^{III}; Dr. Raúl Díaz Rodríguez^I

Departamento de Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRITLM).

^I Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Universidad de Ciencias Médicas de las Fuerzas Armadas Revolucionarias (FAR). La Habana, Cuba.

^{III} Dirección Nacional de Epidemiología. Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el conocimiento de los linajes de *Mycobacterium tuberculosis* es importante para entender el origen, evolución y propagación de la bacteria.

Objetivo: determinar los patrones genéticos de *M. tuberculosis* circulantes en Cuba.

Métodos: estudio descriptivo de corte transversal con un componente analítico en Cuba, en el período comprendido de enero de 2009 a diciembre de 2010. Se aplicó la tipificación con oligonucleótidos espaciadores (*Spoligo*typing) a 308 aislamientos de *M. tuberculosis* del período 2009-2010. La clasificación en genotipos se realizó según la base de datos internacional SpolDB4. Los resultados se analizaron además con la herramienta web "en línea" MIRU-VNTR_{plus} y se compararon con los patrones genéticos de *M. tuberculosis* identificados en 1993-1995 en Cuba.

Resultados: se definieron 79 patrones genotípicos diferentes, de los cuales 46 (62 %) fueron patrones no reportados anteriormente en SpolDB4. Los 22 agrupamientos definidos incluyeron al 75,4 % de los aislamientos estudiados. Se encontraron cinco familias genéticas fundamentales: Beijing (25,6 %), S (19,2 %), LAM (16,9 %), Haarlem (16,9 %) y T (5,8 %). La familia S prevaleció en la región Occidental (OR=3,4; 95 % IC:1,8-6,3; p<0,05), Beijing en el Centro de Cuba (OR=6,7; 95 % IC:3,7-11,9; p<0,05) y LAM (OR=3,0; 95 % IC:1,6-5,6; p<0,05) y Haarlem en la zona Oriental (OR=1,8; 95 % IC:1,0-3,4; p<0,05).

Conclusiones: se observó una gran diversidad genética entre los aislamientos de *M. tuberculosis* circulante en Cuba en 2009-2010. En el país, la estructura genética de la población de *M. tuberculosis* ha variado en el tiempo con una disminución de genotipos endémicos como Haarlem y T y un aumento significativo de S y Beijing. Estos datos aportan elementos importantes para la epidemiología y control de la TB en Cuba.

Palabras clave: complejo *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping, Cuba, tuberculosis, epidemiología molecular, genotipo Beijing, tipificación.

ABSTRACT

Introduction: Knowledge about *Mycobacterium tuberculosis* lineages is important to understand the origin, evolution and spread of this bacterium.

Objective: Determine the genetic patterns of *M. tuberculosis* circulating in Cuba.

Methods: A descriptive cross-sectional study was conducted with an analytical component in Cuba in the period extending from January 2009 to December 2010. Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping) was applied to 308 *M. tuberculosis* isolates from the period 2009-2010. Classification into genotypes was carried out according to the international database SpolDB4. Results were additionally analyzed with the online tool MIRU-VNTRplus and compared with the *M. tuberculosis* genetic patterns found in Cuba in 1993-1995.

Results: 79 different genotypic patterns were defined, of which 46 (62%) had not been previously reported in SpolDB4. The 22 clusters defined included 75.4% of the isolates studied. Five main genetic families were found: Beijing (25.6%), S (19.2%), LAM (16.9%), Haarlem (16.9%) and T (5.8%). The S family prevailed in the Western region (OR=3.4; CI 95%:1.8-6.3; p<0.05), Beijing in Central Cuba (OR=6.7; CI 95%:3.7-11.9; p<0.05), and LAM (OR=3.0; CI 95%:1.6-5.6; p<0.05) and Haarlem in the Eastern region (OR=1.8; CI 95%:1.0-3.4; p<0.05).

Conclusions: Great diversity was observed among the *M. tuberculosis* isolates circulating in Cuba in the period 2009-2010. The genetic structure of *M. tuberculosis* has changed in the country with the passing of time, with a reduction in endemic genotypes like Haarlem and T, and a significant increase in S and Beijing. These data contribute important information for epidemiology and TB control in Cuba.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, Spoligotyping, Cuba, tuberculosis, molecular epidemiology, Beijing genotype, typing

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades que ha acompañado al hombre desde sus orígenes. El bacilo tuberculoso forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), donde se ubican además *bovis* (incluidas las cepas BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. mungi*¹ y más recientemente *M. orygis*.²

Los progresos alcanzados en las últimas décadas en el diagnóstico, tratamiento y control de la TB a escala mundial se han visto disminuidos por los efectos de la epidemia del sida, la emergencia de cepas resistentes a las drogas antituberculosas, las inequidades sociales y otros factores epidemiológicos importantes que continúan alimentado a este flagelo. Cifras de la OMS revelan que en el año 2010 se registraron 8,8 millones de casos nuevos de TB, de ellos 650 000 con TB multidrogorresistente (MDR, siglas en inglés).³

Cuba es uno de los países con menor tasa de morbilidad y mortalidad en Las Américas y el mundo. Datos tomados del anuario estadístico del MINSAP indican que en 2010 hubo 782 casos, para una tasa de incidencia de 7,0 por cada 100 000 habitantes y una tasa de mortalidad de 0,3.⁴ A pesar de estas cifras, la TB constituye una preocupación para las autoridades sanitarias cubanas por la diseminación mundial de cepas MDR y extremadamente resistentes (XDR, siglas en inglés) a los fármacos anti-tuberculosos.

Durante los últimos años, se han desarrollado técnicas moleculares para la caracterización de linajes de *M. tuberculosis*, con el objetivo de conocer el origen, evolución y propagación de esta bacteria. El método de referencia ha sido por años el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) con la sonda IS6110. Sin embargo, este resulta laborioso y se puede reemplazar parcial o completamente por técnicas alternativas más sencillas como la tipificación con oligonucleótidos espaciadores de la secuencia repetitiva directa (*Spoligotyping*, en inglés) y tipificación con unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias y elementos repetitivos en tándem de número variable (MIRU-VNTR, siglas en inglés).⁵

Spoligotyping es una técnica muy utilizada por su relativa simplicidad, rapidez y bajo costo. Se basa en la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) de la región DR (Repetición Directa, siglas en inglés), un locus único y altamente polimórfico presente en el cromosoma de las especies del MTBC. El método estudia la presencia o ausencia de 43 fragmentos de ADN, llamados espaciadores.⁶ Existe una base de datos internacional con más de 39 200 patrones de "espiligotipos" (SpolDB4) de aislamientos obtenidos en más de 122 países y algoritmos computarizados publicados en la Web que permiten asignar nuevos aislamientos a familias y subfamilias. El análisis de esta base de datos ha brindado información importante sobre la estructura poblacional de *M. tuberculosis* lo que posibilita conocer la existencia de familias de genotipos que circulan en determinadas áreas geográficas.⁷

En Cuba, las técnicas moleculares para la tipificación de *M. tuberculosis* (RFLP-IS6110 y *Spoligotyping*) se comenzaron a utilizar en la década del 90. Las investigaciones realizadas con RFLP se encaminaron, fundamentalmente, a estudios de transmisión reciente de la enfermedad en instituciones cerradas o en la comunidad.⁸ Adicionalmente, en 1997 se empleó *Spoligotyping* para determinar el poder de discriminación de esta con relación al RFLP-IS6110 en una colección de 157 aislamientos cubanos de 1994-1995.⁹

El abordaje molecular ha demostrado ser una herramienta útil en el estudio de la biogeografía de la TB. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética de *M. tuberculosis* circulante en Cuba, en los años 2009-2010 y comparar los resultados con los datos obtenidos durante el período 1993-1995, con el fin de conocer la dinámica actual de expansión de las familias de *M. tuberculosis*.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con un componente analítico en Cuba en el período comprendido de enero de 2009 a diciembre de 2010. Se estudiaron 308 aislamientos de *M. tuberculosis* obtenidos a partir de muestras clínicas de pacientes con tuberculosis pulmonar o extrapulmonar, recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRITLM) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), procedentes de los Laboratorios de TB de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología del país y de la sección de Diagnóstico del LNRITLM.

Los aislamientos primarios se obtuvieron mediante inoculación de la muestra clínica en medio Löwestein Jensen, incubados a 37°C. La identificación de especie se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales¹⁰ y por el sistema inmunocromatográfico (BIO-LINE SD Ag MPT64 TB, Yongin, Korea).¹¹ Los cultivos positivos fueron enviados a la sección de Biología Molecular del LNRITM donde se desarrolló esta investigación.

A los aislamientos se les realizó la extracción de ADN según lo descrito por *Van Soolingen y cols.*¹²

Se empleó el sistema Spoligotyping Kit IM9701 (Ocimum Biosolutions Ltd, Hyderabad, India), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y lo descrito por *Kamerbeek y cols.*⁶ El producto de la PCR del locus DR del cromosoma del MTBC, marcado con biotina, se hibridó con 43 oligonucleótidos espaciadores inmovilizados en una membrana de nylon. Las señales de la hibridación fueron detectadas por quimioluminiscencia. En cada membrana se utilizaron como controles positivos ADN de *M. bovis* P3 y *M. tuberculosis* H37Rv y como control negativo agua de grado molecular. Los patrones obtenidos se compararon con la base de datos internacional SpolDB4⁷ y se identificaron los diferentes linajes y sub-linajes. Para evaluar la dinámica de expansión de los genotipos de *M. tuberculosis* en Cuba los resultados se confrontaron, además, con la base de datos nacional del LNRITM.

Para el estudio de agrupamientos, los patrones genéticos se analizaron con la herramienta bioinformática "en línea" MIRU-VNTR *plus* (<http://www.miru-vntrplus.org>). El índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI, siglas en inglés), se usó para estimar el poder discriminatorio de la técnica.¹³ El índice de agrupamiento (como estimado mínimo de proporción de casos de TB relacionados a transmisión reciente), se calculó según *Small y cols.*¹⁴

La procedencia de los aislamientos se obtuvo a partir de la encuesta nacional de vigilancia de la resistencia a las drogas antituberculosas y la base de datos nacional de TB del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) del período 2009-2010.

El análisis estadístico se realizó con el programa informático EpiInfo™ versión 3.5.1. Se utilizó por ciento (%) para variables cualitativas. Para determinar la correlación familia-región geográfica se usó la prueba de Ji cuadrado (χ^2), con la corrección de Yates. Se calculó la razón de disparidad (OR, siglas en inglés) y se consideró un valor de dos o más como indicador de asociación. Se estimó el intervalo de confianza (IC) del 95 % y el valor de $p \leq 0,05$.

Se cumplieron estrictamente las buenas prácticas de laboratorio, así como todas las medidas de bioseguridad para el trabajo y la manipulación de microorganismos según los niveles de riesgo establecidos por la lista oficial de agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas de la Resolución No. 38/06 del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente vigente en Cuba. Este estudio recibió la aprobación del Comité de Ética del IPK (CEI-IPK-35-12).

RESULTADOS

Los patrones genéticos generados por *Spoligotyping* de los 308 aislamientos de *M. tuberculosis* 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 %). El resto de los aislamientos, 46 (14,9 %) no estaban reportados en la base de datos SpolDB4 ([tabla 1](#)).

Se encontró una gran diversidad de sub-linajes dentro de las familias circulantes en Cuba. El mayor porcentaje de aislamientos en la familia Haarlem perteneció a Haarlem 3 (33/52), lo cual se observó en 10,7 % de los aislamientos estudiados. Se hallaron seis de los 12 sub-linajes pertenecientes a la familia LAM, originaria de Latinoamérica y el Mediterráneo, dentro de los cuales predominó el sub-linaje LAM 9 (32/52). De la familia T, pobremente definida, predominó el sub-linaje T1 (originalmente descrito en Rusia) con un total de 13 aislamientos estudiados, lo que representó el 4,2 % ([tabla 2](#)).

Se detectaron además 22 agrupamientos que incluyeron al 75,4 % de los aislamientos estudiados. Un total de 192 aislamientos (62,3 %) formaron los cinco agrupamientos más grandes: Beijing con 79 aislamientos, S con 55, Haarlem 3 con 29, Haarlem 1 con 15 y LAM 9 con 14 aislamientos. De los 116 aislamientos restantes, 64 constituyeron pequeños agrupamientos cuyo tamaño varió entre 2 y 12 aislamientos, mientras que otros 52 no formaron parte de ningún grupo. El índice de agrupamiento resultó de 0,7564. En cambio, el índice discriminatorio de Hunter-Gaston fue de 0,8872.

Se constataron variaciones importantes de los genotipos que predominaron en las diferentes regiones de Cuba. Se encontró que 29,9 % de los aislamientos del Occidente pertenecieron a la familia S (OR=3,4; 95 % IC:1,8-6,3 $p < 0,05$). En el Centro se observó un dominio del genotipo Beijing (51,0 %), (OR=6,7; 95 % IC:3,7-11,9 $p < 0,05$). En cambio, en la región oriental prevalecieron los genotipos Haarlem (23,3 %) y LAM (28,9 %). El mayor número de patrones nuevos se encontraron en el occidente del país ([tabla 1](#)).

Tabla 1. Distribución de las familias genéticas de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* según la técnica de Spoligotyping por regiones geográficas y períodos estudiados, en Cuba. Períodos 2009-2010 y 1993-1995

Familias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . No. (%) aislamientos							
Período (n)/Regiones	Beijing	Haarlem	LAM	S	T	PU	Otros
2009-2010 (308)	79 (25,6)	53 (17,2)	52 (16,9)	58 (18,8)	18 (5,8)	46 (14,9)	2 (0,6)
• Región Occidental	22 (16,4)	21 (15,7)	15 (11,2)	40 (29,9)*	8 (6,0)	26 (19,4)	2 (1,4)
• Región Central	43 (51)*	11 (13,1)	11 (13,1)	7 (8,3)	2 (2,4)	10 (11,9)	0 (0)
• Región Orienta	14 (15,6)	21 (23,3)*	26 (28,9)*	11 (12,2)	8 (8,9)	10 (11,1)	0 (0)
1993-1995 (239)	27 (11,3)	72 (30,1)	50 (20,9)	6 (2,5)	58 (24,3)	18 (7,5)	8 (3,3)
• Región Occidental	2 (3,1)	28 (43,1)	11 (16,9)	4 (6,2)	13 (20,0)	4 (6,2)	3 (4,5)
• Región Central	23 (28,0)	13 (15,9)	14 (17,1)	1 (1,2)	21 (25,6)	6 (7,3)	4 (4,8)
• Región Orienta	2 (2,2)	31 (33,7)	25 (27,2)	1 (1,1)	24 (26,1)	8 (8,7)	1 (1,1)

Nota: PU: Patrones únicos, * $p < 0.05$.

La tabla 1 muestra la distribución de las familias genéticas de *M. tuberculosis* según regiones geográficas, de los períodos 2009-2010 y 1993-1995.

En la región occidental, la familia Haarlem, predominante en los años 1993-1995 (43,1 %), representó el 15,7 % en el actual estudio ($\chi^2=16,26$; $p < 0,05$). Por el contrario, la familia S que solo apareció anteriormente en un 6,2 % de los aislamientos, ahora resultó ser el genotipo dominante (29,9 %) en esa región ($\chi^2=12,92$; $p < 0,05$). Además, se observó una disminución de la familia T desde 20 a 6 % entre ambos períodos analizados, lo cual resultó estadísticamente significativo ($\chi^2=6,54$; $p < 0,05$) (tabla 1).

En el centro del país se apreció un incremento del genotipo Beijing, que alcanzó 51 % de los aislamientos de este estudio. El genotipo T experimentó una disminución significativa de 25,6 % en el período 1993-1995 a 2,4 % en 2009-2010 ($\chi^2=39,95$; $p < 0,05$). Se observó además un aumento del genotipo S ($\chi^2=4,86$; $p < 0,05$) (tabla 1).

En la región oriental, predominaron las familias Haarlem (33,7-23,3 %) y LAM (27,2-28,9 %) en ambos períodos. El genotipo T tuvo una disminución significativa de un 26,1 % a 8,9 % en 2009-2010 ($\chi^2=9,53$; $p < 0,05$). Es importante señalar que el genotipo Beijing incrementó desde 2,2 % a 15,6 % ($\chi^2=8,55$; $p < 0,05$) (tabla 1).

DISCUSIÓN

La gran diversidad genética de *M. tuberculosis* encontrada en este trabajo (tabla 1), coincide con lo reportado por *García-Pachón E y Rodríguez JC*, quienes plantean que, de manera general, la estructura genética poblacional de la TB es heterogénea en países de baja incidencia (como Cuba) y más homogénea en áreas de alta incidencia.⁵ Se observó un predominio de la familia Beijing (25,6 %); esta es originaria de China, donde representa más del 90 % de los aislamientos, pero se ha expandido rápidamente a otras regiones del mundo como: Estados Unidos, Asia, Europa del Este y Rusia. A escala mundial, representa 10-13 % de los casos de TB en la actualidad¹⁵ lo cual sugiere la presencia de ventajas intrínsecas en términos de virulencia (o transmisibilidad), en relación con otros genotipos de *M. tuberculosis*. Esta familia es poco frecuente en América Latina y el Caribe.^{16,17} En cambio, en Cuba ya se había advertido sobre la presencia de este genotipo y su posible introducción desde el gigante asiático en los siglos XIX y XX.^{8,9}

En esta investigación llama la atención la alta frecuencia de aparición de la familia S (19,2 %). La existencia de este genotipo se confirmó con la base internacional SpolDB4, pero su origen no se ha podido determinar con exactitud. Esta familia se ha observado en Canadá, Italia y Sudáfrica,⁷ países con los cuales Cuba ha incrementado sus relaciones comerciales y turísticas en los últimos años, pero no hay una hipótesis clara sobre ello (tabla 1).

Con la excepción de la gran frecuencia de aparición de los genotipos Beijing y S, la estructura genética poblacional de *M. tuberculosis* encontrada en Cuba es característica de un país Iberoamericano.^{7,18}

Se apreció una elevada proporción de sublinajes pertenecientes a los genotipos LAM y Haarlem, lo que 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 sobresalen ampliamente dichos genotipos.⁷

El predominio de Haarlem 3 se corresponde con que justamente es el sublinaje más prevalente en España de manera global.⁷ Así mismo, la alta incidencia de LAM9 está relacionada con la alta prevalencia de este sublinaje en España y Centro-América.^{7,18}

La familia T, se ha encontrado en todos los continentes, a ella pertenecen más de 600 patrones de "espoligotipos" clasificados insuficientemente y que se han estratificado de acuerdo con sus especificidades geográficas. En este estudio se identificaron T1 y T2, con dominio de T1, sublinaje aislado de manera reiterada en repúblicas de la antigua Unión Soviética, región con la cual se mantuvo estrechas relaciones políticas y comerciales en la segunda mitad del siglo pasado. Adicionalmente, este sublinaje también es altamente hegemónico en España.⁷

Se observó en este estudio la asociación entre determinados genotipos de *M. tuberculosis* y regiones geográficas particulares. Sin embargo, no hay una explicación clara para la supremacía del genotipo S en el Occidente, pero resultados obtenidos en el laboratorio con la tipificación MIRU-VNTR sugieren transmisión reciente activa, fundamentalmente en la antigua provincia de Ciudad de La Habana, la mayor urbe de la región y del país.¹⁹

El incremento del genotipo Beijing en la región central genera serias preocupaciones por la posibilidad de aparición de cepas resistentes y su rápida expansión a regiones vecinas, como ha ocurrido en diversas partes del mundo.²⁰ Ninguno de los casos era de origen asiático o había viajado recientemente a esa

región, aunque es conocido que en el año 1847 se inició la migración china hacia Cuba (con más de 300 000 personas) asentándose fundamentalmente en el occidente y centro del país.^{8,9}

El predominio de los linajes LAM y Haarlem en el oriente se podría deber a los vínculos más estrechos de esta región con el Caribe y también porque en esta zona se inició la colonización europea en Cuba. Sin embargo, estos argumentos no son lo suficientemente sólidos como para justificar este hallazgo.

La comparación de los resultados de esta investigación con la caracterización molecular por *Spoligotyping*, realizada con aislamientos del período 1993-1995 (Base de datos del LNRITLM), ha permitido analizar la dinámica actual de expansión de los aislamientos de *M. tuberculosis* circulante en Cuba con los de hace 15 años atrás. Aquí se debe mencionar que en la Base de Datos Nacional del LNRITLM existen sólo espoligotipos de 239 aislamientos del periodo 1993-1995 que contrasta con los 308 aislamientos de 2009-2010. Sin embargo, la gran diversidad genética y la disminución significativa de algunos linajes endémicos de la zona geográfica (Haarlem y T) por un lado, y el incremento significativo de genotipos modernos (Beijing y S), por otro, sugiere que la estructura de la población de *M. tuberculosis* en Cuba pudiera ser el resultado de una epidemia clásica en extinción en un país de baja incidencia, mantenida por reactivación endógena de focos de TB latentes en pacientes no vinculados epidemiológicamente y modificada por la emergencia de nuevos genotipos que se han propagado rápidamente a expensas de transmisión reciente y que ponen en peligro el control de la TB en el país ([tabla 2](#)).¹⁷

Otra posible explicación de esto lo constituye lo ocurrido en la zona occidental, donde el genotipo Haarlem que dominaba en el período 1993-1995 (43,1 %), disminuyó a solo un 15,7 %. Esto se acompañó de un aumento considerable de la familia Beijing desde 3,1 % hasta 16,4 % en los años 2009-2010, así como de la inesperada aparición del genotipo S que representó casi el 30 % de los aislamientos de la región ([tabla 2](#)).

La persistencia del genotipo Beijing por más de 15 años en el Centro ([tabla 2](#)), donde alcanzó la mitad de los casos estudiados en el período 2009-2010, sugiere que se ha convertido en endémico y representa una posible amenaza para la región (y para el país), teniendo en cuenta su asociación a virulencia, transmisibilidad y tendencia a desarrollar resistencia al tratamiento anti-tuberculoso.²¹

Con excepción de una disminución significativa del genotipo T, en la región Oriental, se observó una gran estabilidad en los genotipos predominantes (LAM y Haarlem), con frecuencias de aparición muy similares en los períodos 1993-1995 y 2009-2010. A pesar de solo representar el 15,6 % de los aislamientos en el oriente del país, la presencia del genotipo Beijing se incrementó rápidamente en este territorio, lo cual amenaza la estabilidad de la población de *M. tuberculosis* predominante en esta zona y se debe interpretar como una posible alerta epidemiológica que requiere estrecha vigilancia en los próximos años ([tabla 2](#)).

En conclusión, la presente investigación ofrece una panorámica de la estructura genética de la población de *M. tuberculosis* circulante en Cuba en la actualidad. Se observó una gran diversidad genética con prevalencia importante de los linajes LAM, Haarlem y T típicos de un país Ibero-americano. Sin embargo, la dinámica de expansión de las cepas de *M. tuberculosis* en los últimos años en Cuba ha estado marcada por la emergencia de los genotipos Beijing y S.

Agradecimientos

Se agradece la ayuda técnica y recolección de datos de Miguel Echemendía y María Rosarys Martínez.

Este trabajo recibió apoyo de los proyectos "Fortalecimiento del programa nacional de tuberculosis en la República de Cuba", del Fondo Mundial de lucha contra el sida, la tuberculosis y la malaria (CUB-708-G03-T) y "Desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico, detección de resistencia, caracterización molecular e implementación de sistemas de vigilancia epidemiológica para el control de la tuberculosis", del Convenio Integral de Cooperación Cuba-Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magdinier H, Ribeiro A, Cardoso MA, da Silva MA, Onofre FF. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012;12:649-56.
2. Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM. Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(10):1708-9.
3. WHO: Global tuberculosis control. Geneva: World Health Organization; 2011 [citado 4 Feb 2014]. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf
4. MINSAP. Anuario Estadístico de Salud 2010. Dirección Nacional de Estadísticas. La Habana: MINSAP; 2011 [citado 4 Feb 2014]. Disponible en: http://files.sld.cu/dne/files/2012/04/anuario_2011.pdf
5. García-Pachón E, Rodríguez JC. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. *Arch Broncoemol.* 2005;41(11):618-24.
6. 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(4):907-14.
7. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international Spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6(23):1-17.
8. Díaz R. Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y su implicación en el control de la tuberculosis en Cuba [tesis]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2003.
9. Diaz R, Kremer K, de Haas PEW, Gomez RI, Marrero A, Valdivia JA, 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(9):743-50.

10. Kent PT, Kubica GP. Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta: Ga. US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1985.
11. Marzouk M, Kahla IB, Hannachi N, Ferjeni A, Salma W, Ghezal S, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(4):396-9.
12. Van Soolingen D, de Haas P, Kremer K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Protocol. Holanda: RIVM; 2002.
13. 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(11):2465-6.
14. 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(24):1703-9.
15. Sola C, Ferdinand S, Mammìna C, Nastasi A, Rastogi N. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on Spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a Spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1559-65.
16. Abadia E, Sequera M, Ortega D, Méndez MV, Escalona A, Da Mata O, et al. *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BMC Infect Dis*. 2009;9:122.
17. Duchene V, Ferdinand S, Filliol I, Guegan JF, Rastogi N, Sola C. Phylogenetic reconstruction of *Mycobacterium tuberculosis* within four settings of the Caribbean region: tree comparative analyse and first appraisal on their phylogeography. *Infect Genet Evol*. 2004;4(1):5-14.
18. Molina CA, Moreno E, Ocampo J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):448-55.
19. Diaz R, Goza R, Montoro E. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Havana, Cuba. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(11 Suppl 3):S278.
20. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García I, Cabrera P, et al. Epidemiological evidence of spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7):1165-70.

21. WHO: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Geneva: World Health Organization; 2010 [citado 4 Feb 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/tb/publications/2010/978924599191/en/index.html>

Recibido: Febrero 23, 2014.
Aprobado: Julio 28, 2014.

Raúl Díaz Rodríguez. Dr. en Ciencias de la Salud. Investigador y profesor titular.
Dirección postal: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), Autopista Novia del Mediodía Km 6, Lisa, La Habana 11300, Cuba.
Correo electrónico: raul.diaz@infomed.sld.cu raul.diaz@ipk.sld.cu