

## Análisis genotípico de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* en La Habana en 2009

### Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Havana, 2009

MSc. Roxana Gozá Valdés, Dr. Raúl Díaz Rodríguez

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias (LNRITM). Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** la búsqueda de alternativas al polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) con la sonda IS 6110 en la genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* ha propiciado el desarrollo de la tipificación con número variable de repeticiones en tándem de unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias (MIRU-VNTR, siglas en inglés).

**Objetivo:** evaluar la diseminación de genotipos de *M. tuberculosis* en La Habana en 2009.

**Métodos:** se estudiaron 80 aislamientos procedentes de unidades de salud durante 2009 y se caracterizaron por tipificación MIRU-VNTR-15. Los genotipos se expresaron como códigos numéricos según el número de copias de cada MIRU-VNTR amplificado, y se analizaron con la herramienta bioinformática "en línea" MIRU-VNTR *plus*. Se utilizó MIRU-VNTR-24 como tipificación secundaria en los aislamientos agrupados por MIRU-VNTR-15.

**Resultados:** con MIRU-VNTR-15 se definieron 41 genotipos diferentes; entre ellos, 33 únicos (41,25 %), y ocho que agruparon a 47 aislamientos (58,75 %). La tipificación MIRU-VNTR-24 logró diferenciar sólo el 5 % de éstos, disminuyendo el porcentaje de agrupamiento a 53,75 %.

**Conclusiones:** el elevado agrupamiento encontrado sugirió transmisión reciente, lo que pudo tener influencia en la incidencia de tuberculosis en La Habana en 2009.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, genotipificación, MIRU-VNTR, tipificación molecular, caracterización genética, La Habana.

## ABSTRACT

**Introduction:** the search for alternatives to restriction fragment length polymorphism (RFLP) with the IS6110 probe for the genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* has paved the way for the development of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing (MIRU-VNTR).

**Objective:** evaluate the spread of *M. tuberculosis* genotypes in Havana in 2009.

**Methods:** eighty isolates obtained from healthcare centers during 2009 were examined and characterized by 15-loci MIRU-VNTR typing. The genotypes were expressed as numerical codes according to the copy number of each amplified MIRU-VNTR, and they were analyzed with the online bioinformatic tool MIRU-VNTR *plus*. 24-loci MIRU-VNTR was used for secondary typing of isolates grouped by 15-loci MIRU-VNTR.

**Results:** forty-one different genotypes were defined with 15-loci MIRU-VNTR. Of these, 33 were single (41.25 %), whereas 8 clustered 47 isolates (58.75%). Only 5 % of the latter could be differentiated by 24-loci MIRU-VNTR, lowering the percentage of clustering to 53.75 %.

**Conclusions:** the high clustering values revealed by the study suggest that transmission was recent. This may have had an influence on the incidence of tuberculosis in Havana in 2009.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, genotyping, MIRU-VNTR, molecular typing, genetic characterization, Havana.

---

## INTRODUCCIÓN

En los inicios del nuevo milenio, la tuberculosis (TB) se considera la enfermedad infecciosa humana más importante, debido a sus altas cifras de morbimortalidad a nivel mundial.

Los métodos de genotipificación de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* han demostrado tener una gran utilidad en el control de la tuberculosis. Desde el punto de vista clínico, la aplicación de la genotipificación permite la detección o exclusión de errores de laboratorio y el seguimiento de casos de recaída para identificar las fallas en el tratamiento, reactivaciones endógenas, y reinfecciones (exógenas). Por otra parte, desde un enfoque de salud pública, la genotipificación facilita la detección de brotes no sospechados y la identificación de cadenas de transmisión y casos secundarios de infección.<sup>1</sup>

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción con la secuencia de inserción IS6110, (RFLP-IS6110, siglas en inglés), ha sido el método de tipificación más aplicado como método de referencia en la epidemiología molecular desde 1993.<sup>2</sup> No obstante, las limitantes del RFLP-IS6110 han propiciado el desarrollo de nuevas herramientas como: la genotipificación con número variable de repeticiones en tándem de unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias (MIRU-VNTR, siglas en inglés). La tipificación por MIRU-VNTR, basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), compara la variación de la talla de varios MIRU-VNTR localizados en diferentes lugares del genoma como marcadores genéticos. La última versión de ésta técnica emplea 24 *loci* MIRU-VNTR, incluyendo

---

15 *loci* altamente discriminatorios utilizados fundamentalmente, para estudios epidemiológicos de rutina. El poder resolutivo de la tipificación MIRU-VNTR-24 es igual o superior (en muchos casos, según la zona geográfica) al del RFLP-IS 6110 y se recomienda como herramienta epidemiológica de muy alta resolución y para estudios filogenéticos. Esta variante está propuesta como nueva técnica de referencia para la caracterización genética de *M. tuberculosis*.<sup>2</sup>

En Cuba, se implementó la tipificación molecular para aislamientos de *M. tuberculosis* en la década de los 90. El último estudio genético-poblacional realizado en La Habana, Cuba (1998), determinó por RFLP-IS6110 un porcentaje elevado (45 %) de agrupamiento de aislamientos de *M. tuberculosis* (indicativo de alta transmisión reciente de la enfermedad).<sup>3</sup> Por otra parte, la tipificación MIRU-VNTR-15 *loci* se implementó en 2009 para caracterizar 12 aislamientos de *M. tuberculosis* multidrogosresistentes (MDR).<sup>4</sup> Sin embargo, desde hace más de una década no se tienen datos de la dinámica de transmisión de la enfermedad en Cuba. En el presente trabajo se utilizó las tipificaciones MIRU-VNTR-15 y MIRU-VNTR-24 (como herramienta secundaria) para evaluar la diseminación de genotipos de *M. tuberculosis* en La Habana en 2009.

## MÉTODOS

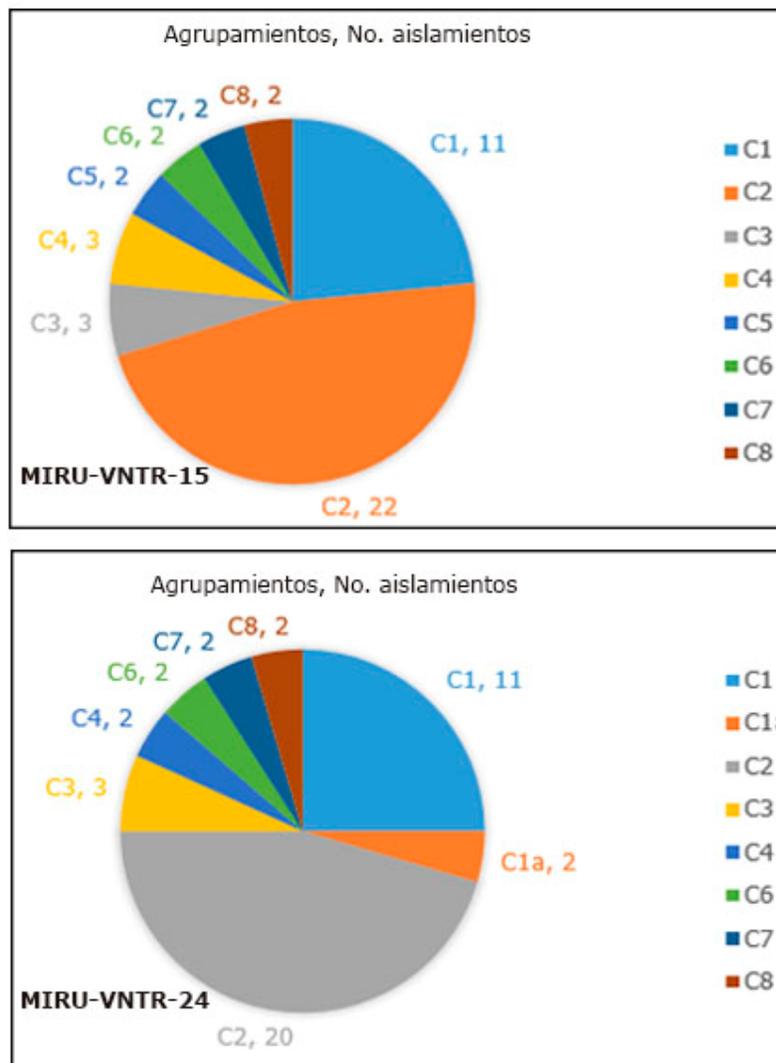
De enero a diciembre de 2009, en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias (LNRITM) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) se estudiaron 80 aislamientos de *M. tuberculosis* de muestras de esputo de 80 pacientes procedentes de unidades de salud de La Habana. La tipificación MIRU-VNTR-15 se efectuó según Supply *et al.*, 2006.<sup>2</sup> Se utilizaron pares de oligonucleótidos correspondientes a las regiones flanqueantes de los 15 *loci* MIRU 4, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 31, MIRU 26, MIRU 40, VNTR 424, VNTR 577, VNTR 1955, VNTR 2163b, VNTR 2165, VNTR 2401, VNTR 3690, VNTR 4052 y VNTR 4156; los cuales se amplificaron y analizaron individualmente. En la PCR (volumen final de 20  $\mu$ L) se empleó el sistema de amplificación HotStar de Qiagen (Hilden, Alemania), con un termociclador Alpha SC (Analytik Jena AG, Jena, Alemania) bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95 °C, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C y 1,5 min a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Las ampliaciones se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 %. El número de copias de cada *locus* para cada aislamiento se estimó según la talla del producto amplificado, empleando los marcadores 50 y 100 pb DNA ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.).<sup>5</sup>

Los genotipos MIRU-VNTR 15 *loci* se definieron como códigos numéricos de 15 dígitos, donde cada dígito representa el número de copias repetidas en tándem. Se definió como agrupamiento cuando dos o más aislamientos tuvieron genotipos idénticos (15 dígitos iguales).<sup>6</sup> Para confirmar los agrupamientos definidos por MIRU-VNTR-15, se utilizó MIRU-VNTR-24 como tipificación secundaria, amplificando nueve *loci* adicionales MIRU 2, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 27, MIRU 39, VNTR 2347, VNTR 2461 y VNTR 3171. Los genotipos obtenidos (15 o 24 dígitos) se analizaron con la herramienta bioinformática "en línea" MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org>)<sup>7</sup> 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>8</sup> El poder discriminatorio de las técnicas de tipificación se determinó mediante el cálculo del índice discriminatorio de Hunter y Gaston, 1988 (HGDI)<sup>9</sup> y el índice de agrupamiento según lo descrito por Small *et al.*, 1994.<sup>10</sup>

## RESULTADOS

La aplicación de los métodos de tipificación MIRU-VNTR-15 y MIRU-VNTR-24 a los 80 aislamientos, dio los resultados que se muestran en la Tabla. Como se puede observar, con la aplicación de MIRU-VNTR-24 el porcentaje de aislamientos en agrupamientos disminuyó a 53,75 % (43/80). Se obtuvo la misma cantidad de agrupamientos, y sólo se diferenciaron seis aislamientos de los 47 agrupados por el método MIRU-VNTR-15.

En cuanto a la distribución de los 80 aislamientos por agrupamientos según MIRU-VNTR-15 y MIRU-VNTR-24, en la figura se puede apreciar que del agrupamiento (C1) se separaron 2 aislamientos conformando uno nuevo (C1a), se diferenciaron 2 aislamientos del agrupamiento (C2) como genotipos únicos, y el agrupamiento (C5) se desintegró; resultando en la obtención de mayor cantidad de genotipos diferentes (45), así como de genotipos únicos (37) (Tabla 1).



**Fig.** Distribución de los aislamientos por agrupamientos según MIRU-VNTR-15 y MIRU-VNTR-24 en 80 aislamientos de *M. tuberculosis*. La Habana. 2009.

**Tabla.** Análisis comparativo entre las técnicas MIRU-VNTR-15 y MIRU-VNTR-24 en aislamientos de *M. tuberculosis*. La Habana. 2009

<b>Aspectos a comparar</b>	<b>MIRU-VNTR-15 n=80</b>	<b>MIRU-VNTR-24 n=80</b>
Aislamientos pertenecientes a agrupamientos ( % )	47 (58,75)	43 (53,75)
Cantidad de agrupamientos (No. de aislamientos por agrupamiento)	8 (2-22)	8 (2-20)
Genotipos diferentes	41	45
Genotipos únicos ( % )	33 (41,25)	37 (46,25)
Índice de agrupamiento	0,4875	0,4375
Índice Discriminatorio de Hunter Gaston (HGDI)	0,9064	0,9257
<i>Loci</i> Altamente Discriminatorios (>0,6)	VNTR 1955, VNTR 2163b, VNTR 4052, MIRU 10, MIRU 40, MIU 31	

En esta [tabla](#) además se puede observar que el índice de agrupamiento (rango de transmisión reciente) obtenido con MIRU-VNTR-24 fue inferior. En relación al poder discriminatorio de ambas técnicas, se obtuvo un valor de HGDI superior (0,9257) para MIRU-VNTR-24. La diversidad alélica (*h*) de los 15 *loci* MIRU-VNTR osciló entre 0,21 y 0,7. Se encontraron seis *loci* altamente discriminatorios ( $h > 0,6$ ): VNTR 1955, VNTR 2163b, VNTR 4052, MIRU 10, MIRU 40 y MIRU 31; ocho *loci* moderadamente discriminatorios ( $0,3 \leq h \leq 0,6$ ): VNTR 0424, VNTR 0577, VNTR 2165, VNTR 2401, VNTR 3690, VNTR 4156, MIRU 04, MIRU 26 y sólo resultó pobremente discriminatorio ( $h < 0,3$ ) el *locus* MIRU 16. De los nueve *loci* adicionales incorporados en la tipificación MIRU-VNTR-24, ninguno resultó altamente discriminatorio, dos *loci* MIRU 02, MIRU 39 moderadamente discriminatorios y siete resultaron pobremente discriminatorios.

La tipificación MIRU-VNTR-24 tuvo una eficiencia discriminatoria superior por agrupar menos cantidad de aislamientos y tener un valor de HGDI superior. Los nueve *loci* MIRU-VNTR adicionados en este formato resultaron tan poco discriminatorios que el incremento en un 5 % en la resolución no fue estadísticamente significativo ( $p = 0,523$ ). Existió concordancia en cuanto a la identificación de genotipos por ambas técnicas en el 95 % (76/80) de los aislamientos. Se encontró concordancia completa o alta con datos MIRU-VNTR-24 en todos los agrupamientos definidos por MIRU-VNTR-15.

## DISCUSIÓN

La búsqueda de una técnica molecular alternativa al RFLP, propició el desarrollo de la tipificación por MIRU-VNTR. Supply *et al.*, 2006 publicaron un protocolo con 24 *loci* MIRU-VNTR (12 MIRU, 12 VNTR), considerando que un subgrupo de 15 *loci* (MIRU-VNTR-15) tenía una alta eficiencia para estudios epidemiológicos (96 % de la resolución obtenida con los 24 *loci*).<sup>2</sup> Se ha reportado una mejor discriminación

con la tipificación MIRU-VNTR-15 (o MIRU-VNTR-24) comparado con RFLP-IS6110 en aislamientos con número bajo de copias de IS6110 (<6 bandas).<sup>7,11</sup>

La epidemiología molecular considera que aislamientos con genotipos idénticos conforman agrupamientos genéticos y los pacientes involucrados son fuertes candidatos a pertenecer a una misma cadena de transmisión, lo que implicaría una infección reciente. Por otra parte, los aislamientos con genotipos únicos están más relacionados con reactivaciones de infecciones latentes.<sup>12</sup> Por tanto, el agrupamiento de aislamientos indistinguibles por tipificación molecular, se ha usado para inferir rangos de transmisión reciente de la enfermedad en una población definida.<sup>7,10</sup>

En este trabajo, el porcentaje de aislamientos en agrupamientos obtenido (58,75 %) con la tipificación MIRU-VNTR-15 se considera alto, teniendo en cuenta que Cuba se encuentra entre los países de baja prevalencia de TB. Por ejemplo, en 2009, se registró una tasa de incidencia de 5,9 casos por cada cien mil habitantes, una de las más bajas en la región de las Américas y el Caribe.<sup>13</sup> Además, Cuba se caracteriza por una inmigración baja desde países en los que existe incidencia alta de TB y circulación elevada de aislamientos MDR, así como por una baja carga de VIH; factores fundamentales en la diseminación de la enfermedad y en la coinfección TB-VIH a escala mundial. Inesperadamente, el valor de agrupamiento de nuestro trabajo superó el de otros estudios, como el de Alonso *et al.*, 2009<sup>6</sup> (43,1 %), con el mismo método y mayor cantidad de aislamientos (343) en un período de tres años en Almería, una provincia de España donde se registra la mayor incidencia de TB del país y hay alto índice de inmigración. También superó a lo encontrado por Godreuil *et al.*, 2007<sup>14</sup> (53,3 %) en Burkina Faso, otra zona de alta incidencia de TB, en un estudio de un año con 120 aislamientos. En cambio, el agrupamiento encontrado en La Habana resultó similar a diferentes trabajos de autores españoles que obtuvieron más de 50 % de casos agrupados.<sup>15, 16</sup> Sin embargo, fue inferior al valor publicado (73 %) por Maes *et al.*, 2008<sup>17</sup> en un estudio aplicando la tipificación MIRU-VNTR-24 a 41 aislamientos en un período de un año en Warao, una zona de población indígena de Venezuela donde existe alta incidencia de TB. En cuanto al rango de agrupamiento (transmisión reciente) obtenido con MIRU-VNTR-15 (48,75 %) en esta investigación también resultó alto. Un valor similar (45 %) se obtuvo en el último estudio genético poblacional (1998) realizado en La Habana con la técnica RFLP-IS6110;<sup>3</sup> pero en este último caso ese alto porcentaje de agrupamiento estuvo aparejado a un incremento de la incidencia de TB en ese período. Este hallazgo alertó sobre la necesidad de reevaluar las estrategias de acción y funcionamiento del programa de control de TB a nivel nacional; y sugirió, al igual que otros estudios en regiones de baja incidencia, que la transmisión reciente era mucho mayor que lo clásicamente supuesto (10 %) por métodos epidemiológicos convencionales en años anteriores.<sup>10</sup>

Por otro lado, también fue similar a lo registrado en algunas zonas de alta incidencia de TB, como Guayana Francesa (49,3 %),<sup>18</sup> región con alta inmigración desde países con elevada incidencia de TB y carga de SIDA; así como a valores de aproximadamente 50 % obtenidos en Zimbabue<sup>19</sup> y Sudáfrica.<sup>20</sup>

No obstante, por considerarse alto el porcentaje de transmisión reciente obtenido con MIRU-VNTR-15 en La Habana en este trabajo, y ser esto contradictorio con lo esperado en regiones de baja incidencia de TB (30-40 %),<sup>21</sup> y con un funcionamiento adecuado de sus programas de control (como Cuba); se decidió utilizar la técnica MIRU-VNTR-24 como herramienta de tipificación secundaria de alta resolución (amplificando 9 *loci* adicionales) en los aislamientos agrupados por MIRU-VNTR-15, y aumentar así la calidad en la asignación de los agrupamientos.

Con la aplicación de la variante MIRU-VNTR-24, el porcentaje e índice de agrupamiento disminuyeron a 53,75 % y 0,4375, respectivamente. No obstante, esta cifra (53,75 %) superó valores de agrupamiento obtenidos en otras regiones de baja incidencia de TB como Irlanda (28,6 %) <sup>22</sup> y Bélgica (21,6 %);<sup>7</sup> así como los de países como Martinica (16,9 %) y Guadalupe (27,2 %).<sup>18</sup> Aunque no se pudieron correlacionar los resultados de la tipificación molecular con los datos epidemiológicos de los casos relacionados (datos incompletos), se piensa que este alto porcentaje de agrupamiento podría sugerir que parte de los casos incidentes de TB en La Habana en 2009 se debiera a transmisión reciente de la tuberculosis, con gran número de aislamientos incluidos en los dos agrupamientos más grandes, según MIRU-VNTR-24. Sin embargo, el porcentaje de agrupamiento podría estar sobrestimado. Según resultados obtenidos en los últimos meses con la técnica de genotipificación *Spoligotyping* en el LNRITM, una cuarta parte de los aislamientos analizados en este trabajo pertenecen al genotipo de la familia de Beijing.<sup>23</sup>

En estudios recientes,<sup>24, 25</sup> otros autores reportan poca discriminación en aislamientos de esta familia con la tipificación MIRU-VNTR-24, sugiriendo el uso de tres regiones VNTR hipervariables adicionales. Los valores de diversidad alélica obtenidos para cada *locus* presentaron mayor concordancia con los resultados obtenidos por Alonso *et al.*, 2008 en España,<sup>11</sup> con Ojo *et al.*, 2010 en Irlanda,<sup>22</sup> y con González, 2009 en un estudio muy puntual realizado en Cuba con MIRU-VNTR-15 aplicado a sólo 12 aislamientos MDR de *M. tuberculosis*.<sup>4</sup> El poder discriminatorio de ambas técnicas resultó más bajo que lo reportado por otros autores, como: Maes *et al.*, 2008 (HGDI=0,95) con MIRU-VNTR-24,<sup>17</sup> Ojo *et al.*, 2010 (HGDI=0,9938) con MIRU-VNTR-24,<sup>22</sup> Joseph *et al.*, 2013 (HGDI=0,9735) con MIRU-12,<sup>26</sup> y Huyen *et al.*, 2013 (HGDI=0,994) con MIRU-VNTR-24.<sup>27</sup>

El incremento en la resolución del método MIRU-VNTR 24 no resultó significativo, lo cual coincide con los criterios de Supply *et al.*, 2006 que plantean que la selección de los nuevos *loci* adicionales pueden ser de valiosa utilidad en estudios filogenéticos, pero poco útiles en estudios epidemiológicos en determinadas zonas geográficas.<sup>2</sup> La adecuada concordancia de genotipos determinada por cada técnica sugiere que MIRU-VNTR-24 es capaz de detectar algunos casos agrupados falsamente por MIRU-VNTR-15, aunque estos comparten una elevada similitud con los otros integrantes del agrupamiento. Los resultados moleculares del presente estudio dan una primera aproximación de la diseminación de genotipos de *M. tuberculosis* en La Habana en el comienzo del siglo XXI y sientan las bases para diseñar estudios de epidemiología molecular en Cuba. Estos hallazgos podrían tener un mayor alcance científico y práctico si se pudieran combinar con una sólida investigación epidemiológica de los casos involucrados, que permitiría conocer con gran precisión la dinámica de transmisión de la tuberculosis en La Habana y ayudar a sugerir medidas diferenciadas y eficaces para mejorar el control de la enfermedad y avanzar hacia la eliminación de la tuberculosis como problema de salud pública.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda técnica y recolección de datos de Dihadenys Lemus, 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. Van Solange D, Kremer K, Vynnycky E. 2003. New perspectives in the molecular epidemiology of tuberculosis, p. 17-45. En: SHE Kaufmann and H Hahn (ed.). *Mycobacteria and TB: issues in infectious diseases*, vol. 2. Karger, Berlín, Alemania.
2. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusgh-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:4498-510.
3. Diaz R, Gómez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Valdivia JA, et al. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba: a molecular epidemiological study by IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:437-43.
4. González Ramón Y. Genotipificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes aisladas en Cuba en el periodo 2000-2008. [Tesis de Diploma]. Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana. 2009.
5. Supply P. Multilocus variable number tandem repeat. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide. Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille, France. 2005.
6. Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Sánchez ML, Herranz M, Peñafiel T, Bonillo MdC, et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2026-32.
7. Allix-Béguet C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1398-406.
8. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht 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.
9. 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.
10. 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;330:1703-09.
11. Alonso-Rodríguez N, Martínez Lirola M, Herránz M, Sánchez-Benítez M, Barroso P, Bouza E, et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping

tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. BMC Microbiol. 2008;8:34.

12. Lucerna MA, Rodríguez-Contreras R, Barroso P, Martínez MJ, Sánchez-Benítez ML, García de Viedma D. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Almería. Factores asociados a transmisión reciente. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:174-8.

13. MINSAP. Anuario estadístico de Cuba 2009. Población. Edición 2010. Oficina Nacional de Estadísticas (ONE), 2010.

14. Godreuil S, Torrea G, Terru D, Chevenet F, Diagbouga S, Supply P, et al. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina Faso. J Clin Microbiol. 2007;45:921-7.

15. López Calleja AI, Lezcano MA, Vitoria MA, Iglesias MJ, Cebollada A, Lafoz C, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* over two periods: a changing scenario for tuberculosis transmission. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11:1080-6.

16. Cacho Calvo J, Astray Mochales J, Pérez Meixeira A, Ramos Martos A, Hernando García M, Sánchez Concheiro M, et al. Ten-year population based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Madrid, Spain. Int J Tuberc Lung Dis. 2005;9:1236-41.

17. Maes M, Kremer K, van Soolingen D, Takiff H, de Waard JH. 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis* (Edinb). 2008;88:490-4.

18. Brudey K, Filliol L, Ferdinand S, Guernier V, Duval P, Maubert B, et al. Long-term population-based genotyping study of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in the French departments of the Americas. J Clin Microbiol. 2006;44:183-91.

19. Easterbrook PJ, Gibson A, Muard 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.

20. Verver S, Warren RM, Munch Z, Vynnycky E, van Helden PD, Richardson M, et al. Transmission of tuberculosis in a high incidence urban community in South Africa. Int J Epidemiol. 2004;33:351-7.

21. Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun , et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J Clin Microbiol. 1998;36:486-92.

22. Ojo O, Sheehan S, Corcoran DG, Nikolayevsky V, Brown T, O'Sullivan M, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Southwest Ireland. Infect Genet Evol. 2010;10:1110-6.

23. Herrera Avila Y. Tipificación con oligonucleótidos espaciadores de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en Cuba, 2009-2010. [Trabajo de Terminación de Residencia en Microbiología]. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), La Habana. 2012.

24. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Millet J, Otten T, Vishnevsky B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci. J Clin Microbiol. 2008;46:3576-84.
25. Yunn Dou H, Lu JJ, Lin ChW, Chang JR, Sun JR, Su IJ. Utility and evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for genotyping mycobacterial tuberculosis isolates. J Microbiol Method. 2009;77:127-9.
26. Joseph BV, Soman S, Radhakrishnan I, Hill V, Dhanasooraj D, Kumar RA, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kerala, India using IS6110-RFLP, spoligotyping and MIRU-VNTRs. Infect Genet Evol. 2013;16:157-64.
27. Huyen MNT, Kremer K, Lan NTN, Buu TN, Cobelens FGJ, Tiemersma EW et al. Clustering of Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Mekong delta in Vietnam on the basis of variable number of tandem repeat versus restriction fragment length polymorphism typing. BMC Infect Dis. 2013;13:63.

Recibido: 28 de octubre de 2013.

Aprobado: 17 de enero de 2014.

*Dra. Roxana Gozá Valdés.* Departamento de Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias (LNRITM). Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, Lisa, La Habana, Cuba.  
Tel: 255-3523. Correo electrónico: [roxanagoza@infomed.sld.cu](mailto:roxanagoza@infomed.sld.cu)