

CIENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS Y SALUBRISTAS

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana  
Facultad de Estomatología "Raúl González Sánchez"

**Contribuciones de la técnica de la Reacción en Cadenas de la Polimerasa a la Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas en Cuba**

**Contributions of the Polymerase Chains Reaction technique to the Molecular Epidemiology of the infectious diseases in Cuba**

**Yunier Arpajón Peña<sup>I</sup>, Ana Ludys Sosa Pérez<sup>II</sup>, Rebeca Doval García<sup>III</sup>**

<sup>I</sup> Licenciado en Microbiología. MSc. en Microbiología. Profesor Auxiliar. Departamento de Patología. e.mail: mpcosme@infomed.sld.cu

<sup>II</sup> Licenciada en Microbiología. Departamento de Patología. e.mail: asosa@psallende.sld.cu

<sup>III</sup> Licenciada en Biología. MSc. en Enfermedades infecciosas. Asistente. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Salvador Allende". e.mail: rebecadoral@infomed.sld.cu

---

**RESUMEN**

**Introducción:** la Epidemiología Molecular es una disciplina que emplea elementos de la epidemiología clásica apoyado en resultados obtenidos mediante herramientas moleculares, por lo que la introducción de la técnica de la Reacción en Cadenas de la Polimerasa (RCP) ha sido muy importante en el desarrollo de la misma.

**Objetivo:** realizar un análisis cronológico de las principales contribuciones desde la introducción de la técnica de Reacción en Cadenas de la Polimerasa en investigaciones de la Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas en Cuba.

**Material y Métodos:** se realizó una revisión de 105 artículos científicos publicados en las principales bases de datos médicas (Infomed, Scielo, PubMed, EBSCO, HINARI), en los que se han expuesto los distintos avances de la introducción de esta técnica molecular en Cuba.

**Resultados:** esta técnica se introdujo con fines epidemiológicos por primera vez en Cuba en 1992 para el diagnóstico perinatal de la infección por VIH-1. En 1997 se realiza la confirmación de la presencia del virus linfotrópico tipo I de las células T humanas y un año después se realiza la primera identificación molecular de cepas del Virus del Papiloma Humano. Entre 1998 y la actualidad se ha introducido en nuestro país la mayoría de los tipos de RCP con fines epidemiológicos y diagnósticos.

**Conclusiones:** la introducción de la técnica de RCP ha revolucionado las investigaciones de Epidemiología Molecular de enfermedades infecciosas en Cuba.

**Palabras clave:** epidemiología molecular, reacción en cadena de la polimerasa, hibridación de ácidos nucleicos, enfermedades infecciosas.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** the Molecular Epidemiology is a discipline that uses elements of the classic epidemiology supported in results obtained by means of molecular tools, therefore the introduction of Polymerase Chain Reaction technique (PCR) it has been very important in the development of the same one.

**Objective:** to carry out a chronological analysis of the main contributions of the PCR technique in Molecular Epidemiology investigations of the infectious diseases in Cuba.

**Material and Methods:** it was carried out a revision of 105 scientific articles published in the main medical databases (Infomed, Scielo, PubMed, EBSCO, HINARI) where they are shown the different advances of the introduction of this molecular technique in Cuba.

**Results:** it was found that this technique was introduced for the first time with epidemiologic grounds in Cuba in 1992 for the perinatal diagnosis of HIV-1 infection. In 1997 it was carried out the confirmation of the presence of the human T-cells lymphotropic virus type I and one year later it was carried out the first molecular identification of Human Papillomavirus strains. Between 1998 and the present time it was introduced in our country most of the types of PCR with epidemiologic and diagnostic purpose.

**Conclusions:** the introduction of the PCR technique has revolutionized the investigations of Molecular Epidemiology of infectious diseases in our country.

**Key words:** molecular Epidemiology, Polymerase Chain Reaction, nucleic acid hybridization, infectious diseases.

---

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas transmisibles constituyen una de las principales causas de muerte tanto en niños como en adultos, particularmente en el llamado Tercer Mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las principales enfermedades infecciosas que provocan tantas muertes en todo el mundo son: las infecciones respiratorias agudas, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), las enfermedades diarreicas agudas, la tuberculosis, la malaria y el sarampión.<sup>1</sup>

---

Algunos autores plantean que en la actualidad en los países desarrollados las enfermedades infecciosas causan mucho más muertes que aquellas cuya etiología no son los microorganismos o sus productos. Es así que en estos países han emergido inesperadamente nuevas enfermedades como la influenza H1N1; sin embargo otras, como la tuberculosis, que se creía estaban controladas han reemergido.<sup>2</sup>

La epidemiología es la ciencia que estudia los determinantes, ocurrencia y distribución de los problemas afines a la salud y enfermedad relacionados con una población en su conjunto. El campo de acción de esta rama de la Medicina se dirige fundamentalmente hacia la prevención erradicación y el control de las enfermedades infecciosas transmisibles emergentes o reemergentes.<sup>2</sup>

En el afán de poder identificar los agentes infecciosos causantes de muchas enfermedades transmisibles se desarrolló la Epidemiología Molecular, como una rama de las Ciencias Médicas que emplea elementos de la epidemiología clásica apoyado en resultados obtenidos mediante herramientas moleculares y que se encarga de determinar las relaciones clonales que existen entre varios individuos de una misma especie en el seguimiento de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas. Su basamento radica en el desarrollo de técnicas que se utilizan para (I) determinar número de clones circulantes, (II) identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, (III) evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y (IV) diferenciar entre infección y recidiva.<sup>3</sup>

El principio de la Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas radica en el estudio de las especificidades del genoma de los agentes etiológicos que las producen: bacterias, virus, viroides, hongos y parásitos. Desde los albores de las Ciencias Biomédicas, siempre se ha tenido la concepción que para realizar la identificación de los agentes infecciosos es necesario el aislamiento de los mismos en medios de cultivos sintéticos como celulares, y así poder tener una evidencia visual de la presencia de estos microorganismos.<sup>3</sup>

Es por esto que se considera el aislamiento microbiológico como el método de oro en la identificación de dichos agentes biológicos. Sin embargo, se ha demostrado que muchos microorganismos no son cultivables, por lo que mediante estos métodos convencionales no se pueden tener evidencias de ellos, y se han venido desarrollando técnicas moleculares que pueden detectar su presencia mediante la búsqueda de trazas de ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico) en muestras de cualquier origen, incluso estando muertos.<sup>3</sup>

Cinco estrategias basadas en la caracterización del ADN proveniente de organismos patógenos son posibles candidatos en estudios de epidemiología molecular: (a) Hibridación de ácidos nucleicos, (b) Identificación de plásmidos, (c) Análisis de patrones de bandas cromosomales, (d) Reacción en Cadenas de la Polimerasa (RCP) y (e) Secuenciación.<sup>4</sup>

Nuestro país no ha estado aislado y mucho menos ajeno a estos adelantos científicos, por lo que se han creado disímiles estrategias para poder adquirir el conocimiento necesario para poder introducir estas tecnologías en nuestro sistema de salud. Ha sido así, que en muchos centros de diagnóstico se han logrado incorporar algunas de las técnicas de RCP en el territorio nacional con fines epidemiológicos.

## OBJETIVO

Por la importancia del tema, además de la necesidad de contar con una herramienta pedagógica actualizada y que sea útil en la enseñanza de la historia de esta importante disciplina, es que nos propusimos como objetivo realizar un análisis cronológico de las principales contribuciones desde la introducción de la técnica de Reacción en Cadenas de la Polimerasa en estudios de Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas en Cuba.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión de 105 artículos científicos publicados en las principales bases de datos médicas (Infomed, Scielo, PubMed, EBSCO, HINARI) en los que se han expuesto los distintos avances desde la introducción de la técnica de la RCP en Cuba. Por tanto se limitó la búsqueda al período entre los años 1992-2014, y se utilizaron como palabras clave: epidemiología molecular, reacción en cadena de la polimerasa, hibridación de ácidos nucleicos, Cuba y enfermedades infecciosas. Fueron excluidos aquellos artículos en los que había información repetida sobre la introducción de dicha técnica en la identificación de un mismo agente infeccioso patógeno, y que había sido publicada anteriormente. Además se consultaron libros de texto de referencia obligatoria sobre el tema.

## DESARROLLO

La Epidemiología Molecular surgió de la integración de la biología molecular en la investigación epidemiológica tradicional y fue acuñada en 1973 por Kilbourne en su artículo: "La epidemiología molecular de la influenza".

Este término se hizo más formal en 1993 con la formulación del libro: *Epidemiología Molecular: Principios y Práctica*, escrito por Schulte y Perera. En este texto se expone el impacto de los avances en la investigación molecular, que han dado lugar a la medición y la explotación de los biomarcadores moleculares como una herramienta vital para vincular las estrategias de investigación moleculares con las epidemiológicas tradicionales.<sup>4,5</sup> A la par de dicho libro se formó la Fuerza Internacional de Epidemiología Molecular.<sup>4</sup>

El desarrollo de esta disciplina se favoreció en 1989, cuando Kary B. Mullis descubre y desarrolla la técnica de la Reacción en Cadenas de la Polimerasa (RCP), más conocida por su denominación en inglés *Polymerase Chain Reaction* (PCR), esto le sirvió a Mullis para que en 1993 le otorgaran el premio Nobel de Química. Esta técnica se basa en la amplificación de pocas cantidades de ADN en más de un millón de veces en poco tiempo. Es una metodología que para su implementación se requieren de muchos recursos financieros por lo que tenerla al alcance es un privilegio. Entre sus ventajas se encuentra la alta especificidad y sensibilidad, además de que los resultados están en un corto tiempo, lo que facilita la adopción de decisiones en casos de explosiones epidémicas. En la actualidad se conocen varios tipos de RCP<sup>3</sup> y en la siguiente Tabla se muestran los principales.

Como ya se comentó, con la técnica de la PCR lo que se logra es amplificar fragmentos de material genético, por lo que para la identificación de un agente

---

infeccioso se cumplimenta la misma con otras técnicas como son la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), el estudio del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas del inglés), o la secuenciación automatizada.

En Cuba comenzó el empleo de la RCP con estos propósitos desde 1992, cuando se utilizó dicha técnica en el diagnóstico perinatal de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), donde se amplificaba el gen *gag* y el sistema de detección era mediante marcaje radiactivo. Posteriormente, en 1996, se comenzaron a amplificar tres regiones consensos importantes del virus (*gag*, *env* y *pol*) mediante una RCP anidada doméstica, pero la alta manipulación, el consumo de tiempo, así como la aparición de reacciones inespecíficas, impuso el empleo de estuches comerciales.<sup>6</sup>

Es por ello que tenemos que resaltar la voluntad política del Estado cubano en preservar la salud de la población, pues tan solo transcurrieron 3 años desde que salió a la luz el primer reporte de la técnica para que se entrenaran en el exterior especialistas cubanos y se introdujeran en prácticas realizadas en los principales institutos investigativos de nuestro país, a pesar de que el soporte técnico es muy costoso.

Años antes, específicamente en 1994, se introduce en Cuba por primera vez esta técnica para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis.<sup>7</sup>

En marzo de 1995 ocurrió un brote de fiebre y *rash* en la antigua provincia de Ciudad de La Habana y en las muestras de 35 pacientes se descartaron los virus del dengue, sarampión, rubeola, herpes simple y Epstein Barr como agentes causales del brote. Un año después se pudo confirmar mediante RCP anidada que los pacientes habían sido afectados por Parvovirus B19, siendo este el primer brote confirmado de este virus en Cuba<sup>8</sup>. A finales de ese año, por medio de la reacción en cadena de RPC, se obtuvo en el Instituto de Medicina Tropical "Dr. Pedro Kourí" (IPK) una sonda para el gen que codifica la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) que portaba una cepa de referencia de *Vibrio cholerae* 01 569B biotipo clásico. Con esta sonda se pudo estudiar un gran número de muestras de pacientes con sospecha de cólera recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedad Diarreica Aguda del IPK, no solamente provenientes de nuestro país sino también de otras partes del mundo.<sup>9</sup> Estos resultados reafirman la posición de los científicos cubanos en adaptar las condiciones ideales para la ejecución de esta técnica a las condiciones reales de nuestro país, y así poder tener herramientas propias para realizarlas, lo que hace más barata su implementación.

Hacia 1996 ya se pudo diseñar oligonucleótidos para poder amplificar fragmentos de ADN de 400 pares de bases mediante RCP en la detección de *Escherichia coli* enterotoxigénica LT(+) en nuestro país. La RCP tuvo resultados positivos con las cepa de colección *E. coli* O:149 K: 88 (LT+) y con 20 cepas aisladas de pacientes con diarreas agudas. Se observaron resultados negativos con *Escherichia coli* O:101 K:99 NM (ST+), *Vibrio cholerae* 01 y *Aeromonas hydrophila*, por lo que ya se tenía una herramienta sensible y específica en la vigilancia epidemiológica de esta enterobacteria.<sup>10</sup> En ese año, en el Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil se llevó a cabo la confirmación molecular de la presencia en Cuba del virus linfotrópico tipo I de las células T humanas en un grupo de 11 pacientes a los que se les había realizado la confirmación serológica por inmunoelectrotransferencia. En estos individuos no se encontró positividad para el HTLV-II.<sup>11</sup>

En 1997, se desarrolló por un grupo de investigadores del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Pedro Kourí", un protocolo para la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en la identificación del Virus Sincitial Respiratorio (VSR) con el uso de la cepa de referencia Long perteneciente al subgrupo A del VSR. El método clásico para el diagnóstico del VSR es el aislamiento en cultivo celular, pero puede conllevar a resultados falsos negativos ya que este virus es extremadamente lábil. Además, el cultivo puede necesitar de 2 a 4 semanas para dar el diagnóstico definitivo, mientras que con la RCP los resultados están en 12 horas.<sup>12</sup> En ese año, mediante la técnica de RCP anidada múltiple, se llevó a cabo la detección de herpesvirus [virus de herpes simple (VHS), Citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la varicela zóster (VVZ) y/o el virus del herpes humano 6 (VHH6)] en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con SIDA y sospecha clínica de meningoencefalitis por el VHS.<sup>13</sup> Estos virus circulan con mucha frecuencia en la población cubana, por lo que con el desarrollo de esta RCP múltiple se tiene información sobre varios *locus* en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos y la construcción de bases de datos es más rápida.

En 1998, se realizó una investigación con el fin de conocer cuánto tiempo pueden circular y permanecer en el ambiente las cepas de Poliovirus derivadas de la vacuna oral de virus atenuado, para lo cual se aplicó RCP directamente tanto a la totalidad de las muestras como a las que fueron positivas por cultivo celular. En este caso se hizo extracción del ARN por el método del TRIZOL y los cebadores usados para la RCP fueron cebadores degenerados. Estos cebadores los diseñaron Kilpatrick y colaboradores en 1998 e hibridan con sitios altamente conservados dentro de la región VP1 de los Poliovirus.

Con este estudio se concluyó que la permanencia de los virus en el ambiente no sobrepasa las 12 semanas posteriores a la inmunización con la vacuna oral de virus atenuado.<sup>14</sup> En este año, un grupo de investigadores del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, demostró que entre los agentes etiológicos de la epidemia de Neuropatía ocurrida, entre 1991-1993, en el país se encontraban cuasiespecies enterovirales con propiedades biológicas alteradas. Para ello se amplificaron secuencias virales del líquido cefalorraquídeo de pacientes afectados con el empleo de oligonucleótidos homólogos con la región 5' de los Enterovirus.<sup>15</sup> A la par de este estudio (1998), otros investigadores, esta vez del IPK, demostraron la presencia de virus Coxsackie A9 (no reportada anteriormente) que produjo efecto citopático ligero en pacientes con neuropatía epidémica.<sup>16</sup>

Entre 1997-1998, se aplicó la técnica de RCP para la detección de secuencias de Papillomavirus humano (PVH) mediante controles de líneas celulares de cáncer cervical y tejidos obtenidos por biopsia con diagnóstico clínico positivo a PVH. Con este estudio fue posible amplificar secuencias de ADN correspondientes a los PVH 6 y 11, considerados dentro del grupo de bajo riesgo y de los PVH 16, 18, 31 y 33 comprendidos en el grupo de alto riesgo.<sup>17</sup>

Bravo y colaboradores demostraron en 1999 la presencia de toxina termoestable de cepas de *Vibrio cholerae* no-01 toxigénicas, aisladas de heces de niños menores de 5 años de edad con Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) y procedentes de siete diferentes centros provinciales de Higiene y Epidemiología (Guantánamo, Las Tunas, Camagüey, Santiago de Cuba, La Habana, Holguín y Granma) del país. Para ello se utilizaron cebadores de 21 y 23 pares de base, se aplicó la técnica de hibridación ADN/ADN y como sonda fragmentos de ADN que codifica para la toxina termoestable, insertado en el sitio *Sma*I del plásmido Bluescript-SK+/-, portado por una cepa de *Escherichia coli* K12. Estos resultados permitieron establecer una alerta epidemiológica en Cuba, pues estas cepas pueden ser infectadas por el fago

CTX (elemento que transporta los genes que codifican para la toxina colérica); lo que les conferiría un potencial epidémico similar al del agente etiológico del cólera.<sup>18</sup>

Un año después (2000) un grupo de investigadores del IPK, estudiaron de forma evolutiva, durante 16 semanas, un grupo de 12 pacientes con trasplantes de riñón en el Instituto de Nefrología, para monitorear la infección por Citomegalovirus y los mecanismos involucrados en la relación virus-infección-rechazo. Para ello se realizó una RCP anidada múltiple que permitió detectar en un solo tubo de reacción la presencia además de Virus Herpes Simplex 1 y 2, Virus Varicela-Zóster, Virus Epstein-Barr y Virus Herpes Humano-6.<sup>19</sup> Con el fin de mantener la vigilancia epidemiológica a nivel molecular sobre la circulación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en Cuba se llevó a cabo la aplicación del ensayo de movilidad del heterodúplex en 2001. Para ello se utilizó una muestra formada por 70 personas con diagnóstico positivo de anticuerpos contra VIH-1, confirmado por *Western blot* durante 1997, procedentes de las 11 provincias con mayor prevalencia de la infección por este virus en el país. Mediante esta investigación se demostró que en nuestro país los subtipos de VIH-1 existentes son A, B y C con predominio del subtipo B.<sup>20</sup>

En 2001 se estudiaron 18 cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana de tres provincias de Cuba, recepcionadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Leptospira* (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK): 10 cepas de Villa Clara (período 1998-1999), 7 cepas de Holguín (período 2000-2001) y 1 cepa de Las Tunas (del año 2001). En todas las cepas se obtuvo un mismo producto de amplificación de 631 pb del gen 16 S del ADN ribosomal.<sup>21</sup> Mediante la RCP se pudo realizar el diagnóstico del primer caso diagnosticado en Cuba (2002) de una leucemia / linfoma tipo T del adulto (LLTA) relacionada con la infección por el virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I), lo cual fue de gran importancia porque sirvió de alerta al evidenciar que dicho retrovirus estaba circulando.<sup>22</sup> Por su parte, en ese año, se realizó la detección simultánea de los virus de la Influenza A, B y C, Virus Sincitial respiratorio y Adenovirus en muestras clínicas mediante un PCR múltiple anidado por reverso-transcripción, introducido en el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para el virus influenza, localizado en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".<sup>23</sup>

Climent y colaboradores (2002) describieron nuevos cebadores, derivados del gen 16S ARNr (ARN ribosomal), para la detección e identificación simultánea de los microorganismos que con mayor frecuencia producen meningoencefalitis bacteriana: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus agalactiae*.<sup>24</sup> La amplificación del ADN proviral mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP) constituye un método preferencial para el diagnóstico perinatal de la infección por VIH-1 a partir de los 15 días de nacido. Es por ello que entre 2005 y 2007 se trabajaron mediante el estuche comercial AMPLICOR HIV-1 DNA 346 muestras de sangre total de niños nacidos de madres seropositivas al VIH-1.<sup>6</sup> Esta técnica resultó ser reproducible en las condiciones cubanas y los resultados obtenidos permitieron realizar el diagnóstico y seguimiento de niños nacidos de madres seropositivas.

En 2005, se publican en la revista *AIDS* los primeros resultados de la epidemiología molecular del sarcoma de Kaposi asociado a Herpesvirus, pudiéndose identificar los subtipos A1, A2, A3, A5, B1, B2, y C3 como circulantes en 23 pacientes con SIDA de nuestro país.<sup>25</sup> Estos resultados fueron comparados con los obtenidos de pacientes alemanes y publicados en la revista *Virology* en el mismo año.<sup>26</sup>

En 2006, se realizó la estandarización de las condiciones de amplificación del gen que codifica para la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) de *Leishmania*

mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-Hsp70), así como el análisis posterior por RFLP del producto amplificado, utilizando como molde ADN puro de una cepa de referencia de *Leishmania mexicana*.<sup>27</sup> Entre los meses de abril y diciembre de 2006 se llevó a cabo un estudio por el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios (LNRVR) del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Pedro Kourí" de La Habana con el fin de demostrar la presencia de Rinovirus en niños menores de un año. Para ello se aplicó un protocolo de RCP múltiple que permite la detección simultánea de 14 virus respiratorios, por lo que la detección de coinfecciones fue factible al utilizar este método; así como también brindó la posibilidad de descartar otros virus que pudieran estar afectando a los menores.<sup>28</sup>

En 2008, se publica el primer reporte de detección de *Pneumocystis jiroveci* en tejidos embebidos en parafina de fallecidos cubanos por VIH/SIDA mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.<sup>29</sup> Otro grupo de investigadores de este Centro, realizan a la par el primer estudio realizado en Cuba sobre la detección de ARN del virus de la Hepatitis C en pacientes VIH positivos, para lo cual se utilizaron estuches comerciales de factura nacional.<sup>30</sup> En este año, se realiza la normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para determinar la carga viral del herpesvirus humano 8, implicado en todas las variantes clínico-epidemiológicas del sarcoma de Kaposi (clásico, endémico, iatrogénico y epidémico), así como su participación en la génesis del linfoma de efusión primario (LEP) y en la enfermedad multicéntrica de Castleman.<sup>31</sup> Con la introducción de esta técnica de RCP en tiempo real se pudo cuantificar la cantidad de material viral presente en los individuos afectados y debido a que se utilizan cebadores normales para su realización la hace más barata, por tanto su uso no queda limitado a unos reactivos determinados.

Además se optimizó la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) en el IPK (2008), para la caracterización genética de cepas de referencia de *Leishmania*.<sup>32</sup> En abril de 2009, se identificó en México y los Estados Unidos una variante del virus influenza A/H1N1 pandémico de origen porcino, lo cual determinó que fuese declarada rápidamente la primera pandemia del siglo XXI. Es por ello que en nuestro país, entre 2009-2011, se estableció una estrategia para la caracterización molecular del mismo, mediante la secuenciación nucleotídica que permitiera diagnosticar diferencialmente los virus influenza A estacionales del nuevo virus pandémico. Con esta estrategia se pudo obtener la mayor cantidad de información posible desde el punto de vista molecular de los genes hemaglutinina y neuraminidasa, tanto de pacientes que sufrieron una enfermedad tipo influenza como los que padecieron de una infección respiratoria aguda grave y los que fallecieron.<sup>33</sup> Hasta entonces solamente se contaba con capacidad diagnóstica para detectar los virus de influenza A (aviar y humanos) e identificar los subtipos H1N1 estacional, H3N2, H5N1, H7N7 y H9N2, por lo que en 2010 se desarrolló un nuevo ensayo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) capaz de detectar el virus influenza A H1N1 pandémico (H1N1 pdm), de origen porcino.<sup>34</sup>

En 2011, se confirma la bacteria *Rhodococcus equi* en líquido pleural de un paciente VIH/SIDA mediante la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción que incluye a la RCP. Esta bacteria, con el empleo de métodos convencionales de identificación, puede ser confundida con *Acinetobacter* o ser tratada como una micobacteria de crecimiento rápido, por lo que su identificación certera ha devenido mucha importancia en las conductas a seguir en el tratamiento de los pacientes. También, alerta a los profesionales médicos sobre la presencia de *R. equi* en muestras respiratorias de pacientes inmunocomprometidos. Finalmente, este protocolo pudiera resultar de mucha utilidad para conocer la verdadera incidencia de *R. equi* en pacientes seropositivos al VIH en Cuba.<sup>35</sup> Al siguiente año (2012) se empleó por primera vez en Cuba la detección molecular del ADN de

*Toxoplasma gondii* en sangre de pacientes con toxoplasmosis ocular, mediante la amplificación del gen *b1* de dicho protozoo.<sup>36</sup> Recientemente (2013) el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Pedro Kourí" realizó la identificación molecular del agente causal de leptospirosis a partir de tejidos frescos en la serie de casos de fallecidos con sospecha de esta enfermedad, recibida en el LNRL-IPK durante el período 2008-2011,<sup>37</sup> mientras que en este año se realiza la primera investigación mediante RCP cuantitativa sobre prevalencia y distribución de genotipos de *Pneumocystis jirovecii* en infantes cubanos.<sup>38</sup>

Haciendo un análisis de todo lo anteriormente recopilado, nos permitimos asentir que en nuestro país la situación diagnóstica de un gran número de enfermedades infecciosas está muy bien controlada y se cuenta con diversos laboratorios con capacidad de identificar distintos microorganismos. Esto se debe a la prioridad que tiene la salud y nuestros programas de control, los que se caracterizan por ser equitativos para toda la población. Con ellos se brinda protección a todos los sectores poblacionales, desde la Atención Primaria, por lo que poseer un sistema de vigilancia epidemiológica con laboratorios muy bien estructurados es un privilegio. El control eficaz de las enfermedades infecciosas es un desafío mundial que requiere de soluciones científicas, médicas, económicas, sociológicas, políticas y educativas.

## CONCLUSIONES

La introducción progresiva de técnicas moleculares en estudios epidemiológicos en Cuba ha sido necesaria para determinar el número de clones de patógenos circulantes, además que mediante estas se ha podido identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión de enfermedades infecciosas, así como evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva. Por otra parte, han contribuido al fortalecimiento del sistema de vigilancia de enfermedades infecciosas de interés nacional e internacional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Llops A, Valdés-Dapena M, Zuazo J. Principios básicos de epidemiología de las enfermedades transmisibles. En: Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas; 2001, p. 13-18.
2. Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D. Epidemiology. En: Biology of microorganisms. 13th ed. San Francisco, CA: Pearson Education, Inc.; 2012, p. 914-942.
3. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(6): 355-60.
4. Porta M, editor. Greenland S, Hernán M, dos Santos Silva I, Last JM, editores asociados. A dictionary of epidemiology, 6ta. edición. New York: Oxford University Press; 2014.

5. García ML. Epidemiología molecular en México. Gac Méd Méx. 2003; 139(5): 472-476.
6. Machado L, Blanco M, Lubián A, Díaz H. Empleo del AMPLICOR HIV-1 DNA test v 1.5 en el diagnóstico de la infección perinatal por el VIH-1 en Cuba. Rev Cub. Med Trop [revista en la Internet]. 2010 Ago; 62(2): 154-156. [Citado 2013 Dic 07]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602010000200011&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000200011&lng=es) .
7. Diaz R, Kremer K, de Haas P, Gómez R, Marrero A, Valdivia J. *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. Tub. Lung. Disea. 1998; 2(9): 743-750.
8. Guzmán M, Rosario D, Rodríguez M., Álvarez M, Rodríguez R, Oropesa S. *et al.* Diagnóstico virológico de un brote de fiebre y *rash* producido por Parvovirus B19, Cuba, 1995. Rev Cub. Med Trop [revista en la Internet]. 1997 Abr; 49(1): 14-20. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601997000100002&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601997000100002&lng=es)
9. Bravo L, Monté R, Ramírez M, Maestre J, Suárez O, Morales J. Aplicación de la técnica de hibridación en colonias para la identificación de *Vibrio cholerae* 01 toxigénico. Rev Cub. Med Trop [revista en la Internet]. 1996 Dic; 48(3): 169-170. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601996000300007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601996000300007&lng=es)
10. Ramírez M, Monté R, Regue M, Bravo L, Maestre J, García B. Detección de *Escherichia coli* toxigénica (LT) mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cub. Med Trop [revista en la Internet]. 1996 Dic; 48(3): 165-168. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601996000300006&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601996000300006&lng=es) .
11. Rolo F, Blanco M, Mato LJ, Lubián A, Díaz H. Confirmación de la presencia en Cuba del virus linfotrópico tipo I de las células T humanas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cub. Med Trop [revista en la Internet]. 1997 Dic; 49(3): 204-208. [citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601997000300008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601997000300008&lng=es)
12. Sarmiento L, Chacón D, Valdivia A, SAVón C, Goyenechea A. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación del virus sincitial respiratorio. Rev Cub. Med Trop [revista en la Internet]. 1997 Abr; 49(1): 21-23. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601997000100003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601997000100003&lng=es) .
13. Kourí V, Suárez C, Resik S, García S. Detección de herpesvirus en pacientes inmunocomprometidos con meningoencefalitis, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cub. Med Trop [revista en la Internet]. 1998 Dic; 50(3): 186-190. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601998000300003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601998000300003&lng=es) .

14. Jiménez P, Más P, Sarmiento L, Bello M, Palomera R, Barrios J. Aportes al conocimiento acerca de la permanencia y circulación del poliovirus vacunal en el ambiente. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2001 Ago; 53(2): 118-121. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602001000200009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602001000200009&lng=es) .
15. Rodríguez M, Berlanga J, Hayes O. Etiología nutro-viral de la neuropatía epidémica. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601998000400003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601998000400003&lng=es)
16. Sarmiento L, Guzmán M, Beck M, Shi Q, Handy J, Más P. Caracterización genómica de la cepa cubana de efecto citopático ligero. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601998000400010&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601998000400010&lng=es)
17. Soto Y, Muné M, Goicolea A, Morales E, Michell J, Valdés O. *et al* . Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus humano. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 1998 Dic; 50(3): 191-198. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07601998000300004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601998000300004&lng=es) .
18. Bravo L, Ramírez M, Maestre J, Llop A, Cabrera R, García B. *et al*. *Vibrio cholerae* No-01 toxigénico. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2000 Ago; 52(2): 106-109. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602000000200005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602000000200005&lng=es) .
19. Resik S, Enamorado A, Kourí V, Suárez C, García S. Monitoreo de la infección por citomegalovirus en pacientes con trasplante renal: primera experiencia en Cuba. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2000 Dic; 52(3): 203-210. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602000000300009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602000000300009&lng=es)
20. Blanco M, Rolo F, Martínez N, Gessa A, Díaz H, Lubián A. Aplicación del ensayo de movilidad del heterodúplex en los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba. *Biotec. Aplic.*, 2001; 18 (3): 149-153.
21. Victoria B, Fernández C, Rodríguez J., Obregón A, Rodríguez I. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2002 Abr; 54(1): 48-51. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602002000100011&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000100011&lng=es) .
22. Muñío J, Díaz H, Carnot J, de Castro R, Navea L, Rodríguez I. Leucemia / linfoma T del adulto. Primer caso en Cuba. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2003 May-Jun; 42(3). [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol42\\_3\\_03/med10303.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol42_3_03/med10303.htm)
23. Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of Influenza A, B and C Viruses, respiratory syncytial virus and adenoviruses in clinical

- samples by multiplex reverse transcription Nested-PCR assay. *J Med Virol*. 2003; 69:32-44.
24. Climent Y, Martínez I, Núñez N, Ginebra M, Zamora L, Gutiérrez M, *et al*. Detección e identificación por PCR de microorganismos causantes de meningoencefalitis bacteriana. *Vaccimonitor* [revista en la Internet]. 2002 Abr-Jun; 11(2). [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: <http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaccimonitor/vm2002/a5.pdf>.
25. Kouri V, Liang X, Rodríguez ME, Capó V, Resik S, Barrios J. *et al*. Molecular epidemiology and KSHV K1 subtypes in a Cuban AIDS-Kaposi's sarcoma population. *AIDS*. 2005, 19(9):984-987.
26. Kouri V, Marini A, Doroudi R, Nambiar S. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) in Cuban and German patients with Kaposi's sarcoma (KS) and asymptomatic sexual. *Virology*. 2005; 337(2):297-303.
27. Montalvo A, Fraga J, Aylema j, Monzote I, Montano I, Dujardin J. PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2006 Dic; 58(3). [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602006000300009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000300009&lng=es) .
28. Savón C, Valdés O, Acosta B, González G, Piñón A, González G. *et al*. Infección por rinovirus en niños hospitalizados menores de un año. Cuba 2006. *Rev Biomed* [revista en la Internet]. 2008 May-Ago; 19(2):122-123. [Citado 2013 Nov 21]. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081927.pdf>
29. De Armas Rodríguez Y, Capó de Paz V, López X. Detección molecular de *Pneumocystis jiroveci* en tejido parafinado de fallecidos por VIH/sida. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2008 Dic; 60(3). [Citado 2013 Dic 06]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602008000300009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000300009&lng=es) .
30. Bello M, Montalvo MC, Rodríguez LA, Valdés L, Sariego S, Pedroso Flaquet P. *et al*. Hepatitis C en pacientes VIH positivos. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2008 Dic; 60(3). [Citado 2013 Dic 06]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602008000300012&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000300012&lng=es) .
31. Martínez P, Muné M, Soto Y, Ramírez R, Correa C, Alfonso M. *et al*. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2009 Ago; 61(2). [Citado 2013 Dic 06]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602009000200003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000200003&lng=es) .
32. Monzote L, Ordeñana R, Fraga J, Montalvo A., Montano I. Identificación de especies de *Leishmania* por la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2009 Ago; 61(2). [Citado 2013 Dic 06]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602009000200013&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000200013&lng=es) .
33. Piñón A, Acosta B, Valdés O, Arencibia A, Savón C, González G. *et al* . Estrategia cubana de caracterización molecular del virus influenza A/H1N1pdm. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2011 Abr; 63(1): 21-29. [Citado 2013 Nov

21]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602011000100004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000100004&lng=es)

34. Valdés O, Piñón A, Acosta B, Savón C, González G, Arencibia A. *et al.* . Diseño y aplicación de un método molecular para el diagnóstico del virus influenza A (H1N1) pandémico en Cuba. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2011 Abr; 63(1): 15-20. [Citado 2013 Nov 21] Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602011000100003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000100003&lng=es)

35. Salazar D, Reyes T, Rodríguez F, Bandera F, Reyes A, Medina V. *et al.* *Rhodococcus equi* en paciente VIH/sida: primera detección molecular en Cuba. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2011 Dic; 63(3): 253-256. [Citado 2013 Dic 06]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602011000300009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000300009&lng=es) .

37. Regalado B, Rodríguez M, Fraga J, Rojas L, Núñez F Ángel, Jerez L. Aplicación de herramientas serológicas y moleculares para el diagnóstico de coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2013 Abr; 65(1): 13-25. [Citado 2013 Dic 06]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602013000100003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000100003&lng=es) .

38. Rodríguez Y, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez J, Valdés Y, Echevarría E. *et al.* Detección de ADN de leptospiras en tejidos frescos de fallecidos en Cuba, 2008-2011. *Rev Cub. Med Trop* [revista en la Internet]. 2013 Jun; 65(2): 211-222. [Citado 2013 Dic 06]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602013000200008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000200008&lng=es)

39. Monroy E, de Armas Y, Illnait M, Toraño G, Díaz R, Vega D. *et al.* Prevalence and Genotype Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban Infants and Toddlers with Whooping Cough. *J. Clin. Microbiol.* [revista en la Internet]. 2014 Ene; 52(1): 45-51. [Citado 2014 Feb 26] Disponible en: doi: 10.1128/JCM.02381-13

Recibido: 9 de Abril de 2014

Aprobado: 26 de Noviembre de 2014