



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones

Científicas

Cuba

Corrales, Fidel; López-Cánovas, Lilia
Las Infecciones Nosocomiales en Cuba y su Control mediante las Técnicas Moleculares
de Tipificación de Microorganismos
Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 47, núm. 1, enero-mayo, 2016, pp. 27-32
Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181244353004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

RESEÑA

Las Infecciones Nosocomiales en Cuba y su Control mediante las Técnicas Moleculares de Tipificación de Microorganismos

Fidel Corrales, Lilia López-Cánovas*.

Departamento de Diagnóstico Molecular. Centro de Neurociencias de Cuba. La Habana, Cuba. *Postgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D.F., México. llopezcanovas@yahoo.com

Recibido: 8 de diciembre de 2015.

Aceptado: 25 de febrero de 2016.

INTRODUCCIÓN

La infección nosocomial (IN), intrahospitalaria o asociada a cuidados médicos, es aquella para la que no hay evidencia de que estaba presente, o siendo incubada, al momento de la admisión del paciente.¹ La IN suele representar la principal complicación de los pacientes admitidos a ingreso en cualquier hospital y es una causa principal de morbilidad y mortalidad a nivel global.² Su ocurrencia conlleva un sufrimiento adicional y una carga psicológica para los pacientes, así como enormes costos en términos financieros, para los pacientes o para el sistema de salud pública. La IN suele estar íntimamente ligada a la conducta del personal sanitario (prácticas no-óptimas del lavado de manos o de esterilización del instrumental) o, en algunos casos, a deficiencias del sistema de salud (falta de equipamiento adecuado). Por tal razón, las ocurrencias de las INs perjudican la confianza del paciente en el sistema sanitario y en los profesionales de la salud y aumenta la carga económica que representan los servicios médicos gratuitos.² El presente comentario aborda el impacto de las INs a niveles global y nacional, así como la utilidad de las técnicas moleculares de tipificación de patógenos bacterianos y su grado de utilización en Cuba para la investigación de brotes de INs.

Impacto global de las INs

Un estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la carga endémica de las INs a nivel global refleja no sólo la magnitud de las afectaciones que provocan, sino también el enorme contraste entre la situación de los países desarrollados y no desarrollados.² De acuerdo con dicho documento, en 2008 el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades estimó que en Europa, las INs causan, anualmente, 16 millones de días extras de estancia hospitalaria y 37 000 muertes atribuibles, mientras que contribuyen con otras 110 000. La propia institución europea, estimó que las INs causan pérdidas anuales por siete billones de euros.

La OMS ha constatado que, mientras en la mayoría de los países desarrollados hay establecidos sistemas nacionales y/o regionales para la vigilancia de las INs, apenas el 15 % de los países subdesarrollados (de medianos y bajos ingresos) cuenta con un sistema de vigilancia funcional, por lo que no existen datos suficientes para estimar la carga de la IN endémica a nivel nacional en este grupo de países. Sin embargo, estudios realizados en hospitales, han permitido inferir que en países subdesarrollados: (i) el 15 % de los pacientes hospitalizados en cualquier momento dado de tiempo podría adquirir una IN, (7 % en países desarrollados), (ii) es mayor el riesgo de padecer una IN para pacientes admitidos en las unidades de cuidados intensivos (frecuencia global de infección de 42,7 episodios por 1000 pacientes-días vs. 17 por 1000 pacientes-días en países industrializados) y (iii) los neonatos presentan mayor riesgo de adquirir una IN con tasas de infección de tres a 20 veces más altas que en países desarrollados.^{2,3}

Impacto de las INs en Cuba

En Cuba las INs también representan un problema de salud, por lo que las autoridades sanitarias han instituido un sistema nacional para su prevención y control.⁴ Dicho sistema cuenta con un programa que establece la realización de una vigilancia activa y continua de estas infecciones en los principales hospitales del país.⁵ Un estudio nacional, realizado en 2004, encontró una prevalencia de IN de 7,3 %.⁶ Más recientemente, un estudio en hospitales universitarios de La Habana reportaba una tasa global de infección nosocomial de 9,21 %.⁷ Según datos de la Dirección Nacional de Estadísticas del Ministerio de Salud Pública, en Cuba los servicios hospitalarios con mayor incidencia de INs entre 2001 y 2007 fueron las unidades de cuidados intensivos (UCIs) de adultos, pediátricas y

neonatólogas (tasas de pacientes con infección que oscilaban de 5,5 a 12,1 %; de 3,7 a 6,8 % y de 8,3 a 9,9 %, respectivamente).⁵ El propio reporte reveló el predominio de las infecciones del sitio quirúrgico, seguidas de las del tracto respiratorio bajo, como localizaciones más frecuentes, mientras que especies de los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Acinetobacter* representaron (en promedio y en ese orden de importancia) más del 50 % de los aislados causantes de las INs en el período estudiado. Finalmente, un estudio multicéntrico que evaluó la incidencia de las INs en UCIs de seis hospitales de diferentes provincias cubanas, determinó que un 16,1 % de los pacientes admitidos a las UCI participantes adquirió al menos una IN.⁸ Los datos anteriores reafirman el impacto significativo que tienen las INs en el ámbito hospitalario cubano.

Las técnicas de tipificación, el laboratorio de microbiología y el control de las INs

En microbiología, el término tipificación se emplea para caracterizar un aislado microbiano de forma que se pueda diferenciar del resto de los aislados de su misma especie.⁹ Establecer la diferencia -o la identidad- existente entre cepas de una misma especie aisladas independientemente puede ser de gran interés y utilidad para el epidemiólogo de un hospital, especialmente para el estudio de brotes infecciosos nosocomiales. Para detectar las diferencias entre aislados, los microbiólogos clínicos utilizan dos grandes grupos de técnicas: las fenotípicas (basadas en el fenotipo) y las genotípicas o moleculares (basadas en los polimorfismos del ADN). Cada una de ellas tiene sus propias ventajas y desventajas.¹⁰ Sin embargo, las técnicas moleculares de tipificación (TMT) son preferibles a las fenotípicas, porque poseen mayor reproducibilidad, poder de tipificación, versatilidad y poder de discriminación.^{11,12} Sea por técnicas fenotípicas o genotípicas, tipificar implica clasificar los microorganismos en tipos (o subtipos), atendiendo a las características determinadas. Esta categorización permite su diferenciación por debajo del nivel de especie, posibilitando su empleo como herramienta útil para el estudio de las relaciones epidemiológicas entre patógenos nosocomiales de una misma especie. En este sentido, aquellos aislados que poseen tipos o subtipos indistinguibles entre sí, se suponen provenientes de un ancestro común reciente en el tiempo y, por ende, epidemiológicamente relacionados. Por el contrario, encontrar una amplia diversidad de tipos, es indicativo de que no existe relación epidemiológica entre los patógenos nosocomiales aislados y esto apunta a que los tipos bacterianos circulantes no son parte de un brote infeccioso.

El laboratorio de microbiología puede contribuir de diferentes maneras con los programas institucionales para la prevención y control de las infecciones nosocomiales,¹ especialmente en el análisis comparativo de diferentes aislados de una misma especie mediante las TMT. La aplicación de estas técnicas al estudio y control de las INs ha permitido: (i) conocer la relación existente entre aislados colonizadores y patógenos en un mismo paciente,¹³ (ii) diferenciar cepas contaminantes de las que causan la infección,¹⁴ (iii) demostrar o refutar la ocurrencia de infección cruzada entre pacientes hospitalizados,¹⁵⁻¹⁷ (iv) establecer el diagnóstico diferencial entre recaída o reinfección en pacientes previamente tratados con agentes antimicrobianos,¹⁸ (v) detectar tempranamente la ocurrencia de un brote de IN,¹⁹ (vi) revelar la ocurrencia de transmisión horizontal de patógenos nosocomiales y contribuir a establecer la fuente común probable de la infección,²⁰ y (vii) vigilar la diseminación de cepas resistentes a antimicrobianos en un mismo hospital y entre hospitales diferentes a lo largo del tiempo.^{21,22}

Las respuestas aportadas por las TMT, contribuyen a tomar medidas más racionales (basadas en evidencias moleculares) para lograr un control eficiente y eficaz de las INs. En este sentido, si en un conjunto de *Staphylococcus aureus* aislados del sitio quirúrgico de pacientes hospitalizados en diferentes salas, se encuentra un único fenotipo (un mismo perfil bioquímico e igual perfil de resistencia/sensibilidad a antimicrobianos), esto indica infección cruzada entre pacientes, en cuyo caso podría sospecharse la ocurrencia de un brote epidémico. La investigación del brote conllevaría un estudio costoso de múltiples muestras tomadas del ambiente, del personal asistencial en contacto con los pacientes, etc. Sin embargo, si antes de realizar tal estudio, se determina que los tipos moleculares encontrados son diversos, se puede descartar la hipótesis de un brote infeccioso, evitar los gastos innecesarios que conlleva su investigación y tomar las medidas adecuadas para este tipo de situación. Por otra parte, confirmar molecularmente la relación epidemiológica inferida de los resultados fenotípicos, contribuye a una toma de decisión mejor fundamentada.

El uso de las técnicas de tipificación molecular para el estudio de las infecciones nosocomiales en Cuba

En la actualidad las TMT se usan ampliamente como complemento de las investigaciones epidemiológicas convencionales para el estudio de las infecciones nosocomiales de etiología bacteriana.^{19,23-25} Sin embargo, una búsqueda en la biblioteca electrónica *Scielo Cuba*, que contiene una colección seleccionada de revistas científicas cubanas, revela la ausencia de esta temática en las principales publicaciones dedicadas a las ciencias de la salud. Por ejemplo, una consulta a dicha biblioteca, permitió recuperar 26 reportes que contienen el término: “infección nosocomial” o “infecciones nosocomiales”. Sin embargo, al refinar la búsqueda incluyendo los términos: “tipificación molecular” o “caracterización molecular” no se recupera referencia alguna (consulta del 14/10/2015: <http://scielo.sld.cu>). Lo anterior demuestra una aplicación escasa (si no nula) de las TMT en estudios publicados en revistas científicas nacionales del campo de las ciencias de la salud.

Una búsqueda en la base de datos Pubmed del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos de Norteamérica (NCBI, siglas en inglés) usando el criterio: ((molecular typing) AND cuba) NOT virus)

NOT fungi, (consulta del 12/10/2015 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) produjo 14 referencias. De ellas, sólo en siete se aplicaron las TMT a la caracterización de bacterias.²⁶⁻³² Sustituyendo el término: *molecular typing* por su sinónimo: *DNA fingerprinting*, se pueden recuperar otras tres referencias de este tipo.³³⁻³⁵ Las diez referencias recuperadas se publicaron entre 1998 y 2015. Dos de ellas hacen aportes al desarrollo de aspectos técnicos de las TMT,^{29,35} otra es un estudio filogenético cuyo autor principal no es un cubano,³² y el resto (siete) está relacionado con la aplicación de las TMT al estudio de la epidemiología (molecular) de: *Mycobacterium tuberculosis*,^{26,30,31,33} *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina,²⁷ *Enterococcus faecalis*,²⁸ y *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC-2.³⁴ De estos trabajos, sólo tres realizan aportes al estudio de brotes infecciosos nosocomiales,^{30,31,33} mientras el resto está dedicado a analizar otros aspectos relacionados con la epidemiología de las infecciones nosocomiales como: la identificación prospectiva de clones o genotipos de interés nosocomial que circulan en territorio cubano^{27,28,34} o el esclarecimiento de cadenas de transmisión de infecciones al interior y al exterior de instituciones cerradas no hospitalarias.²⁶ Las TMT empleadas en estos trabajos comprenden la tipificación mediante: la determinación del número variable de tándems de repetidos (usando como marcador las unidades repetitivas intercaladas de *M. tuberculosis*, MIRU-VNTR),²⁶ los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción usando sondas IS6110 (RFLP-IS6110),^{30,31,33} la secuenciación de múltiples *loci* (MLST),^{28,34} la reacción en cadena de la polimerasa (PCR),^{28,34} la amplificación de fragmentos polimórficos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR-based DNA fingerprinting*),³⁴ los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción usando sondas IS6110 (IS6110 probed RFLP)^{26,30,31,33} y la secuenciación del gen de la proteína A de *S. aureus* (*spa typing*).²⁷

Es notable en la composición de la bibliografía recuperada que cuatro (57 %) de estos siete trabajos son estudios epidemiológicos sobre tuberculosis, cuya incidencia es relativamente baja en nuestro país;³⁶ pero no aparecieron reportes relativos al uso de las TMT en estudios de la epidemiología de infecciones causadas por otros patógenos nosocomiales como *Pseudomonas spp.* y *Acinetobacter spp.*, que son microorganismos priorizados por el “Programa Nacional de Prevención y Control de las IIH” (Infecciones Intra-Hospitalarias o INs).⁴ También destaca que, de los siete estudios referidos, seis (85 %) fueron financiados, total o parcialmente, por instituciones extranjeras,^{26,28,30,34} o recibieron donativos foráneos de reactivos indispensables para realizar la TMT ensayada,³¹ o realizaron las TMT en instituciones fuera de Cuba,²⁷ lo cual evidencia que la aplicación de las TMT al estudio de la epidemiología de las infecciones nosocomiales en Cuba podría estar condicionado a (o limitado por) la disponibilidad de cooperación internacional. Una causa posible para esta dependencia, podría ser que Cuba es un país subdesarrollado (de bajos ingresos) cuyo sistema de salud prioriza la prevención de la enfermedad y la atención primaria antes que las tecnologías y los suministros médicos.³⁷

El uso limitado de las técnicas moleculares como complemento de las investigaciones epidemiológicas convencionales en las instituciones hospitalarias cubanas contrasta, sin embargo, con el amplio desarrollo alcanzado por Cuba en el campo de la biotecnología, donde las técnicas como la PCR son frecuentemente utilizadas con otros fines. La PCR es una técnica relativamente sencilla y económica⁹ que ha demostrado una gran utilidad en estudios de epidemiología molecular, permitiendo esclarecer cuestiones relevantes para el control de la infección nosocomial.^{38,39} Recientemente se han reportado los resultados de la validación de la serie cero de un termociclador cubano para realizar técnicas de PCR.⁴⁰ Por otra parte, en Cuba se han desarrollado equipos para realizar Electroforesis de Campos Pulsantes (ECP).⁴¹ Esta técnica permite tipificar molecularmente bacterias, hongos y parásitos unicelulares y se basa en el análisis de los polimorfismos de los fragmentos del ADN cromosómico digerido con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte.⁹ Paradójicamente, esta tecnología cubana no ha sido aplicada a la investigación de la epidemiología de patógenos nosocomiales, como revela la ausencia de publicaciones sobre este tema en bases de datos como Pubmed, aunque sí se han reportado los protocolos correspondientes para la caracterización de aislados clínicos de patógenos nosocomiales y otros que se adquieren, fundamentalmente en la comunidad, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* y *Streptococcus pyogenes* usando esta tecnología.^{29,35,42-44}

CONCLUSIONES

A juicio de los autores, el uso de las TMT como herramienta auxiliar para el control de las INs es limitado en el sistema de salud cubano. A pesar de que Cuba es un país de escasos recursos, algunas tecnologías producidas o desarrolladas en Cuba (o ambas) no son suficientemente explotadas, como indica la ausencia de reportes relativos a la aplicación del sistema cubano de electroforesis de campo pulsante al estudio de las infecciones nosocomiales. Lo anterior subraya la necesidad de fomentar mecanismos de integración para la colaboración entre las instituciones que investigan y desarrollan en el área tecnológica y los principales centros hospitalarios del país. Por otra parte, la introducción del termociclador TEMPER (TecnoSuma Internacional, La Habana, Cuba), en los hospitales cubanos podría potenciar el uso de la PCR como herramienta molecular para el estudio de la epidemiología de las infecciones nosocomiales. Ambas tecnologías, disponibles en Cuba, constituyen herramientas eficaces que pueden contribuir a mejorar los índices de calidad de nuestros servicios de salud; especialmente los relacionados con la morbi-mortalidad asociada a las INs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993 Oct;6(4):428-42.
2. World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. World Health Organization; 2011.
3. Zaidi AK, Huskins WC, Thaver D, Bhutta ZA, Abbas Z, Goldmann DA. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*; Mar 2005 26;365(9465):1175-88.
4. Izquierdo-Cubas F, Zambrano A, Frometa I. Sistema de vigilancia de las infecciones intrahospitalarias e Cuba. *Rev cubana Hig Epidemiol*; 2008;46(1).
5. Izquierdo-Cubas F, Zambrano A, Frómeta I, Báster M, Durañones L, Santín M. Resultados de la vigilancia de infecciones nosocomiales en Cuba. 2001-2007. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 2009;47(3):1-18.
6. Izquierdo-Cubas F, Zambrano A, Frometa I, Gutiérrez A, Bastanzuri M, Guanche H, *et al.* National prevalence of nosocomial infections. Cuba 2004. *J Hosp Infect*; 2008 Mar;68(3):234-40.
7. Guanche H, Núñez L, Baxter M, Tolón M, Morales C, Fresneda G, *et al.* Prevalencia de infección nosocomial en hospitales universitarios de La Habana, Cuba. *Anales de Medicina Interna*. 2006;23(6):269-71.
8. Abdo A, Castellanos R, González JC, Vázquez Y, Somoza ME, Casas J, *et al.* Incidencia de infección relacionada con el cuidado sanitario en unidades de cuidados intensivos en Cuba. *Invest Medicoquir*. 2013;5(1):4-24.
9. Dijkshoorn L, Towner KJ and Struelens M, Eds. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. 1st ed. ed. Amsterdam: New York: Elsevier: 2001:p.1-30 Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*. 1993;Aug;17(2):153-62.
10. Farber JM. An Introduction to the Hows and Whys of Molecular Typing. *Journal of Food Protection*. 1996. Oct 1;59(10):1091-101.
11. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999 Jun;37(6):1661-9.
12. Swaminathan B, Matar GM. Molecular typing methods: definitions, applications, and advantages. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principals and Applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1993. p. 26-50.
13. Grundmann H, Kropec A, Hartung D, Berner R, Daschner F. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: reservoirs and ecology of the nosocomial pathogen. *J Infect Dis* 1993 Oct;168(4):943-7.
14. Sader HS, Pignatari AC, Leme IL, Burattini MN, Tancredi R, Hollis RJ, *et al.* Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993 Jul;17(1):13-8.
15. Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Brahimi N, el LM, Elion J. Rapid genotyping shows the absence of cross-contamination in *Enterobacter cloacae* nosocomial infections. *J Hosp Infect* 1992 Jun;21(2):95-101.
16. Bingen EH, Weber M, Derelle J, Brahimi N, Lambert-Zechovsky NY, Vidailhet M, *et al.* Arbitrarily primed polymerase chain reaction as a rapid method to differentiate crossed from independent *Pseudomonas cepacia* infections in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1993 Oct;31(10):2589-93.
17. Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ, Wenzel RP, Fritschel SJ, Neubauer JJ, *et al.* Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1996 May;25(1):1-8.
18. Singh G, Biswal M, Hallur V, Rao KL, Ray P, Gautam V, *et al.* Utility of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for the rapid detection of nosocomial outbreaks of multidrug resistant organisms: experience at a tertiary care center in North India. *Indian J Med Microbiol*. 2015 Apr;33(2):221-4.
19. Bodnar UR, Noskin GA, Suriano T, Cooper I, Reisberg BE, Peterson LR. Use of in-house studies of molecular epidemiology and full species identification for controlling spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 1996 Sep;34(9):2129-32.
20. Royer S, Faria AL, Seki LM, Chagas TP, Campos PA, Batistão DW, *et al.* Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2015 Jul;19(4):350-7.

21. Royer S, Faria AL, Seki LM, Chagas TP, Campos PA, Batistão DW, *et al.* Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015 Oct 1;70(10):2718-24.
22. Chang LW, Buising KL, Jeremiah CJ, Cronin K, Poy Lorenzo YS, Howden BP. Managing a nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: an early Australian hospital experience. *Intern Med J* 2015 Oct;45(10):1037-43.
23. Ushizawa H, Yahata Y, Endo T, Iwashima T, Misawa M, Sonobe M, *et al.* An Epidemiological Investigation of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Critical Care Center in Japan, 2011-2012. *Jpn J Infect Dis* 2015 Jun 12.
24. Ali H, Nash JQ, Kearns AM, Pichon B, Vasu V, Nixon Z, *et al.* Outbreak of a South West Pacific clone Panton-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a UK neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2012 Apr;80(4):293-8.
25. Gonzalez DA, Battaglioli T, Díaz RR, Goza VR, González OE, Van der Stuyft P. Molecular Epidemiology of tuberculosis in Havana, Cuba, 2009. *Trop Med Int Health* 2015 Nov;20(11):1534-42.
26. Hopman J, Peraza GT, Espinosa F, Klaassen CH, Velázquez DM, Meis JF, *et al.* USA300 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cuba. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012;1(1):2.
27. Quinones D, Kobayashi N, Nagashima S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. *Microb Drug Resist*. 2009. Dec;15(4):287-93.
28. Lopez-Canovas L, Bravo L, Herrera J, Riveron AM, Javer E, Sanchez A, *et al.* DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis. *Electrophoresis* 2006 Jul;27(14):2857-64.
29. Díaz R, Kremer K, de Haas PE, Gómez 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 Sep;2(9):743-50.
30. Díaz R, Gómez R, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court, 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 May;96(4):437-43.
31. 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 Mar;4(1):5-14.
32. Díaz R, Gómez RI, García N, Valdivia JA, van SD. Molecular epidemiological study on transmission of tuberculosis in a hospital for mentally handicapped patients in Havana, Cuba. *J Hosp Infect* 2001 Sep;49(1):30-6.
33. Quinones D, Hart M, Espinosa F, García S, Carmona Y, Ghosh S, *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing KPC-2 carbapenemase in Cuba. *New Microbes New Infect* 2014 Jul;2(4):123-6.
34. López Y, Manrique V, Niubo E, Valdes-Dapena M, Perez AJ, Lopez I, *et al.* Cost-effective procedure for *Streptococcus pyogenes* immobilized DNA preparation and miniPFGE subtyping. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(7):710-9.
35. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. 2014.
36. Drain PK, Barry M. Global Health. Fifty years of U.S. embargo: Cuba's health outcomes and lessons. *Science*. 2010;328:272-3.
37. Doleans-Jordheim A, Cournoyer B, Bergeron E, Croize J, Salord H, Andre J, *et al.* Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009 Sep;28(9):1105-11.
38. Prashanth K, Badrinath S. Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. *Indian J Med Res*. 2005 Nov;122(5):408-18.
39. Gentile J, Ferreira A, Alfonso J, Rodríguez A, Méndez J, Mora MN, *et al.* Validación de la serie cero de termociclador TEMPER para su aplicación en laboratorios de diagnóstico molecular. 2011 May 16; Springer; 2013 p. 698-701.
40. Riveron AM, Lopez-Canovas L, Arencibia O, Herrera JA, Perez G, Orozco E, *et al.*, inventors; Pulsed Field Gel Electrophoresis chambers, accessories and methods of use for the separation of DNA molecules. Cuba patent WO 01/94932. 2002.
41. Lopez-Canovas L, Sanchez-Alonso A, Higginson D, Ariosa C, Clark H, Riveron AM. Nonenzymatic protocol for *Pseudomonas aeruginosa* DNA preparation and rapid subtyping by mini pulsed-field gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2003 Apr;24(7-8):1152-8.
42. Lopez-Canovas L, Riveron AM, Garrido Y, Corrales F, Aguila A, Cardenas Y. Adapting to contour-clamped homogeneous electric field minichamber technology the PulseNet protocols to resolve *XbaI*-DNA fragments of *Salmonella* serotype Braenderup. *Anal Biochem*. 2009 May 15;388(2):339-41.

43. Clark HT, Sánchez A, Ariosa MC, Rodríguez E, Pérez MC, López-Cánovas L, *et al.* Electroforesis de campos pulsantes para la diferenciación genotípica de dos aislados de *Escherichia Coli* fenotípicamente indistinguibles. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2002;33(2).