

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
EN POBLACIÓN INMIGRANTE EN ESPAÑA**

Fernando González-Candelas (1,2), María Alma Bracho (1,2), Iñaki Comas (1,2), Giuseppe d'Auria (1,2), Mária Džunková (1,2), Rodrigo García (1,2), María José Gosalbes (1,2), Sandrine Isaac (1,2), Amparo Latorre (1,2), Fco. Xavier López-Labrador (1,2), Juan Angel Patiño Galindo (1,2), Ferran Palero (1,2), Vicente Pérez-Brocal (1,2), Ana Elena Pérez-Cobas (1,2), Leonor Sánchez-Busó (1,2), Francisco J. Silva (1,2), Jorge F. Vázquez-Castellanos (1,2) y Andrés Moya (1,2).

(1) Unidad Mixta “Genómica y Salud” FISABIO-Salud Pública/Universitat de València. España.

(2) CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). España

RESUMEN

Fundamentos: La epidemiología molecular es una nueva disciplina que permite la integración de la información sobre la variabilidad genética de patógenos infecciosos con su difusión en la población y subgrupos de la misma incluyendo, por ejemplo, las mutaciones de resistencia a antibióticos y antivirales. El objetivo es conocer qué posibles diferencias existe en las características genéticas de los agentes infecciosos que afectan a las poblaciones inmigrante y autóctona en España.

Métodos: Se revisaron artículos originales publicados entre 1998-2013, con las palabras clave “epidemiología molecular”, “tipo molecular”, “secuenciación”, “inmigrante”, “España”.

Resultados: De un total de 267 artículos identificados inicialmente, 50 pasaron los diferentes filtros establecidos. De ellos, 36 analizan las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* y VIH, seguidos de los que analizan infecciones por *Staphylococcus aureus* (3) y el Virus de la Hepatitis B (3).

Conclusiones: Los objetivos principales de estos trabajos fueron el tipado del patógeno y la determinación de la frecuencia de mutaciones de resistencia. Los estudios más frecuentes correspondieron a cohortes retrospectivas, seguidos por los estudios ecológicos y los ensayos clínicos. En general los estudios son descriptivos y su ámbito por el tipo y tamaño de muestra es bastante restringido. En varios se determina que las cepas o variantes del patógeno encontradas en inmigrantes tienen su origen más probable en sus países de origen, si bien otros también ponen de manifiesto la transmisión desde la población autóctona a la inmigrante.

Palabras clave: Epidemiología molecular. Inmigrantes. Tuberculosis. VIH. Hepatitis. Resistencia a antibióticos.

Correspondencia

Fernando González Candelas
Unidad Mixta Genómica y Salud,
FISABIO-Salud Pública/Universitat de València
Avda. Cataluña, 21
46020 Valencia
fernando.gonzalez@uv.es

ABSTRACT**Molecular Epidemiology Studies on the
Immigrant Population in Spain**

Background: Molecular epidemiology is a new scientific discipline which allows to integrate information on the genetic variation of infectious pathogens with their diffusion in a population and its subgroups including, for instance, resistance mutations to antibiotics and antiretrovirals. We present the results of an analysis of scientific publications that analyze the health status of the immigrant population in Spain from a molecular epidemiology perspective.

Methods: We reviewed original articles published in 1998-2014 with the keywords “molecular epidemiology”, “molecular typing”, “sequencing”, “immigrant”, and “Spain”.

Results: From a total of 267 articles identified initially, only 50 passed through the established filters. Most of them (36) analyzed infections by *Mycobacterium tuberculosis* (3) and HIV (3), followed at a large distance by *Staphylococcus aureus* and hepatitis B virus. The main goal of these works was the typing of the pathogen and to determine the frequency of resistance mutations.

Conclusion: Is difficult to generalize the conclusions from the analyzed articles because most of them have a purely descriptive and quite restricted scope, considering the type and size of the samples studied. Several studies are focused on the most likely origin for the strains or variants of the pathogen but others also reveal transmissions from the local to the immigrant populations.

Keyword: Molecular epidemiology. Immigrants. Tuberculosis. HIV. Hepatitis. Antibiotic resistance.

INTRODUCCIÓN

Entendemos por epidemiología molecular los estudios que analizan la diversidad genética de los organismos infecciosos mediante la aplicación de distintas técnicas de laboratorio con objetivos como determinar su naturaleza, establecer su origen más probable, caracterizar una epidemia, conocer las posibles mutaciones relacionadas con patogenicidad, resistencia a los fármacos anti-infecciosos o su persistencia en un ambiente que justifiquen su expansión. En general, se trata de establecer vínculos entre la variabilidad genética del patógeno y su dispersión en la población de hospedadores.

Como muchas otras áreas de la biomedicina, la epidemiología molecular no ha sido ajena a los avances técnicos y metodológicos producidos en las últimas décadas. En concreto, tras la aplicación de las primeras técnicas de tipado molecular mediante caracterización serológica o marcadores enzimáticos, se pasó a técnicas moleculares como polimorfismos de restricción (RFLPs)¹⁻³, repeticiones en tándem (MIRU-VNTR)⁴ o *spoligotyping*^{5,6} en *Enterobacteriaceae*, *Chlamydia trachomatis* o *Mycobacterium tuberculosis*. No obstante, dependiendo del patógeno y de los objetivos iniciales del estudio molecular, todavía se encuentran trabajos basados en estas aproximaciones. La facilidad para la obtención de secuencias génicas, incluso genómicas, ha permitido que la epidemiología molecular basada en el conocimiento de estas secuencias sea la metodología más extendida, bien de forma directa, especialmente para el estudio de virus⁷⁻¹⁰, o bien tras su codificación en variantes discretas, como en los sistemas de tipado multilocus (MLST) adoptados en muchas bacterias.

El objetivo es analizar las variantes genéticas de los patógenos infecciosos aislados en la población inmigrante en España.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se analizaron los estudios sobre epidemiología molecular en los que se incluyó población inmigrante en España como una de las clases o grupos de estudio, excluyendo los trabajos de epidemiología genética en los que se analizó la relación entre marcadores genéticos o genómicos de los sujetos y la patología o condición estudiadas.

Se realizó una revisión bibliográfica para sintetizar el conocimiento científico e identificar lagunas en la investigación¹¹. Esta revisión se llevó a cabo en el marco del Subprograma de Inmigración y Salud del CIBERESP.

Se consultaron las bases de datos de MEDLINE a través de PubMed y MEDES-MEDICINA en español debido a su mayor visibilidad en el área sanitaria a nivel internacional y nacional, respectivamente. Se seleccionaron todos los artículos publicados entre enero 1998 y diciembre 2012. La decisión de limitar la búsqueda al período establecido se basó en la intención de explorar toda la producción científica generada sobre este tema desde el inicio del incremento progresivo de la llegada de población inmigrante en España. En cuanto al idioma, se seleccionaron las publicaciones escritas en español inglés.

En la base de datos con descriptores o vocabulario controlado (tesauros) como MEDLINE, los Medical Subject Headings [MeSH], palabras clave y subheadings fueron usados para ayudar a describir aspectos importantes del campo analizado. En la base de datos MEDES-MEDICINA en español, que no cuenta con tesauros, se utilizó únicamente las siguientes palabras clave: “Migración”, “Migrantes”, “Migrante”, “Inmigración”, “Inmigrantes”, “Inmigrante”. Para la ecuación de búsqueda en MEDLINE, se desarrollaron 3 filtros temáticos: a) Filtro sobre Epidemiología mole-

cular: “Molecular Epidemiology”, “Molecular Sequence Data”, “Molecular Evolution”, “Host-Pathogen Interactions”, “Phylogeny”, “Phylogeography”, “Antiviral Agents”, “Genomics”, “Metagenomics”, “Computational Biology”, “Drug Resistance”, “Drug Resistance Viral”, “HIV”, “Tuberculosis”, “Hepacivirus”; b) Filtro inmigración: “Emigrants and Immigrants”, “Emigration and Immigration”, “Transients and Migrants” y “Ethnic Groups”; c) Filtro país: se utilizó el desarrollado por Valderas y colaboradores¹². Los operadores booleanos “AND”, “OR”, fueron utilizados para recuperar toda la literatura existente.

Para la selección de los artículos se establecieron como criterios de inclusión que fueran estudios originales con información sobre epidemiología molecular de algún organismo infeccioso y comparasen su distribución y/o efectos sobre la salud de la población inmigrante procedente de América Latina, África, Asia o de Europa del Este y en sujetos que desarrollaron síntomas en España. Además, se incluyeron estudios que aunque no especificaran la nacionalidad de los inmigrantes sí incluían categorías de inmigrantes, extranjeros o similares respondan a la definición de inmigrante otorgada por la Organización Internacional de Migraciones (OIM)¹³. Se excluyeron los estudios realizados en población inmigrante proveniente de países diferentes a los señalados anteriormente y otros tipos de publicaciones, como revisiones teóricas o sistemáticas, comunicaciones a congresos, entre otros (figura 1).

Para la recogida de información se elaboró un protocolo *ad hoc* de recogida de información para estudios cuantitativos y cualitativos en el que se incluyeron las siguientes variables: a) Características generales de los estudios: autores, título, año de publicación y revista científica. b) Aspectos metodológicos según apartados del estudio: objeto principal del estudio, materiales y métodos - tipo de diseño epidemiológico, direccionali-

dad del diseño-, población y muestreo -periodo de desarrollo del estudio, tamaño de la muestra, tipo de población, rango de edad, país o grupos de países de procedencia, procedencia de la población inmigrante, tipo de datos utilizados-, variables del estudio -variable que define la población inmigrante, situación legal de la población inmigrante, entre otros-, Resultados -los relacionados a variables sociodemográficos, entre otros-, Discusión -limitaciones, generalización de los resultados, conclusiones y recomendaciones-, y Financiación -naturaleza de la institución-. Para los estudios cualitativos se utilizó la adaptación del protocolo según sus aspectos metodológicos. Posteriormente se digitalizó el cuestionario a través de la herramienta GoogleDrive. La consulta de ambos registros digitalizadas se puede realizar en <http://goo.gl/PU2fvs>.

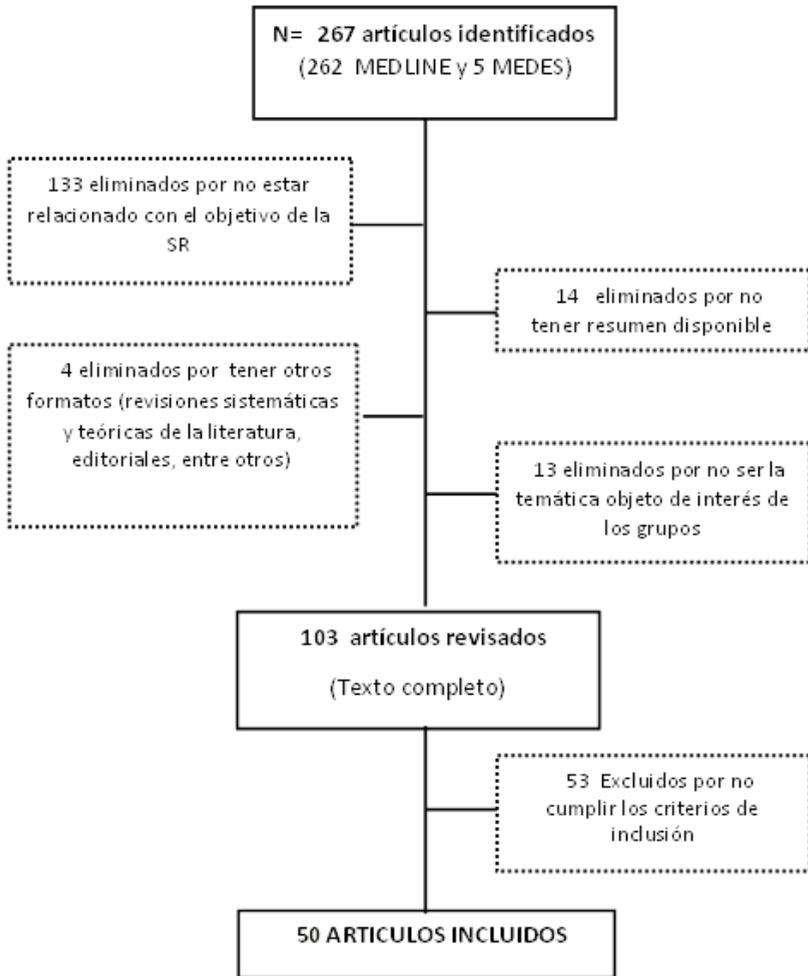
RESULTADOS

Se incluyeron 50 artículos, que abarcaban el periodo 2000 a 2012. Los estudios en este campo empezaron a partir de 2005, año en el que se publicaron 6 artículos, habiéndose alcanzado un máximo de 9 en 2011.

La figura 2 muestra la distribución de frecuencias de los artículos por patógeno estudiado. La gran mayoría de los estudios en epidemiología molecular que incluyen de forma explícita a población inmigrante en España se centraron en dos patógenos, la bacteria *M. tuberculosis* y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) que, en conjunto, superaron los 2/3 del total de estudios (36/50). De las publicaciones restantes cabe destacar la presencia de 3 estudios sobre *Staphylococcus aureus* y 3 sobre el Virus de la Hepatitis B (VBH), mientras que en 2 estudios se analizaron patógenos eucariotas, el díptero *Phlebotomus sergenti*¹⁴ y los nematodos que producen filarías¹⁵.

Respecto a los objetivos, los más frecuentemente identificados o declarados por los autores se reflejan en la figura 3. El objetivo

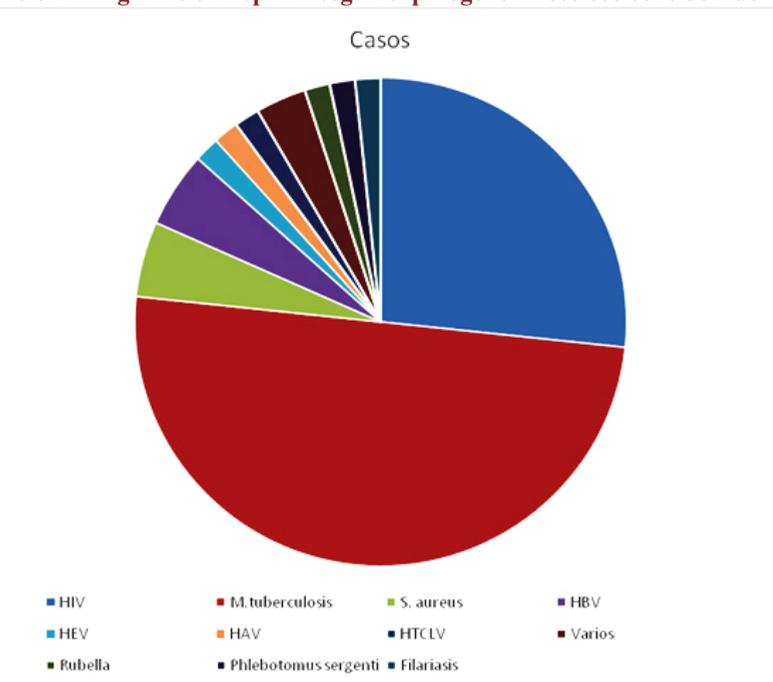
Figura 1
Proceso de selección de estudios publicados que abordan la salud de la población inmigrante en España desde una perspectiva de la epidemiología molecular



principal y básico, recogido como tal en más 26 artículos fue el tipado o genotipado del patógeno correspondiente, es decir, la asignación a un grupo bien delimitado a partir de los marcadores moleculares estudiados. El segundo objetivo más frecuente (15 trabajos) buscaba comprobar si para un patógeno concreto existían diferencias entre la población inmigrante y la autóctona, lo que podía contribuir a informar sobre la datación espacio-temporal de su transmisión. En

12 estudios el objetivo fue establecer correlaciones entre la identificación de mutaciones de resistencia, tipos y genotipos de patógenos y grupos poblacionales. En la interpretación de los resultados ha de considerarse que 11 trabajos tenían un objetivo múltiple, especialmente el genotipado y el estudio del origen de los variantes encontrados, repartidos prácticamente por igual entre VIH y *M. tuberculosis*.

Figura 2
Distribución de los trabajos publicados sobre epidemiología molecular en población inmigrante en España según el patógeno infeccioso considerado



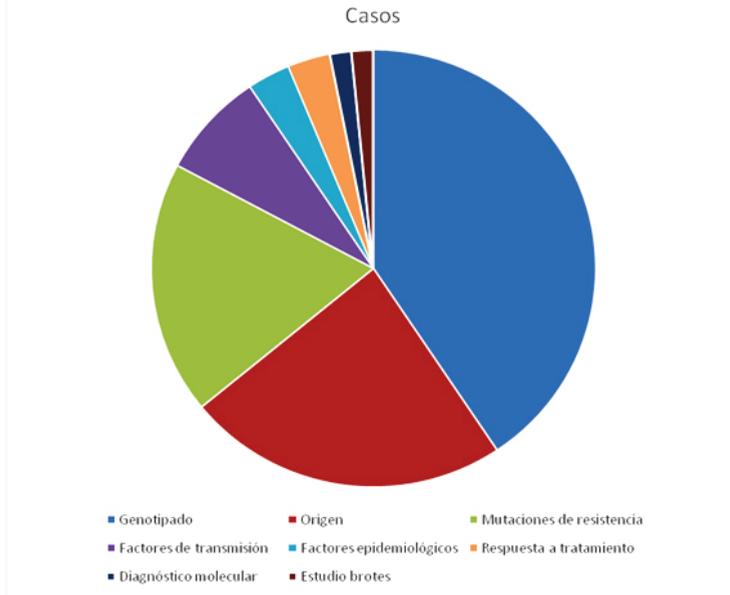
En 31 trabajos el diseño de los estudios analizados correspondió a estudios de cohortes, 5 estudios ecológicos y 5 ensayos clínicos. 36 trabajos fueron estudios retrospectivos, 8 fueron prospectivos y 6 transversales.

Respecto al intervalo de tiempo cubierto en los estudios, 43 fueron análisis plurianuales. El mayor lapso de tiempo analizado correspondió a un estudio sobre la introducción del VIH en Andalucía¹⁶, realizado desde 1983 hasta 2001, mientras que el más restringido abarcó dos meses (octubre y noviembre de 2006) y analizó las resistencias a los fármacos antituberculosos en más de 1.000 cepas de *M. tuberculosis* de todo el país¹⁷.

Los trabajos analizados diferían sustancialmente en el tamaño de las muestras estudiadas, desde un mínimo de 8 individuos¹⁸ hasta un máximo de 2.792⁹. Ambos estudios se realizaron sobre el mismo organismo, el

VIH, y tuvieron como objetivo básico el genotipado y el origen de las variantes del virus encontradas. Además de las diferencias derivadas del rango de países de origen incluidos en ambos estudios, en el primero sólo participaron africanos y en el segundo eran de todo el mundo. La principal diferencia se estableció por la extensión de las pruebas genotípicas de resistencia a los principales antirretrovirales usados en el tratamiento de la infección por VIH. Desde 2005 la secuenciación del VIH se ha extendido no sólo a los casos de fallo terapéutico sino también a antes del inicio de tratamiento en pacientes naïve, por lo que se dispone de un número creciente de secuencias que permiten su utilización en estudios de epidemiología molecular completadas con una información demográfica y clínica básica, sin necesidad de realizar pruebas de laboratorio adicionales a las de diagnóstico.

Figura 3
Distribución de los trabajos publicados sobre epidemiología molecular en población inmigrante en España según el objetivo primario



El estudio de las resistencias a los tratamientos antibióticos también subyace a la elevada frecuencia de estudios de epidemiología molecular en *M. tuberculosis*. La resistencia a antibióticos es una preocupación grave y creciente en la práctica clínica y también en salud pública, lo que facilita la utilización rutinaria de pruebas fenotípicas y, también cada vez con más frecuencia, genéticas. Gracias a ello, se dispone de información genética que, al igual que con el VIH, puede emplearse para estudios de epidemiología molecular. Sin embargo, a diferencia del VIH, la secuenciación no es la técnica habitual para determinar las resistencias en *M. tuberculosis*, lo que dificulta el estudio de los orígenes de los variantes a nivel global⁵, pero facilita, por el contrario, el estudio de agrupaciones y cadenas de transmisión, complementando otras investigaciones epidemiológicas^{3,19-21}.

También con *M. tuberculosis* se encontraron los únicos artículos en los que el objetivo fue coincidente con los abordados

en estudios no basados en métodos moleculares. Varios estudios^{1,2,22,23} analizaron los factores que afectaban a la transmisión de la tuberculosis en población inmigrante. Sólo un estudio sobre VIH²⁴ se planteaba, con metodología similar, el problema de los factores implicados en el retraso diagnóstico así como el estudio de características determinadas geográficamente que permitieran identificar factores para mejorar la atención a estos pacientes.

Para los restantes patógenos considerados en los trabajos analizados, los objetivos más frecuentes en estudio fueron el genotipado, en el caso de los virus de la hepatitis B²⁵⁻²⁷, de la hepatitis E⁷ y el HTLV¹⁰ y de *Phlebotomus sergenti*¹⁴ y el estudio de mutaciones de resistencia, en *S. aureus*^{28,29}. El único estudio con el virus de la rubeola³⁰ se centró en el análisis de un brote y el correspondiente a las filariasis¹⁵ en el desarrollo de un diagnóstico molecular para el nematodo causante de la infección.

En varios estudios se determinó que las cepas o variantes del patógeno encontradas en inmigrantes tienen su origen más probable en los países de origen, como en el estudio del virus de la hepatitis A ligado a un brote alimentario⁸, de la hepatitis B^{25,26}, de la hepatitis E⁷, del HTLV¹⁰ y en el estudio de varios virus de transmisión por vía sanguínea³¹. Semejantes conclusiones se indicaban en los más numerosos estudios de VIH^{9,18,32-37} y en algunos que estudiaban *M. tuberculosis*^{21,38,39}, si bien también se pusieron de manifiesto casos de transmisión desde la población autóctona a la inmigrante^{3,22,23,39}.

DISCUSIÓN

Es difícil generalizar las conclusiones de los estudios en epidemiología molecular, pues la mayoría de ellos tienen un carácter meramente descriptivo y tienen un ámbito de aplicación muy restringido a causa del tipo de la muestra estudiada y su tamaño.

Por tanto, los movimientos migratorios están contribuyendo a modificar la naturaleza y frecuencia de los tipos/genotipos de los patógenos circulantes en España, al menos para los casos del VIH y *M. tuberculosis*, lo que puede llevar aparejados cambios en las pautas de tratamiento¹⁷, en su patogenicidad⁴ y en la frecuencia de mutaciones de resistencia²⁸.

Aparte del cambio en la distribución ya mencionada de tipos de patógenos, la única conclusión general de estos estudios es que la aplicación de métodos o marcadores moleculares para el estudio de enfermedades infecciosas es un complemento muy deseable que debería, en la medida de lo posible, generalizarse tanto a los patógenos ya descritos como a otros sobre los que nuestro conocimiento de su diversidad y distribución epidemiológica molecular es bajo o nulo. Ejemplos claros de las ventajas derivadas de estas aproximaciones los representan las infecciones de transmisión

sexual o el virus de la hepatitis C, en el que la introducción de nuevos fármacos antivirales adicionales al interferón y la ribavirina lleva aparejada la necesidad de realizar una vigilancia molecular de las resistencias.

Una característica común a estos estudios es la ausencia de un análisis explícito de sus limitaciones. A pesar de los tamaños muestrales reducidos y los sesgos introducidos en el muestreo, pocos los recogen como factores limitantes respecto a las conclusiones derivadas y su posterior generalización^{24,35,36,40,41}. Cabe mencionar que la mayoría de los artículos provienen de publicaciones de las áreas microbiología, enfermedades infecciosas y virología, siendo pocos los publicados en revistas de salud pública o epidemiología^{2,21,24}. Las distintas tradiciones científicas en estos campos pueden, en parte, explicar esta ausencia de autocrítica a la hora de presentar las conclusiones del estudio.

La epidemiología molecular es una disciplina incorporada muy recientemente al campo de la epidemiología y, como se ha mostrado en párrafos anteriores, aún existen diferencias importantes entre ellas, tanto metodológicas como en los objetivos. No obstante, son cada vez más frecuentes los trabajos en que ambos enfoques coinciden en un mismo análisis, mostrando las ventajas derivadas de su complementariedad, dado que, por un lado, la epidemiología molecular aporta una perspectiva centrada en el patógeno mientras que, por otro, la epidemiología tradicional se centra en la población afectada y sus determinantes clínicos, sociales, culturales, etcétera. Sin embargo resulta difícil plantear trabajos precisos sin la complementariedad de ambas disciplinas.

Los estudios en epidemiología molecular de población inmigrante en España se concentran en dos patógenos principales, VIH y *M. tuberculosis*. Las razones para esta concentración son variadas. Por una parte, para

ambos se dispone de pruebas clínicas cuyos resultados son susceptibles de ser analizados desde una perspectiva epidemiológica molecular, pues proporcionan información sobre las variantes genéticas de los patógenos respectivos a la vez que tienen una utilidad clínica directa para el tratamiento del paciente. Por otra parte, en ambos casos se trata de agentes de enfermedades con amplia distribución geográfica y con diferencias en los patrones de resistencias a los respectivos tratamientos cada vez mejor conocidas que, además, producen infecciones de larga duración, con un lapso desde la misma hasta la manifestación clínica que puede ser de varios años, por lo que es importante conocer dónde y cuándo se produjeron. En el caso de la población inmigrante se plantea la estimación de la tasa de nuevas infecciones producidas ya en España respecto a las acontecidas en los países de origen. El cambio en el espectro de variantes circulantes y transmitidas en la población española por la incorporación desde otras regiones geográficas tiene consecuencias en la clínica y en la epidemiología, y las técnicas moleculares desempeñan un papel central en su estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gil M, Moreno R, Marín M, Romeu MÁ, Gomila B, González F. Influencia de la inmigración en los patrones de transmisión de la tuberculosis en Castellón (2004-2007). *Gac. Sanit.* 2011;25(2):122-126.
2. Iñigo J, Arce A, Palenque E, García de Viedma D, Chaves F. Decreased tuberculosis incidence and declining clustered case rates, Madrid. *Emerg Infect Dis* 2008;14(10):1641.
3. Alonso Rodríguez N, Chaves F, Inigo J, Bouza E, García de Viedma D, Andres S et al. Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(5):435-442.
4. Alonso M, Alonso Rodríguez N, Garzelli C, Martínez Lirola M, Herranz M, Samper S et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates from the Mediterranean area. *BMC Microbiol.* 2010;10(1):151.
5. Alonso M, Borrell S, Martínez Lirola M, Bouza E, García de Viedma D. A proposal for applying molecular markers as an aid to identifying potential cases of imported tuberculosis in immigrants. *Tuberculosis.* 2008;88(6):641-647.
6. Gavín P, Iglesias MJ, Jiménez MS, Rodríguez-Vallón E, Ibarz D, Lezcano MA et al. Long-term molecular surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in Spain. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):701-710.
7. Fogeda M, Avellon A, Cilla CG, Echevarria JM. Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virol.* 2009;81(10):1743-1749.
8. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, Sala R, Barrabeig I, Bosch A et al. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: Circulation of newly emerging strains. *J Clin Virol.* 2011;52(2):98-102.
9. González-Alba JM, Holguín Á, García R, García-Bujalance S, Alonso R, Suárez A et al. Molecular surveillance of HIV-1 in Madrid, Spain: a phylogeographic analysis. *J Virol.* 2011;85(20):10755-10763.
10. Pádua E, Rodés B, Pérez-Piñar T, Silva AF, Jiménez V, Ferreira F et al. Molecular characterization of human T cell leukemia virus type 1 subtypes in a group of infected individuals diagnosed in Portugal and Spain. *AIDS Res Human Retrovir.* 2011;27(3):317-322.
11. Arksey H, O'Malley L. Scoping studies: towards a methodological framework. *Int J Soc Res Meth.* 2005;8(1):19-32.
12. Valderas JM, Mendivil J, Parada A, Losada-Yáñez M, Alonso J. Construcción de un filtro geográfico para la identificación en PubMed de estudios realizados en España. *Rev Esp Cardiol.* 2006;59(12):1244-1251.
13. International Organization for Migration (OIM). International Migration Law, Glossary on Migration. Ginebra:OIM; 2004. Disponible en: http://publications.iom.int/bookstore/free/IML_1_EN.pdf
14. Barón S, Martín-Sánchez J, Gállego M, Morales-Yuste M, Boussaa S, Morillas-Márquez F. Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cytb) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Trop.* 2008;107(3):259-267.
15. Jiménez M, González LM, Bailo B, Blanco A, García L, Pérez-González F et al. Diagnóstico diferencial de filariasis importada mediante técnicas moleculares (2006-2009). *Enf Infec Microbiol Clín.* 2011;29(9):666-671.

16. Alvarez M, García F, Martínez NM, García F, Bernal C, Vela CM et al. Introduction of HIV type 1 non-B subtypes into Eastern Andalusia through immigration. *J Med Virol.* 2003;70(1):10-13.
17. Jiménez MS, Casal M. Situación de las resistencias a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* en España. *Rev Esp Quimioter.* 2008;21(1):22-25.
18. Ortiz M, Muñoz L, Bernal A, Rodríguez A, Zorraquino A, Vadillo J et al. Molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes from Africa in Spain. *AIDS Res Human Retrovir.* 2000;16(18):1967-1971.
19. Solsona J, Cayla JA, Verdú E, Estrada MP, García S, Roca D et al. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5(8):724-731.
20. Aznar E, Domingo D, Abanades S, García-Peñuela E, López-Brea M. Resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* durante un periodo de cuatro años en un hospital de Madrid. *Rev Esp Quimioter.* 2005;18(3):222-225.
21. García-Pachon E, Escribano I, Rodríguez JC, Ruiz M, Ramos JM, Navarro JF et al. Incidence of Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Elche, Spain: a 13-year surveillance study. *EuroSurveill.* 2007;12(5):E17.
22. Borrell S, Español M, Orcau A, Tudó G, March F, Cayla JA et al. Tuberculosis transmission patterns among Spanish-born and foreign-born populations in the city of Barcelona. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):568-574.
23. Lucerna MA, Rodríguez-Contreras R, Barroso P, Martínez MJ, García de Viedma D. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Almería. Factores asociados a transmisión reciente. *Enf Infec Microbiol Clin.* 2011;29(3):174-178.
24. Pérez-Molina JA, López-Vélez R, Navarro M, Pérez-Eliás MJ, Moreno S. Clinicoepidemiological characteristics of HIV-infected immigrants attended at a Tropical Medicine referral unit. *J Travel Med.* 2009;16(4):248-252.
25. Echevarría JM, Avellón A, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol.* 2005;76(2):176-184.
26. Bottecchia M, Madejón A, Puente S, García-Samaniego J, Rivas P, Herrero D et al. Detection of hepatitis B virus genotype A3 and primary drug resistance mutations in African immigrants with chronic hepatitis B in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):641-644.
27. Poves Martínez E, Pozo Prieto Dd, Costero Pastor B, Borrego Rodríguez G, Beceiro Pedroño I, Sanz García C et al. Incidencia diagnóstica de AgHBs positivo: Características epidemiológicas, clínicas y virológicas. *Rev Esp Enf Digest.* 2012;104(1):10-15.
28. Manzur A, Dominguez AM, Pujol M, González MPM, Limon E, Hornero A et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(4):377-380.
29. Frick MA, Moraga-Llop FA, Bartolomé R, Larrosa N, Campins M, Roman Y et al. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad en niños. *Enf Infec Microbiol Clín.* 2010;28(10):675-679.
30. Martínez-Torres AO, Mosquera MM, Sanz JC, Ramos B, Echevarría JE. Phylogenetic analysis of rubella virus strains from an outbreak in Madrid, Spain, from 2004 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):158-163.
31. Toro C, Jiménez V, Rodríguez C, del Romero J, Rodés B, Holguín Á et al. Molecular and epidemiological characteristics of blood-borne virus infections among recent immigrants in Spain. *J Med Virol.* 2006;78(12):1599-1608.
32. Holguín A, Aracil B, Álvarez A, Barros C, Soriano V. Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) non-B subtypes in foreigners living in Madrid, Spain, and comparison of the performances of the AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.0 and the new automated version 1.5. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1850-1854.
33. Holguín A, Álvarez A, Pena MJ, Artiles F, Molina L, Soriano V. HIV-positive immigrants in the Canary Islands, Spain: implications for public health in Europe. *HIV Clin Trials.* 2003;4:184-192.
34. Alvarez M, García F, Martínez NM, García F, Bernal C, Maroto Vela C et al. Introduction of HIV type 1 non-B subtypes into Eastern Andalusia through immigration. *J Med Virol.* 2003;70(1):10-13.
35. Holguín A, Pena MJ, Troncoso F, Soriano V. Introduction of non-B subtypes among Spaniards newly diagnosed with HIV type 1 in the Canary Islands. *AIDS Res Human Retrovir.* 2007;23(4):498-502.
36. Holguín A, Mulder M, Yebra G, Lopez M, Soriano V. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res.* 2008;6(4):327-334.

37. de Felipe B, Pérez-Romero P, Abad-Fernández M, Fernandez-Cuenca F, Martinez-Fernandez FJ, Trastoy M et al. Prevalence and resistance mutations of non-B HIV-1 subtypes among immigrants in Southern Spain along the decade 2000-2010. *Viol J.* 2011;8(416):941-944.

38. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Gomez LI, Lafoz MC, Jimenez MS et al. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1220-1227.

39. Iñigo J, García de Viedma D, Arce A, Palenque E, Alonso Rodríguez N, Rodríguez E et al. Analysis of changes in recent tuberculosis transmission patterns after a sharp increase in immigration. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):63-69.

40. Pérez-Molina JA, Suárez-Lozano I, Del Arco A, Teira R, Bachiller P, Pedrol E et al. Late initiation of HAART among HIV-infected patients in Spain is frequent and related to a higher rate of virological failure but not to immigrant status. *HIV Clin Trials.* 2011;12(1):1-8.

41. Pérez-Molina JA, Mora Rillo M, Suárez-Lozano I, Casado-Osorio JL, Teira Cobo R, Rivas González P et al. Response to combined antiretroviral therapy according to gender and origin in a cohort of naive HIV-infected patients: GESIDA-5808 study. *HIV Clin Trials.* 2012;13(3):131-141.