



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECCUTENIA

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO

DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA

“EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS HUMANA Y TIPIFICACIÓN GENÉTICO MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL EN EL ESTADO DE MICHOACÁN”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ANA LAURA GUILLÉN NEPITA

TUTORA:

DOCTORA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA

MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

CO-TUTOR:

DOCTOR EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

MORELIA, MICHOACÁN. ENERO, 2014

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la U.M.S.N.H. bajo la dirección de D. en C. Ma. Soledad Vazquez Garcidueñas y la co-dirección de D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, el Laboratorio de Microbiología del Hospital General “Dr. Miguel Silva”, la Unidad de Investigación Médica de del IMSS de Zacatecas y del Comité Estatal para el Fomento y Producción Pecuaria de Michoacán A. C. Se contó con el apoyo de los Proyectos 16.4/CIC-UMSNH “Diversidad genética de aislados clínicos de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de regoones con mayor incidencia del Estado de Michoacán”, FOMIX-MICH 2009-127128 “Inventario de gases de efecto invernadero y escenarios del cambio climático global en el Estado de Michoacán” y CONACyT/FORDECyT/ST 346/2012 “Análisis genómico epidemiológico del complejo *M. tuberculosis* en los estados de Querétaro, Guanajuato y Michoacán” del Fondo Institucional del Fomento Regional para el Desarrollo, Científico, Tecnológico y de Innovación”. La realización de este trabajo también fue posible gracias a la beca para estudios de doctorado otorgada por CONACyT con número de expediente 34145.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
LA TUBERCULOSIS EN MÉXICO	6
AGENTE CAUSAL	8
DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD.....	10
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
RESULTADOS	18
CAPÍTULO 1: TENDENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA TUBERCULOSIS EN MICHOACÁN 18	
INTRODUCCIÓN	18
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS.....	54
CAPÍTULO 2: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : EVOLUTIONARY AND EPIDEMIOLOGICAL INSIGHTS AS REVEALED BY MOLECULAR GENETIC ANALYSIS.....	62
CAPÍTULO 3: RAPD DISCLOSES HIGH MOLECULAR DIVERSITY OF <i>Mycobacterium tuberculosis</i> FROM MICHOACÁN, MEXICO	82
CAPÍTULO 4: LINAJES DE <i>M. tuberculosis</i> CIRCULANTES EN MICHOACÁN	92
INTRODUCCIÓN	92
MATERIALES Y MÉTODOS	95
RESULTADOS	101
DISCUSIÓN	112
CONCLUSIONES	118
PERSPECTIVAS.....	119
REFERENCIAS.....	120
CONCLUSIONES GENERALES	130
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencias de la prevalencia de TB estimada por regiones de la OMS	7
Figura 2. Eliminaciones genómicas entre los miembros del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
Figura 3. Regiones del estado de Michoacán	23
Figura 4. Características sociodemográficas del estado de Michoacán	24
Figura 5. Casos anuales de tuberculosis en el estado de Michoacán	29
Figura 6. Tasa de incidencia municipal por cada 100,000hab	32
Figura 7. Distribución de los casos por grupo de edad	33
Figura 8. Proporción de los casos pulmonares (TBP) y extrapulmonares (TBE)	35
Figura 9. Proporción municipal de hombres por cada mujer diagnosticada con tuberculosis	37
Figura. 10. Enfermedades asociadas a casos de tuberculosis	38
Figura 11. Panel de tipificación del CMTB e identificación de cepas RD ^{RIO} .	105
Figura 12. Frecuencia de los diferentes SIT identificados en la colección MYC, agrupados por familia	108
Figura 13. Distribución de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	109
Figura 14. Bosque de espoligotipos	110
Figura 15. Dendrograma basado en datos de tipificación por MIRU-VNTR .	111

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Variables consultadas en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.....	27
TABLA 2. Comparación de valores de tasa de incidencia anuales	30
TABLA 3. Correlación entre grupos de edad y variables demográficas*	34
TABLA 4. Correlación entre la localización de la enfermedad y variables demográficas*.....	36
TABLA 5. Casos de TBP [†] y TBE [‡] por grupo de edad	36
TABLA 6. Comparación de la distribución de casos por regiones	39
TABLA 7. Patrones de amplificación de las especies del CMTB	97
TABLA 8. Oligonucleótidos utilizados en este estudio	97
TABLA 9 Características epidemiológicas de los pacientes cuyos aislados se incluyeron en el estudio	102
TABLA 10. Tipificación de aislados a nivel de especie	104
TABLA 11. Tipificación de aislados mediante espoligotipo	108

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta a más de 8 millones de personas en todo el mundo cada año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido entre los Objetivos del Milenio el revertir el alza en la incidencia a nivel global para el año 2015. Para lograr este objetivo y apoyar a las estrategias epidemiológicas se han desarrollado herramientas genético-moleculares que permiten identificar cada aislado del agente causal de la enfermedad, *Mycobacterium tuberculosis* y detectar casos pertenecientes a brotes verdaderos, detectar infecciones mixtas, casos de reinfección y de reactivación, así como caracterizar la población de *M. tuberculosis* predominante en una región.

Nuestro país reporta más de 20,000 casos anuales. Los valores de tasa de incidencia estatales varían de 3.9 a 54.1 casos por cada 100,000 habitantes, siendo Michoacán uno de los estados con menor tasa (6.6/100,000hab), lo que indicaría un eficiente control de la enfermedad en la entidad. Sin embargo, no existe ningún perfil epidemiológico detallado que permita evaluar si efectivamente la tuberculosis está controlada en el estado. Tampoco se han utilizado herramientas genético moleculares que permitan la caracterización de los aislados regionales de *M. tuberculosis* y su comportamiento en el estado.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el comportamiento epidemiológico de la tuberculosis humana en el estado de Michoacán y tipificar genéticamente aislados del complejo *M. tuberculosis* de casos clínicos, de manera que esta información permita evaluar y guiar la aplicación de políticas de Salud Públicas, al tiempo que sienta las bases de un trabajo más detallado en el estudio de dinámica de la población local de *M. tuberculosis*.

Para lograr dichos objetivos se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos epidemiológicos de casos registrados en Michoacán y reportados al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica para el periodo 2000-2012. Se encontró que la tuberculosis afecta principalmente a adultos en edad productiva y que existen municipios con un alto porcentaje de casos pediátricos. Se observó que los municipios con mayores tasas de incidencia también tenían una mayor proporción de casos asociados a VIH. Finalmente, se sugiere una regionalización del estado

en tres zonas, en función de las características epidemiológicas registradas: de alta incidencia, de probable subregistro de casos y de probable prevalencia de tuberculosis zoonótica.

De manera paralela se llevó a cabo la tipificación de una colección de 41 aislados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de todo el estado. La colección presentó una alta diversidad genética de la colección al ser evaluada por RAPDs ($H'_2=3.4749$). Mediante *spoligotyping* y MIRU-VNTR se encontró que el linaje Euro-Americano es predominante en la colección, siendo las familias T, X, y LAM, los más frecuentemente encontrados como es de esperarse en la región latinoamericana. Destaca la identificación de tres cepas del genotipo RD^{RIO}, de la familia LAM. Se encontraron también cepas Beijing y del linaje Este de África e India, indicando eventos de migración. Ninguna cepa presentó un perfil alélico idéntico, lo que confirma la gran diversidad genética sugerida por RAPDs. Fue de particular interés la diversidad encontrada entre 5 aislados causantes de tuberculosis meníngea. No se encontró ninguna correlación entre las variables epidemiológicas de los casos clínicos y las características genético-moleculares de los aislados evaluados. En nuestra muestra no se observó la predominancia por región de algún genotipo en particular. Se concluye que la tuberculosis no es una enfermedad controlada en nuestro estado, contrario a lo que sugiere el valor de tasa de incidencia reportado, que las cepas de *M. tuberculosis* circulantes poseen un fondo genético diverso, aún dentro del linaje dominante, que puede ser enriquecido por la migración.

En base a los resultados obtenidos, se sugieren estudios regionalizados de tipificación molecular que permitan determinar relaciones genotipo-fenotipo dentro de la población de *M. tuberculosis* circulante en la entidad; también se sugiere la caracterización de la resistencia a antibióticos de los aislados tipificados y el análisis genómico de las cepas provenientes de casos de tuberculosis meníngea, para encontrar factores de patogenicidad comunes a pesar de su diverso fondo genético.

SUMMARY

Tuberculosis is an infectious disease that affects to more than 8 million people worldwide every year. The World Health Organization (WHO) has included within de Millenium Development Goals to reverse the global incidence of tuberculosis by 2015. In order to reach this objective and to support the epidemiological strategies, some molecular tools have been developed. This tools allow identify each isolate of the causal agent *Mycobacterium tuberculosis* and detect true outbreaks, mixed infections, reinfection or relapse of a case, as well as describe the *M. tuberculosis* population that prevail in a region.

Mexico reports more than 20,000 new cases each year. The incidence rate in each state spans from 3.9 to 54.1 cases for each 100,000 inhabitants. Michoacán has one of the lower rates (6.6/100,000inhab), suggesting that tuberculosis is a controlled disease. However, there is not any detailed epidemiological study that allows assessing if tuberculosis is indeed controlled. Neither the molecular tools have been used regionally in order to characterize the behavior of regional *M. tuberculosis* isolates.

Because of this, the main objectives of this work were to characterize the epidemiological behavior of human tuberculosis in Michoacán and type *M. tuberculosis* clinical isolates by molecular tools, providing guidance to improve Public Health policies and the development of further regional research projects in these subjects.

To do it so, the epidemiological data of clinical cases reported from Michoacán to the National Epidemiological Surveillance System during the years 2000 to 2012 were used to perform a statistical analysis. It was found that tuberculosis affects mainly to young adults and that there are municipalities with a high percentage of pediatric patients; the municipalities with higher incidence rates also reported higher proportions of VIH-tuberculosis comorbidity. Finally, a regionalization of the states in three zones (a high incidence zone, a zone with probable underreport issues and a zone with probable prevalence of zoonotic tuberculosis) was suggested.

Molecular typing of a collection of 41 clinical isolates from all over the state was performed. The collection showed a high genetic diversity as assessed by RAPD analysis ($H'_2= 3.4749$). By spoligotyping and MIRU-VNTR it was found that the Euro-American lineage was predominant in the state, being the families T, X and LAM the most frequently found. This is expected in any Latin-American region. It was interesting the finding of the RD^{RIO} genotype between the LAM family isolates. Beijing and East Africa-Indian lineages were also found, suggesting migration related cases

There were not identical allelic profiles between any strains pairs from the collection, confirming the great diversity within the collection. It was of paramount interest the diversity found between 5 isolates related to meningeal tuberculosis cases. No correlation was found between epidemiological variables and molecular profiles of the typed isolates. In the sample there was no regional predominance of any genotype. It was concluded that tuberculosis is not a controlled disease in the state, that regional *M. tuberculosis* isolates are genetically diverse even within the predominant lineage, and that this diversity may be enriched by migration events. It is suggested the design of regional typing studies in order to establish the existing genotype-phenotype relationships, if any. Drug resistance assessment of typed isolates is also suggested, as well as the search of common virulence factors between diverse meningeal tuberculosis isolates by genomics tools.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las enfermedades infecciosas están lejos de ser un problema superado por el ser humano, particularmente para la población de las regiones de bajo y mediano ingreso per cápita (IPC), a pesar de los avances en la medicina, el uso de antibióticos y la extensión de los programas de vacunación. Según datos recientes del Observatorio Global de Salud (2011), las infecciones del tracto respiratorio bajo constituyen la primera causa de muerte en las regiones con un IPC bajo. En las regiones de IPC medio, este tipo de padecimientos se encuentran en tercer lugar como causa de muerte, seguido por las enfermedades diarreicas en quinto. La infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es la segunda causa de muerte en países con IPC bajo y la sexta en los países con IPC medio. En ambas regiones la tuberculosis (TB) se enlista en octavo lugar. El resto de las principales causas de muerte en estas regiones son padecimientos no infecciosos (World Health Organization, 2011). Considerando que las enfermedades respiratorias y diarreicas incluyen varios cuadros clínicos causados por microorganismos distintos, el VIH/SIDA y la TB se ubican como las dos enfermedades infecciosas que más muertes causan por sí solas. El hecho de que la tuberculosis se encuentre como la segunda enfermedad infecciosa con mayores tasas de mortalidad a nivel mundial, resalta su importancia y la necesidad de no disminuir los esfuerzos para reducir su incidencia.

La TB interactúa con el VIH de manera perniciosa, convirtiéndose en la primera causa de muerte entre pacientes con VIH; a su vez, el VIH es el principal factor de riesgo para que una infección latente de TB se convierta a activa (Stop TB Partnership, 2006). Debido a esto, la epidemia de VIH ha afectado seriamente el control de la TB que se había logrado desde mediados del siglo XX (Leão y Portaels, 2007).

A partir del aumento de casos de TB a nivel mundial a finales de los años ochenta y principios de los noventa del siglo pasado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a esta enfermedad como una emergencia global en 1993 (Stop TB Partnership, 2006), y comenzó a generar reportes globales desde 1997. En el año

2000 se creó la *STOP TB Partnership* con la finalidad de coordinar los esfuerzos para eliminar la TB como un problema de Salud Pública, e incluso, lograr su erradicación. La TB fue considerada como una de las enfermedades graves incluidas en los Objetivos del Milenio para el Desarrollo (OMD; ver <http://www.un.org/spanish/millenniumgoals/aids.shtml>). La meta establecida en los OMD es detener el incremento en la mortalidad causada por esta enfermedad y revertir esta tendencia para el 2015. Gracias a los esfuerzos internacionales, la tasa de mortalidad ha disminuido 41% desde 1990, alcanzando el OMD y haciendo viable la meta de la *STOP TB Partnership* de reducirla a la mitad para el 2015 (World Health Organization, 2012).

Sin embargo, como ya se ha mencionado, actualmente la TB todavía se encuentra dentro de las 10 primeras causas de muerte en las regiones más pobres del mundo, después del VIH y la malaria; durante 2012 se reportaron 8.6 millones de casos nuevos y 1.3 millones de muertes por esta enfermedad. La selección y propagación de cepas resistentes a antibióticos, y el hecho de que Europa y África no parezcan alcanzar la mitad de la tasa de mortalidad de 1990 para el 2015, mantienen vigente la alerta mundial sobre la TB (Fig. 11, World Health Organization, 2013).

LA TUBERCULOSIS EN MÉXICO

México participa en los programas globales de control de TB con una plataforma de vigilancia epidemiológica que tiene estandarizados los procesos de diagnóstico y control a nivel nacional. Todos los casos deben ser notificados a la Secretaría de Salud Pública y registrados en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) (Secretaría de Salud, 2009). Los registros de este sistema indican que el pico de incidencia de TB en nuestro país ocurrió en 1997, año en el que se registraron más de 23,000 casos nuevos, a una tasa de 25 casos por cada 100,000 habitantes (hab). En 1990, la tasa registrada fue de 17.2/100,000 hab. En el 2010 se registraron 18,848 casos, a una tasa de 16.8/100,000 hab. La tasa de 2010 fue 33% menor a la tasa de 1997. Sin embargo, no es la menor tasa registrada en estos 20 años. El punto más bajo de incidencia se registró en 2006: 15.6/100,000 hab, con un total de 16,404 casos (Secretaría de Salud, 2011).

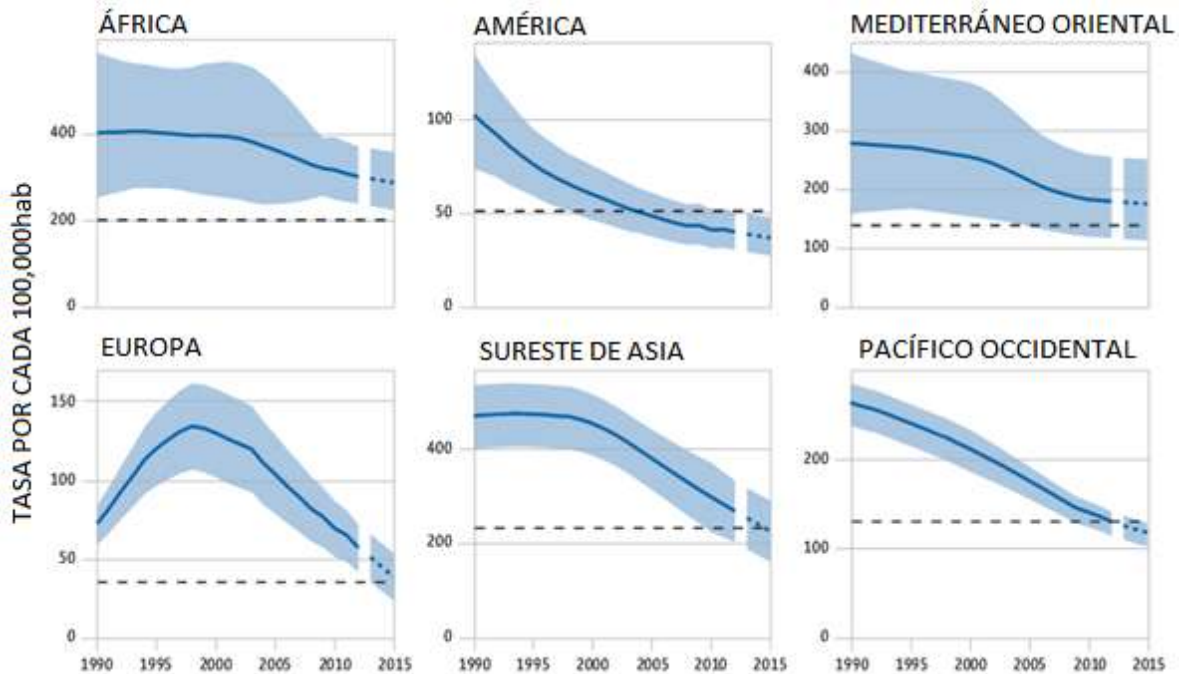


Figura 1. Tendencias de la prevalencia de TB estimada por regiones de la OMS. Las áreas sombreadas representan bandas de incertidumbre. La línea punteada horizontal representa la meta de la Stop TB Partnership de reducción de prevalencia al 50% del valor de 1990 para cada región. La línea punteada azul representa las proyecciones calculadas hasta el año 2015 (World Health Organization, 2013).

Si la meta de la STOP TB Partnership es reducir a la mitad los valores de incidencia registrados en 1990, en nuestro país este valor correspondería a 8.6/100,000 hab, valor del cual aún estamos lejos. Incluso, no se ha alcanzado la mitad del pico de 1997, es decir, a una tasa de 12.5/100,000 hab. Esto implica que a pesar de que México pertenece a la región de Las Américas, la cual ya alcanzó la meta de reducir la incidencia y prevalencia de TB a la mitad del valor alcanzado en 1990, la disminución de la incidencia de TB en nuestro país se ha estancado y se pueden descuidar los esfuerzos para su erradicación, ya que aún se está lejos de este objetivo. El punto más bajo de incidencia se registró en 2006: 15.6/100,000 hab, un total de 16, 404 casos (Secretaría de Salud, 2011). Estos datos indican que la disminución de la incidencia de TB en nuestro país se ha estancado y que no se pueden descuidar los esfuerzos para su erradicación, ya que aún se está lejos de este objetivo. Incluso, si se toma en cuenta la meta de la STOP TB Partnership en el

contexto nacional, también estamos lejos de disminuir a la mitad la incidencia registrada en 1990, valor que correspondería a 8.6/100, 000 hab; o incluso, de reducirla a la mitad del pico de 1997, a una tasa de 12.5/100, 000 hab.

AGENTE CAUSAL

La tuberculosis no es una enfermedad exclusiva del ser humano, ésta puede afectar también a otros mamíferos, entre ellos los gatos, el ganado bovino y caprino, las focas y lobos marinos, entre otros. En cada caso existe una especie bacteriana que se ha especializado en un huésped específico. Las especies bacterianas capaces de causar el cuadro de TB en diferentes mamíferos son muy cercanas genéticamente, por lo que han sido agrupadas en el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB).

El género *Mycobacterium* agrupa a bacilos Gram positivos, no móviles y no esporulados. Su pared celular contiene hasta 50% en peso seco de lípidos, en particular de ácidos micólicos, moléculas cerosas complejas que otorgan al bacilo propiedades fenotípicas particulares. Su genoma presenta otra particularidad: contiene de un 61 a un 71% de guanina y citosina (G+C), un porcentaje poco común entre bacterias (Barrera, 2007).

La mayoría de las especies de *Mycobacterium* son de vida libre. Sin embargo, unas cuantas se han convertido en patógenos de vertebrados, habitando el interior de fagocitos mononucleares. Entre las micobacterias patógenas se encuentran los miembros del CMTB: *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno del ser humano, y lo que parecen ser sus variantes regionales *M. africanum* y *M. canettii*; *M. bovis* y *M. microti*, agentes causales de la tuberculosis en animales y que pueden ser transmitidos a seres humanos; *M. caprae* y *M. pinnipedi*, aisladas de bovinos y focas, respectivamente. Las diferencias fenotípicas de este grupo de microorganismos son claras solo entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, los dos extremos del grupo. La diferenciación del resto de los miembros del CMTB resulta más complicada puesto que, se dice, forma un taxón fenotípicamente continuo (Barrera, 2007).

Para fines de diagnóstico, la diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* es relevante, mientras que la diferenciación del resto de los miembros del CMTB no lo

es tanto. Esto debido a que el resto de las especies del CMTB rara vez son encontrados en casos clínicos. Para la diferenciación fenotípica de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, las pruebas metabólicas claves son la acumulación de niacina, la actividad de nitrato reductasa y la actividad de ureasa. *M. tuberculosis* es incapaz de procesar la niacina derivada de la degradación del metabolito nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) utilizado en el metabolismo primario, por lo que la acumula en grandes cantidades. Por el contrario, el resto de las micobacterias pueden utilizar la niacina producida para sintetizar co-enzimas. La enzima nitrato reductasa le permite a *M. tuberculosis* utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno, lo cual no es posible para *M. bovis*. Finalmente, la actividad de la ureasa de *M. tuberculosis* le permite producir amonio a partir de la urea presente en el medio para utilizarlo en procesos de biosíntesis; este proceso no puede ser llevado a cabo por *M. bovis*. Como se mencionó anteriormente, el resto de la especies del CMTB no presentan resultados tan claros durante la diferenciación bioquímica, por lo que se requiere un mayor número de pruebas metabólicas para su identificación (de Waard y Robledo, 2007)

La continuidad fenotípica que presentan los miembros del CMTB es reflejo de su continuidad genética. Con la secuenciación y análisis de los genomas de *M. tuberculosis* (Cole *et al.* 1998) y *M. bovis* (Garnier *et al.* 2003) se pudo observar que estos microorganismos, considerados como especies distintas por sus características bioquímicas, en realidad compartían el 99.95% de identidad a nivel de nucleótidos. La diferenciación de estos dos microorganismos fue atribuida a eventos de eliminaciones genómicas sucesivas (Garnier *et al.* 2003). De manera análoga a lo que pasa a nivel fenotípico, *M. tuberculosis* y *M. bovis* son los extremos del complejo en cuanto a variaciones genómicas. A través de un análisis por hibridación, se encontró que *M. bovis* tiene el mayor número de eliminaciones acumuladas, mientras que *M. tuberculosis* presentó el menor número de ellas. Entre el resto de los miembros del complejo se registra un número intermedio de eliminaciones específicas que han moldeado el genoma de cada uno (Brosch *et al.* 2002). El conocimiento de la estructura de los genomas de los miembros del CMTB permitió proponer un modelo evolutivo en el cual *M. bovis* aparece como la rama final de un

linaje que se separó del ancestro de los aislados moderno de *M. tuberculosis* y que está constituido *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti* (Fig. I-2).

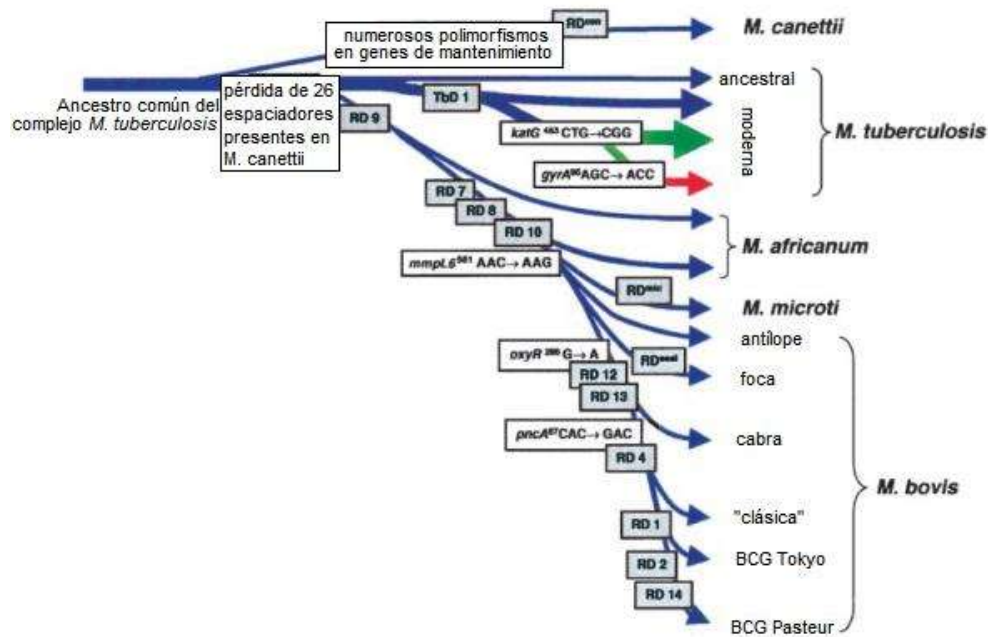


Figura 2. Eliminaciones genómicas entre los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis sensu stricto* aparece como la especie ancestral del complejo al mantener la mayor parte de su material genético intacto (Tomada de Brosch *et al.* 2002).

De manera paralela a este tipo de descubrimientos, se dilucidaron otras características genéticas de las micobacterias, como las regiones con repetidos directos (Kamerbeek *et al.* 1997) o con repetidos en tandem (Supply *et al.* 2006) que pudieron aplicarse en los terrenos de la vigilancia epidemiológica, haciendo esta tarea más eficiente.

DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Mycobacterium tuberculosis se transmite por vía aérea a través de partículas contaminadas emitidas por individuos enfermos al toser, las cuales pueden ser inhaladas por un nuevo huésped. Solamente las partículas menores a 5 μm logran superar la barrera constituida por la mucosa del tracto respiratorio y llegan al interior de los alveolos donde son fagocitados por los macrófagos alveolares (Kritsky y de Melo, 2007). Tras la fagocitosis el bacilo puede ser eliminado mediante el proceso de

autofagia, es decir, la formación del fagolisosoma (Gutierrez *et al.* 2004). Sin embargo, esto no siempre ocurre así. *M. tuberculosis* tiene la capacidad de intervenir con los mediadores de la formación del fagolisosoma, evitando así su destrucción y sobreviviendo en el interior del macrófago como un parásito intracelular (Deretic *et al.* 2006). Ante la persistencia del patógeno se desencadena una respuesta inflamatoria local. El macrófago produce el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y otras citocinas pro-inflamatorias para reclutar a los leucocitos. Los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T llegan al sitio de infección y forman un granuloma. Inicialmente el granuloma consiste de un núcleo de macrófagos infectados, rodeado de macrófagos esponjosos (Kritsky y Fiuza de Melo, 2007).

Los eventos hasta aquí descritos constituyen la infección primaria. Los individuos que logran montar una respuesta inmune adecuada para contener a *M. tuberculosis* en esta etapa, sin eliminarlo por completo, desarrollan lo que se conoce como infección latente. A partir de éste momento el riesgo de que la enfermedad progrese a tuberculosis activa es mayor durante los 3 a 5 años siguientes a la infección primaria y va disminuyendo conforme pasa el tiempo (Kritsky y Fiuza de Melo, 2007). La infección latente se caracteriza por la ausencia de síntomas, pero conlleva el riesgo de progresar a un cuadro clínico en caso de una inmunodepresión. Dado que el estado de infección latente se determina por la presencia de antígenos purificados intradérmicamente, los individuos a los que se les diagnostica tuberculosis latente pueden pertenecer a cualquiera de los siguientes grupos: 1) Los que sufren de enfermedad subclínica; 2) Aquellos que desarrollan la enfermedad activa; 3) Los que mantendrán una infección latente de por vida; y 4) Individuos que contendrán la infección por un periodo limitado de tiempo, pero que posteriormente desarrollarán la enfermedad activa (Barry *et al.* 2009).

En adultos, la enfermedad activa suele ocurrir como la reactivación de la infección primaria, lo que se conoce como infección secundaria. En esta ocasión el bacilo se reproduce dentro del granuloma primario, sale de sus límites y se disemina linfáticamente hacia otras regiones en el pulmón o incluso a otros órganos y tejidos. La enfermedad pulmonar es el cuadro más común, tras la licuefacción del tejido

contenido por el granuloma y la formación de cavidades características de la infección secundaria. Los síntomas más comunes de la enfermedad pulmonar son la falta de apetito, fiebres ligeras, sudoración nocturna, astenia, irritabilidad, migraña, tos de desarrollo insidioso y, en menos de un cuarto de los casos, hemotisis. Cuando la enfermedad alcanza otros órganos los síntomas suelen ser poco específicos y variables dependiendo del sitio de la lesión (Kritsky y Fiuza de Melo, 2007). Sin tratamiento, el 70% de los pacientes muere antes de los 10 años, con una duración promedio de 3 años desde el inicio de la enfermedad hasta la curación o la muerte (Tiemersma *et al.* 2010). Sin embargo, con la estrategia de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES, o DOTS por sus siglas en inglés), el 90% de los casos es curable (WHO, 2013).

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

El desarrollo de un número creciente de herramientas de identificación y caracterización genética de microorganismos, así como la enorme necesidad de enfrentar eficientemente al agente causal de la TB, se impulsaron el desarrollo de técnicas de genotipificación específicas para el CMTB basadas en marcadores moleculares, las cuales se describen en el capítulo 2 de este documento. En general, el uso de estas herramientas ha permitido reconstruir con precisión cadenas de transmisión, identificar brotes, detectar casos de reinfección o reactivación y seguir el rastro de cepas de interés epidemiológico (Mathema *et al.* 2006).

A pesar de la utilidad que tiene el uso de marcadores moleculares en la identificación de *M. tuberculosis* en los sistemas de vigilancia epidemiológica, este tipo de estudios son muy escasos en nuestro país. En particular, en el estado de Michoacán, estas técnicas no han sido aplicadas para la caracterización de las cepas causantes de TB.

Por todo lo anterior, este trabajo tuvo como finalidad evaluar el comportamiento epidemiológico de la tuberculosis en el estado de Michoacán, con base en los datos colectados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica; caracterizar los aislados de *M. tuberculosis* proporcionados por las instituciones de la Secretaría de Salud de Michoacán durante el periodo 2009-2011, como una evaluación preliminar

de la diversidad genética de este microorganismo a nivel regional, así como determinar las características genómicas de cepas seleccionadas por su relevancia epidemiológica.

Como resultado de este trabajo, se emiten una serie de recomendaciones para mejorar y ampliar la caracterización de las cepas de *M. tuberculosis* que circulan en el estado de Michoacán y optimizar el sistema de vigilancia epidemiológica. Así mismo, se sugieren algunas directrices a seguir en el estudio de la biología de este microorganismo, de manera que los futuros trabajos de investigación tengan impacto a nivel local y global.

HIPÓTESIS

En Michoacán la tuberculosis es causada por diversos genotipos de *M. tuberculosis* sin la predominancia de un genotipo en particular.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el comportamiento epidemiológico de la tuberculosis humana en el estado de Michoacán y tipificar genéticamente aislados del complejo *M. tuberculosis* de casos clínicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las tendencias epidemiológicas de la tuberculosis en Michoacán
- Identificar los miembros del complejo causantes de TB en la región
- Evaluar la diversidad genética de los aislados obtenidos
- Determinar los linajes y familias de *M. tuberculosis* presentes en la región
- Analizar el fondo genético de cepas con características clínicas de interés

REFERENCIAS

Barrera, L. 2007. **The Basics of Clinical Bacteriology**. En: J.C. Palomino, S. Cardoso-Leão y V. Ritacco (Eds). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Belgium, Brazil, Argentina: TuberculosisTextbook.com. pp. 93-113.

Barry C.E. 3rd, H.I. Boshoff, V. Dartois, T. Dick, S. Ehrt, J. Flynn, D. Schnappinger, R.J. Wilkinson y D. Young. 2009. **The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies**. *Nat Rev Microbiol*. 7(12):845-55

Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen y S. T. Cole. 2002. **A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex**. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99(6):3684-3689.

Leão, S. C. y F. Portaels. 2007. **History**. En J. C. Palomino, S. Cardoso Leão, y V. Ritacco (Eds). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care** Belgium, Brazil, Argentina: TuberculosisTextbooks.com. pp. 25-52.

Cole, S. T., R. Brosh, J. Parkil, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin *et al.* 1998. **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence**. *Nature*. 393(6685):537-544.

de Waard, J. H. y J. Robledo. 2007. **Conventional Diagnostic Methods**. En: En: J.C. Palomino, S. Cardoso-Leão, y V. Ritacco (Eds). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Belgium, Brazil, Argentina: TuberculosisTextbook.com. pp. 401-424.

Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B.C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M.C. Gutierrez, M. Hilty, P.C. Hopewell

y P.M. Small. 2006. **Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis***. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103(8):2869-2873.

Garnier, T., K. Eiglmeier, J.-C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes *et al.* 2003. **The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis***. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100(13):7877-7882.

Gutierrez, M.G., S. S. Master, S.B. Singh, G.A. Taylor, M.I. Colombo y V. Deretic. 2004. **Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages**. *Cell* 119:753–766

Hershberg, R., M. Lipatov, P. M. Small, H. Sheffer, S. Niemann, S. Homolka, J.C. Roach, K. Kremer, D.A. Petro, M.W. Feldman y S. Gagneux. 2008. **High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography**. *PLoS Biol.* 6(12):e311.

Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen , R. Shaw, M. Goyal y J. van Embden. 1997. **Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology**. *J Clin Microbiol.* 35(4):907-914.

Deretic V., S. Singh, S. Master, J. Harris, E. Roberts, G. Kyei, A. Davis, S. de Haro, J. Naylor, H.H. Lee e I. Vergne. 2006. ***Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defense mechanism**. *Cell Microbiol.* 8(5):719-727.

Mathema, B., N.E. Kurepina, P.J. Bifani y B.N. Kreiswirth. 2006. **Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights**. *Clin Microbiol Rev.* 19(4):658-685.

Secretaría de Salud. 2009. **Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México**. S. S. México D.F.

Secretaría de Salud. 2011. **Situación Actual de la Tuberculosis en México. Avances y Desafíos.** S.S. México D.F.

Stop TB Partnertship. 2006. **The Global Plan to Stop TB 2006-2015. Actions for life: Towards a wolrd free of tuberculosis.** World Heath Organization. Geneva.

Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rüsh-Gerdes, E. Willery , E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina *et al.* 2006. **Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit – Variable-Number Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Clin Microbiol.* 44(12):4498-510.

Tiemersma, E.W., M.J. van der Werf, M.W. Borgdorff, B.G. Williams y N.J. Nagelkerke. 2011. **Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review.** *PLoS One.* 6(4):e17601

van Embden, J. D., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Giquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick *et al.* 1993. **Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology.** *J Clin Microbiol.* 31(2):406-409.

van Soolingen, D., L. Qian, P.E. de Haas, J.T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H.Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, J.D. van Embden. 1995. **Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia.** *J Clin Microbiol.* 33(12):3234-3238.

World Health Organization (WHO). 2011. **Ten Leading Causes of Death in 2011.** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html> Accesada el 28 de octubre de 2011).

World Health Organization. 2013. **Global Tuberculosis Report 2013.** WHO. Geneva.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: TENDENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA TUBERCULOSIS EN MICHOACÁN

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son resultado de la interacción entre un organismo patógeno y su huésped. Esta relación es influenciada por factores ambientales y sociales que van desde las características climáticas del entorno, hasta los hábitos higiénicos del huésped. Las características del patógeno, el huésped y el entorno determinan el comportamiento de una enfermedad infecciosa en una comunidad. El perfil epidemiológico resultante describe la distribución espacial, temporal y poblacional de una enfermedad, así como los factores que influyen en su desarrollo, los cuales pueden ser biológicos, químicos, genéticos, físicos, sociales, culturales, económicos y de comportamiento (Bonita *et al.* 2006). El perfil epidemiológico de una enfermedad infecciosa puede ser enriquecido con la aplicación de técnicas de biología molecular que permiten clasificar a los microorganismos patógenos en grupos por debajo del nivel de especie con un significado real para los sistemas de Salud Pública, facilitando la distinción de brotes y la aparición de casos esporádicos (Foxman y Riley, 2001). Conocer este perfil permite diseñar estrategias eficientes de Salud Pública apropiadas para cada región para contener y erradicar una enfermedad infecciosa determinada.

El perfil epidemiológico de la tuberculosis indica que es una enfermedad asociada a la edad más productiva del ser humano, pues el 75% de los pacientes a nivel mundial tienen entre 15 y 75 años de edad; también se asocia a condiciones de pobreza, ya que el 95% de los casos se presenta en países en desarrollo (Montoro y Rodríguez, 2007). Adicionalmente, se ha observado que esta enfermedad afecta con más frecuencia a hombres que a mujeres: en el 2011 se reportaron 1.9 pacientes masculinos por cada paciente femenino a nivel global (WHO, 2012). La baja representación de las mujeres entre los casos de TB reportados se puede deber a que éstas tienen un menor acceso a los servicios de salud, por lo que sus casos

no son registrados (Holmes et al. 1998; Borgdorff *et al.* 2000). Sin embargo, los autores no descartan que las diferencias entre géneros se deban a factores genéticos. Actualmente se acepta que existen factores biológicos y sociales que generan la mayor proporción de pacientes masculinos, aunque dichos factores no se han identificado y probado con claridad (Dye y Borgdorff, 2008).

Mientras que la diferencia en el número de casos en función del género es un tema sujeto a debate, la afectación en función de la edad es muy clara. El grupo etario más afectado por tuberculosis varía conforme se limita el contagio. En los países en los que se ha logrado abatir la tasa de incidencia de tuberculosis la transmisión de la enfermedad ocurre de manera esporádica, de manera que los casos nuevos corresponden principalmente a pacientes de mayor edad cuya infección ha permanecido latente por muchos años. Por el contrario, en los países en los que la tasa de incidencia es alta, la transmisión de la enfermedad es un evento frecuente y los casos nuevos ocurren principalmente entre adultos jóvenes y niños (Dye y Borgdorff, 2008; Nellson y Wells, 2004). De manera general, la distribución de los casos reportados en los diferentes grupos de edad puede ser considerada como un reflejo de la dinámica de la enfermedad en una región.

Otro factor que afecta el comportamiento de la tuberculosis en una población es la incidencia de padecimientos que afectan la efectividad de la respuesta inmune y facilitan el desarrollo de la enfermedad activa. Entre los factores que aumentan el riesgo de que una persona contagiada desarrolle tuberculosis activa se encuentran la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), seguida de la Diabetes mellitus (DM), la desnutrición y el alcoholismo. A nivel mundial, la comorbilidad VIH/tuberculosis (VIH/TB) ha sido motivo de gran preocupación pues la pandemia de VIH-SIDA fue el factor que disparó los valores de incidencia de tuberculosis en todo el mundo (Dye y Borgdorff, 2008) en la década de los 90's. A la fecha, las regiones con altas tasas de incidencia de VIH-SIDA también son regiones con altas tasas de incidencia de tuberculosis (WHO, 2012).

Criterios de alta y baja incidencia

Aunque los términos de alta incidencia y baja incidencia son ampliamente utilizados en la literatura para categorizar regiones afectadas por la tuberculosis, en la práctica no existe un consenso respecto al valor que correspondiente a cada categoría. Hasta su reporte global del año 2012, la OMS manejó una tasa de incidencia de 25/100,000 hab como límite superior para el más bajo de sus rangos (WHO, 2012). El criterio europeo establecía hasta el 2002 que los países de baja incidencia eran aquellos que tenían valores por debajo 10/100,000 hab (Clancy et al., 1991). A partir del 2002, el valor aumentó a 20/100,000 hab para incluir a los países de Europa del Este, cuya carga de tuberculosis es mayor a la de Europa Occidental (Broekman et al., 2002). Este valor es también el límite utilizado por los Estados Unidos de América (CDC, 2009), pero es inferior al criterio británico, que establece el límite en 40/100,000 hab (PHE, 2013). Para el 2013 el reporte de la OMS recategorizó sus estadísticas, siendo 10/100,000 hab el nuevo límite superior para el más bajo de sus rangos (WHO, 2013). Por lo tanto, éste último valor se considerará en este trabajo como la máxima tasa esperada en una zona de baja incidencia.

Perfil epidemiológico de la tuberculosis en México

En México, el órgano responsable de la vigilancia epidemiológica de tuberculosis es la Secretaría de Salud (SS). Los casos nuevos diagnosticados en todo el país son registrados en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). El perfil epidemiológico de la enfermedad que reporta la SS describe que nuestro país tiene una incidencia de 16.8 casos por cada 100,000 hab. Se detectan 1.6 pacientes masculinos por cada paciente femenino y en más de un 60% de los casos existe otra enfermedad asociada, principalmente DM (20%) y desnutrición (13.15%); el mayor número de casos se reportó en la población de 25 a 44 años de edad y el 9% de los casos de tuberculosis pulmonar se diagnostican en municipios indígenas del país (SS, 2011). En esta descripción basada en datos preliminares del 2010, se observa que la tasa de incidencia de tuberculosis varía entre los diferentes estados de la república en un rango de 3.9/100,000 hab en el estado de Tlaxcala hasta 54.1/100,000hab en el estado de Baja California. Michoacán ocupa el quinto lugar

con menor incidencia de tuberculosis, con 7.7/ 100,000hab. El valor de incidencia del estado de Michoacán lo ubica a la par de países como Suiza (6.6/100,000hab), Eslovaquia (8.5/100,000hab), Países Bajos (6.9/100,000hab) o Finlandia (7.7/100,000hab) (WHO, 2012), todos ellos considerados como países de baja incidencia (Broekmans *et al.*, 2002). Este dato podría hacer pensar que la tuberculosis es una enfermedad controlada en el estado, particularmente si lo comparamos con los datos de los estados de Guerrero, Tamaulipas y Baja California, que reportaron tasas de 29.3, 32.6 y 42.2 casos por cada 100,000hab, respectivamente (SS, 2011). Sin embargo, a la fecha, no existe un perfil epidemiológico detallado del estado que permita evaluar si el comportamiento de la enfermedad también coincide con el de los países que reportan tasas de incidencia similares. Contar con este perfil permitiría orientar las políticas de Salud Pública a nivel municipal, así como los esfuerzos de futuras investigaciones epidemiológicas a nivel regional

Características sociales y geográficas de Michoacán

Michoacán se encuentra en la región centro occidente del país y tiene una gran diversidad climática, aunque en términos generales se puede observar que existen dos grandes zonas: una con clima semicálido a cálido y otra predominantemente templada (Fig. 1.1a; INEGI, 2013). Está dividido en 113 municipios, los cuales se han regionalizado bajo diferentes criterios. El Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), en su reporte más reciente para Michoacán, organiza los 113 municipios en las 10 regiones que se observan en la figura 1.1b (PNUD, 2007)

Michoacán se encuentra en la región centro occidente del país y tiene una gran diversidad climática, aunque en términos generales se puede observar que existen dos grandes zonas: una con clima semicálido a cálido y otra predominantemente templada (Fig. 1.1a; INEGI, 2013). Está dividido en 113 municipios, los cuales se han regionalizado bajo diferentes criterios: la SS ha organizado a los municipios en 8 jurisdicciones sanitarias (JS) para fines operativos de los programas de salud pública y vigilancia epidemiológica (Fig. 1.1c) (SSM, 2008), mientras que el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), en su reporte más reciente para

Michoacán, organiza los 113 municipios las 10 regiones que se observan en la figura 1.1b (PNUD, 2007).

El PNUD también evalúa la calidad de vida de los habitantes de cada región mediante el índice de desarrollo humano (IDH). Éste índice es calculado con base en la esperanza de vida al nacer, nivel de alfabetización de adultos, nivel de escolaridad y producto interno bruto en paridad con el poder adquisitivo. Los valores del índice van de 0 a 1, siendo los valores de 0 a 0.5 correspondientes a un bajo desarrollo humano; de 0.5 a 0.8 a un desarrollo humano medio y los mayores a 0.8 a un desarrollo humano alto (Puri *et al.* 2007).

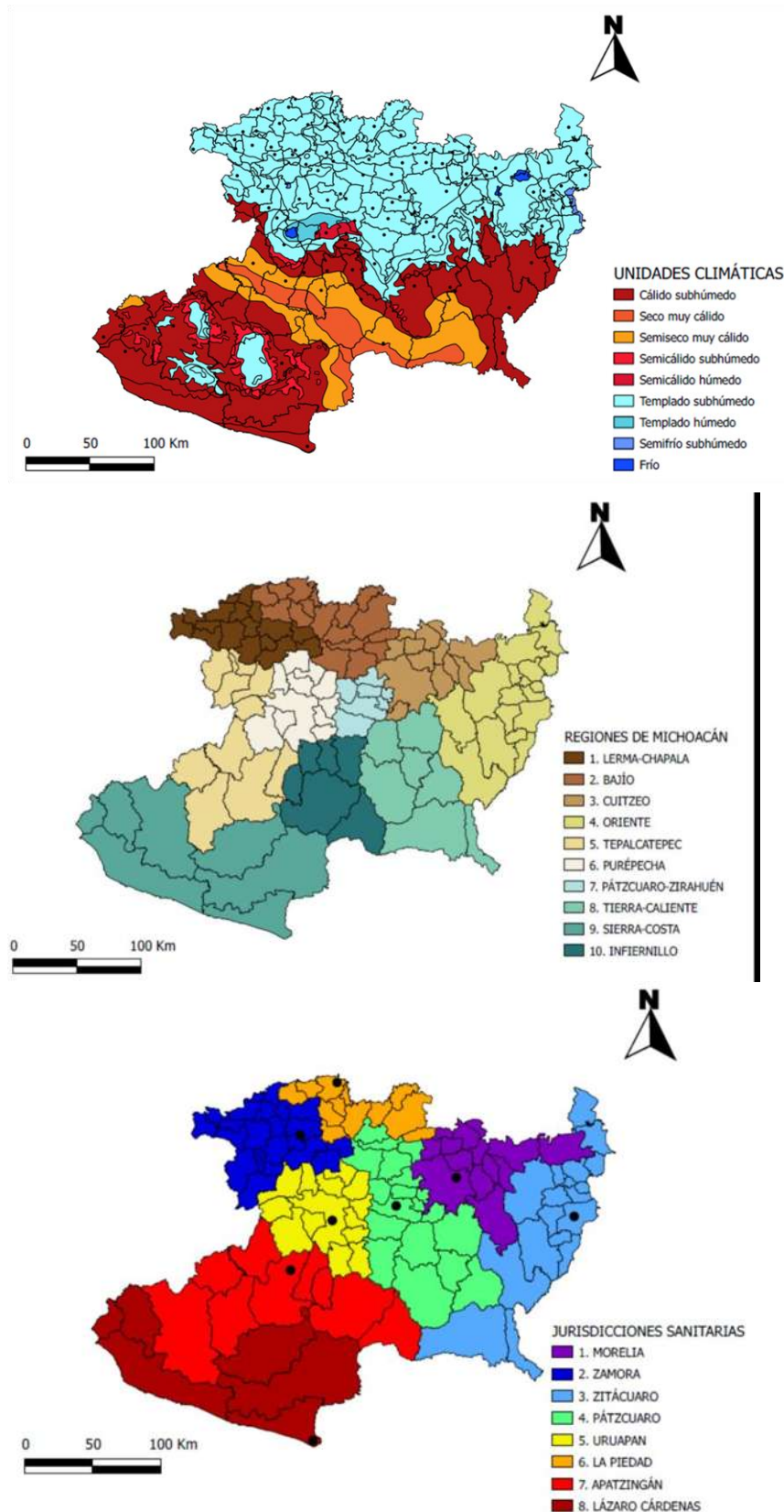


Figura 3. Regiones del estado de Michoacán.

(a) Regiones climáticas (INEGI, 2013).

(b) Regiones socioeconómicas (PNUD, 2007).

(c) Jurisdicciones sanitarias (SSM, 2008).

(●) Ubicación de las oficinas centrales de cada JS.

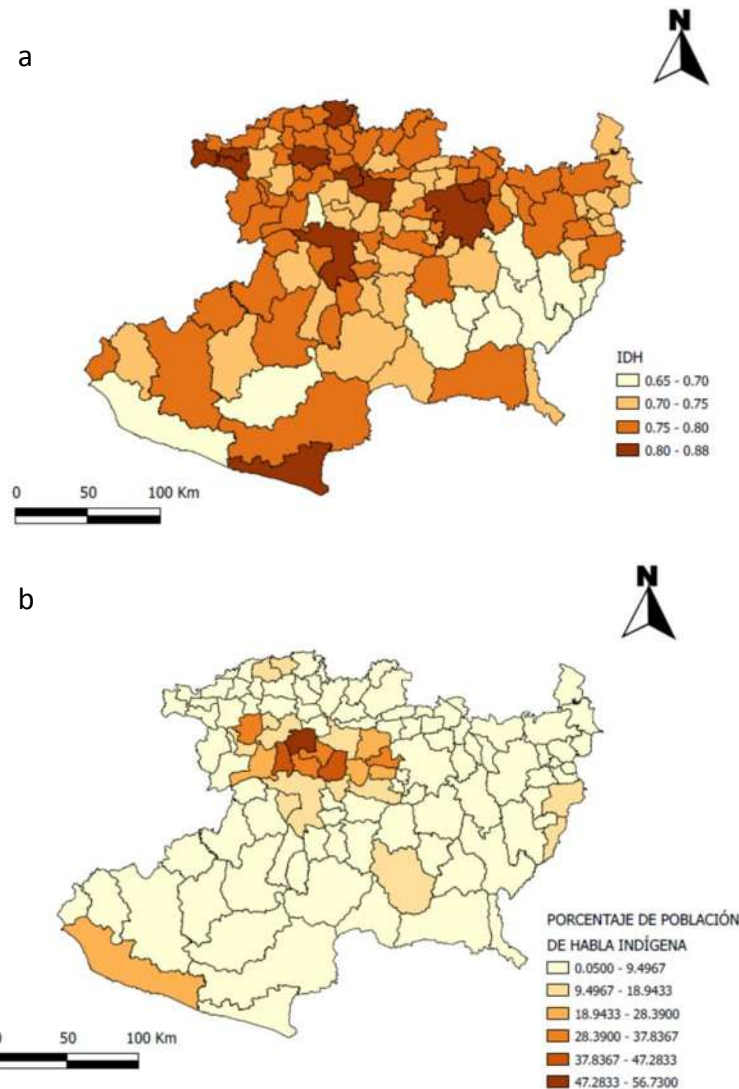


Figura 4. Características sociodemográficas del estado de Michoacán. (a) Índice de desarrollo humano (IDH) municipal (PNUD 2007). (b) Población que habla lengua indígena por municipio (INEGI, 2012)

El PNUD en México ha elaborado reportes municipales para varias entidades del país. El reporte más reciente para Michoacán data del año 2007, con datos del 2005. En dicho reporte se indica que los municipios del estado registran valores heterogéneos, siendo los municipios de menor desarrollo humano pertenecientes principalmente a las zona de Tierra Caliente y Oriente (Fig. 1.1b), aún cuando en su mayoría se encuentran dentro del rango IDH medio (Fig. 1.2a).

Otra característica demográfica importante del estado de Michoacán es su población indígena, compuesta principalmente por hablantes de lengua purépecha (85.7%), náhuatl (3.5%) y mazahua (3.1%). Esta población se concentra en los municipios del centro del estado (Fig. 1.2b), en regiones con IDH promedio de 0.76 y 0.78. A pesar de los valores de IDH, el mismo reporte indica que en cuestiones de salud, hasta el 78% de la población indígena del estado carece de afiliación a servicios médicos públicos (PNUD, 2007).

Las características sociodemográficas del estado pueden afectar el comportamiento de la tuberculosis en Michoacán, ya que éste no necesariamente se ve descrito en el valor de la tasa de incidencia estatal. La elaboración del perfil epidemiológico del estado permitirá la regionalización de los casos de tuberculosis y su asociación con factores sociodemográficos, con lo cual se optimizarían las políticas de vigilancia y erradicación. Por otro lado, estos datos pueden contribuir a orientar el diseño de investigaciones epidemiológicas futuras, en las que se incorporen herramientas genético- moleculares e incluyan la caracterización genética de variantes regionales del agente causal *Mycobacterium tuberculosis*.

HIPÓTESIS

Los casos de tuberculosis están asociados a la población de la tercera edad del estado de Michoacán y a regiones con bajo índice de desarrollo humano.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el comportamiento de la tuberculosis en el estado Michoacán corresponde al valor de incidencia reportado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la fluctuación en los valores de incidencia de tuberculosis durante el periodo de estudio
- Describir la distribución geográfica y poblacional de la tuberculosis a nivel municipal
- Determinar si la distribución geográfica de la enfermedad está relacionada con los factores sociodemográficos.
- Determinar si existen asociaciones entre las variables estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La consulta de datos epidemiológicos se llevó a cabo consultando la base de datos del SINAVE (<http://www.sinave.gob.mx/>), con la colaboración del Laboratorio de Micobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. Se generaron reportes para cada año del programa de vigilancia epidemiológica de tuberculosis en el periodo 2000-2012, con los siguientes criterios de selección: casos nuevos, frecuencia mensual y análisis por residencia del paciente. Las variables consultadas se enlistan en la 1. Se generó un reporte por cada par de variables por cada año.

TABLA 1. Variables consultadas en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica¹

Variable independiente:	Variables dependientes:
Municipio	año ² mes género grupo de edad localización de la enfermedad
Grupo de edad	año localización de la enfermedad

¹Criterio de búsqueda: Casos nuevos

²Los datos anuales se obtuvieron a partir de la sumatoria de los datos mensuales

Los datos de la población general, poblaciones femenina y masculina, grupo de edad y de habla indígena para cada municipio en los años 2000, 2005 y 2010 se obtuvieron a través del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) mediante la consulta interactiva su página web (www.inegi.org.mx) y derivan de los datos censales de los años correspondientes generados por el mismo instituto. Los datos de desarrollo humano y regiones del estado de Michoacán se obtuvieron a partir del Informe sobre Desarrollo Humano Michoacán 2007 (PNUD, 2007).

El análisis descriptivo consistió en el cálculo de las frecuencias, medias y proporciones de las variables de interés. Para los cálculos de la incidencia municipal, se consideró la definición de tasa de incidencia de tuberculosis (I_{TB}) como la totalidad de casos registrados por el SINAVE por cada 100,000 habitantes (hab).

Este dato se calculó para cada municipio para el año 2010, según la siguiente ecuación:

$$I_{TB} = \frac{(\text{Casos registrados})}{(\text{Tamaño de la población})} \times 100,000$$

Si bien, un número importante de municipios tiene menos de 100,000 habitantes, se utilizó este factor para obtener valores comparables con los datos nacionales. Los datos de incidencia se agruparon bajo los siguientes criterios: <10/100,000hab, criterio para baja incidencia de tuberculosis, según el criterio europeo (Broekmans *et al.* 2002); más de 10/100,000hab y menor que la media estatal de cada año (18.7/100,000hab en 2000, 16.8/100,000hab para 2005 y 2010; SS, 2011); mayor que la media estatal y menor a 25/100,000hab, límite superior del rango menor utilizado por la OMS (WHO; 2012); mayor de 25/100,000hab. En 2010 se agrega el segundo rango de incidencia utilizado por la OMS, de 25 a 49/100,000 y uno de 50/100,000 o más

Para el análisis a nivel municipal se consideraron los casos totales por municipio durante el periodo de estudio y se consideró a cada municipio como un caso. Para cada asociación evaluada se exploró la distribución de los datos. Al tener los datos una distribución no normal, se llevó a cabo la prueba *U* de Mann-Whitney (variables con 2 valores posibles) o *H* de Kruskal-Wallis (variables con 3 ó más valores posibles). Para el análisis regional, los municipios se agruparon según los siguientes criterios: la zona climática, las regiones consideradas por el PNUD, municipios por porcentaje de población indígena y las jurisdicciones sanitarias. Las variables dependientes que se compararon entre los grupos fueron las siguientes: tasa de incidencia, proporción de casos por grupos de edad, proporción de casos pulmonares y extrapulmonares y proporción de casos por género.

Dado que los datos se encuentran agrupados en variables categóricas, se utilizó la prueba de Chi cuadrada para determinar si la diferencia en los valores entre dos categorías tenía significancia estadística. Las correlaciones entre las variables cuantitativas se evaluaron mediante la correlación ρ de Spearman para datos no

paramétricos. El procesamiento estadístico se llevó a cabo con ayuda del programa PASW Statistics 18.0.0 (IBM).

Los mapas se generaron con el software Quantum Gis v1.8.0-Lisboa, utilizando capas vectoriales del estado de Michoacán y sus municipios, de las unidades climáticas de México, y de ubicación geográfica de las cabeceras municipales. Todos los archivos vectoriales se obtuvieron de la página web del INEGI (www.inegi.gob.mx).

RESULTADOS

Tendencias municipales

En total, en el estado de Michoacán se diagnosticaron 4307 casos nuevos del 2000 al 2010, con un mínimo de 278, un máximo de 402 (Fig. 1.3) y una media de 325.5 casos nuevos anuales. Para descartar el efecto del crecimiento de la población, se calculó el valor de la tasa de incidencia estatal para los años censales. A pesar de que la población ha aumentado y no así el número total de casos nuevos, no existen diferencias significativas entre los tres valores de incidencia calculados (tabla 2).

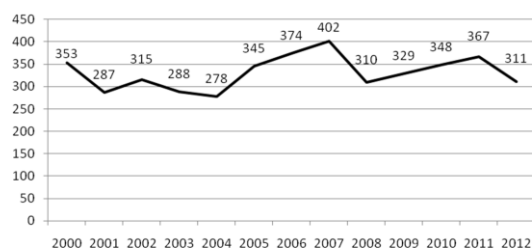


Figura 1.3 Casos anuales de tuberculosis. Casos a nivel estatal de tuberculosis en todas sus formas.

Figura 5. Casos anuales de tuberculosis en el estado de Michoacán. Fuente: SINAVE.

TABLA 2. Comparación de valores de tasa de incidencia anuales
TASA DE INCIDENCIA ESTATAL
CALCULADA^a

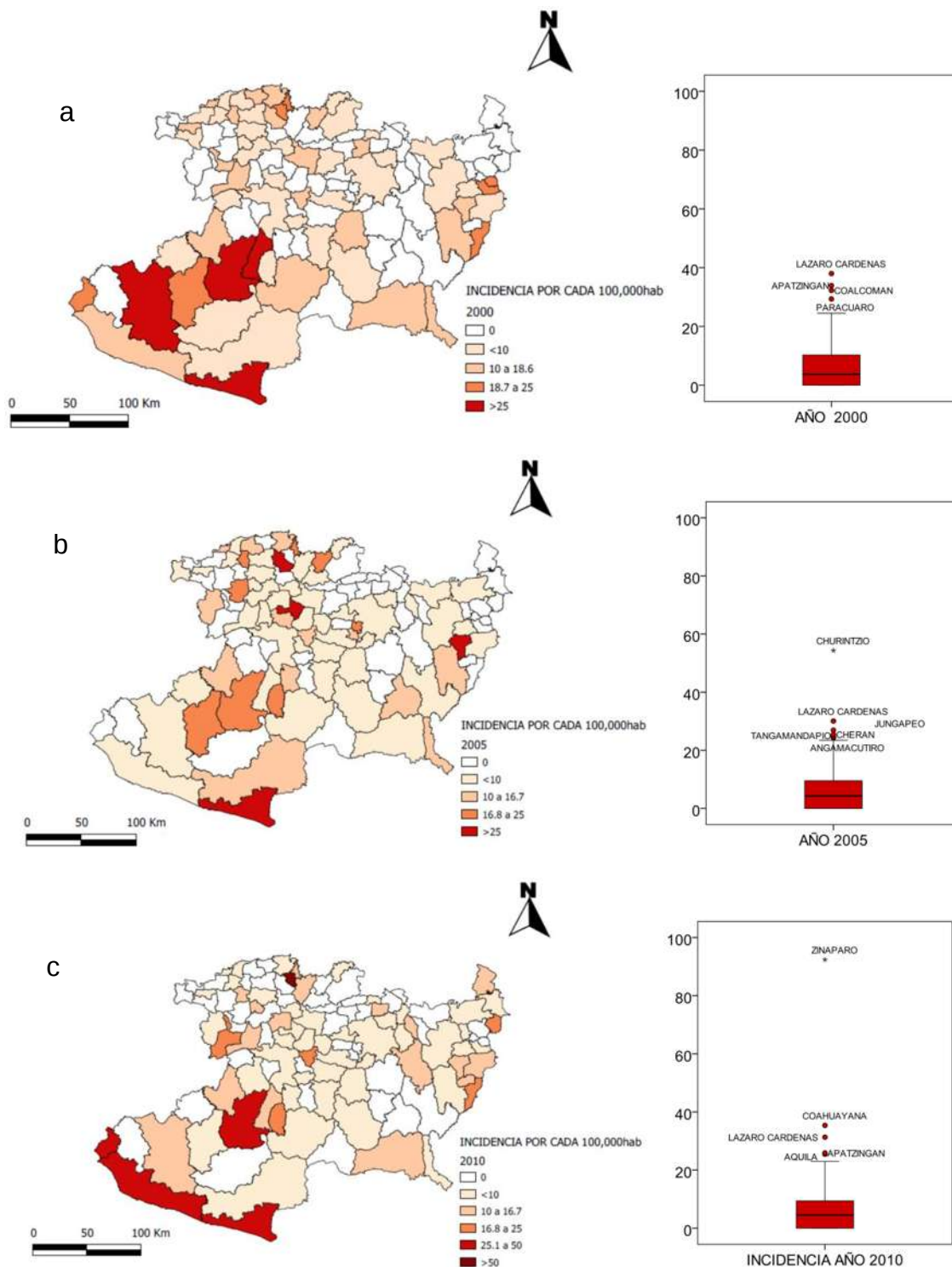
2000	2005	2010	χ^2	p
9.61	8.70	8.00	0.222	0.895

^a A partir de los datos de casos nuevos por mes obtenidos del SINAVE.

Cuando la consulta se hizo por municipio, el total de casos diagnosticados se redujo a 4202, debido a omisiones del personal de vigilancia epidemiológica durante la captura de información. El número de casos nuevos por municipio permitió evaluar la distribución de la enfermedad mediante el cálculo de la incidencia municipal para los años censales 2000, 2005 y 2010. Dicha distribución de los casos puede observarse en la figura 1.4. En los mapas de esta figura se puede observar la dispersión de los datos que subyacen en el valor de baja incidencia para Michoacán. La mayoría de los municipios se encuentran por debajo de dicha media, e incluso cumplen con el criterio europeo para las regiones de baja incidencia de tuberculosis ($I < 10/100,000\text{hab}$). Sin embargo, existen también municipios con valores superiores a los $25/100,000\text{hab}$. Solamente los municipios de Lázaro Cárdenas y Apatzingán aparecen consistentemente en el rango más alto de incidencia.

Relación entre incidencia y variables sociodemográficas

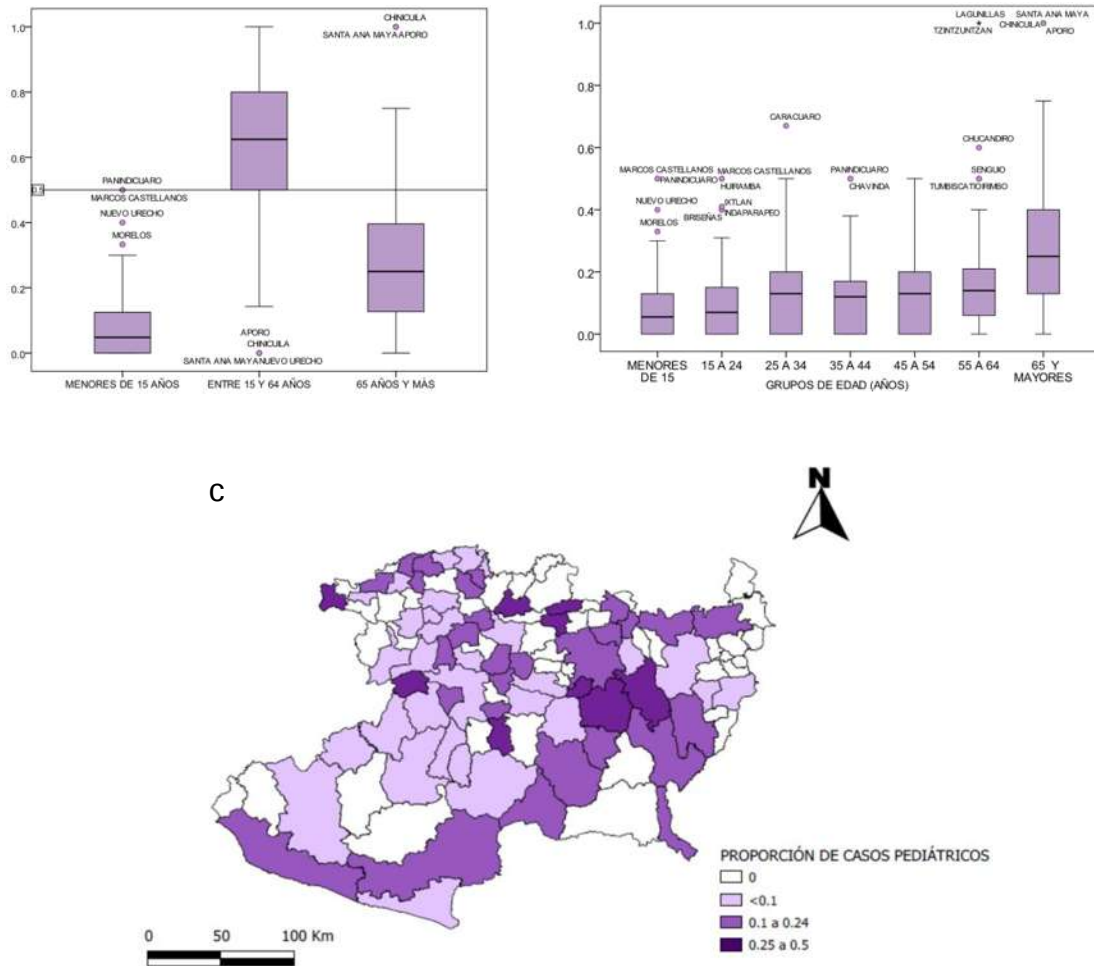
a) Calidad de vida. La incidencia municipal podría estar influenciada por la calidad de vida de los habitantes; sin embargo, aunque existe una correlación débil entre los valores de IDH e incidencia municipal del año 2000 ($\rho=0.231$, $p=0.014$), ésta no se conserva en el año 2005 ($\rho=0.160$, $p=0.091$). No hubo correlación entre la tasa de incidencia y el porcentaje de población indígena (2000: $\rho=0.109$, $p=0.250$; 2005: $\rho=0.182$, $p=0.054$; $\rho=0.116$, $p=0.220$)



◀ **Figura 6. Tasa de incidencia municipal por cada 100,000hab.** Basada en datos censales del INEGI y casos de nuevos registrados en el SINAVE por municipio en los años 2000 (a), 2005 (b) y 2010 (c). Ver la sección de Materiales y métodos, para información sobre la asignación de rangos. Los diagramas de cajas muestran la dispersión de los datos para el año correspondiente.

b) Grupo de edad. La SS reporta los casos dentro de grupos quinquenales de edad. Sin embargo, en sus reportes la OMS divide a la población en tres grupos etarios: la población pediátrica (menores de 15 años), la población económicamente activa (de 15 a 64 años) y los adultos mayores (de 65 años y más) (WHO, 2012). Para determinar qué grupo etario de la población era más afectado por la tuberculosis, se hizo la agrupación de datos con este último criterio y se calculó la proporción que representaba cada grupo de edad del total de casos municipales. Esto permitió comparar la estructura de la población afectada por tuberculosis entre los 113 municipios, independientemente del tamaño de la población y del número de casos registrados (Fig. 1.5).

Como se puede observar en los diagramas de cajas, más del 50% de los casos ocurre entre la población de 15 a 64 años en más de la mitad de los municipios (Fig. 1.5a). La diferencia en la distribución de los casos entre los tres grupos de edad es significativa ($\chi^2=146.897$, $p=0.000$). Al separar los datos de la población económicamente activa en grupos decenales, se observó que la distribución es semejante entre todos ellos, pero varía significativamente con el grupo pediátrico y el grupo de mayores de 65 años ($\chi^2=101.838$, $p=0.000$). La distribución de los casos de tuberculosis en cada grupo de edad no tiene correlación con el IDH o el porcentaje de población de habla indígena de cada municipio (tabla 3). En general, tampoco hay correlación entre dicha distribución y la tasa de incidencia municipal, excepto para el grupo de pacientes entre 15 y 64 años y la tasa de incidencia del año 2010.

Figura 7. Distribución de los casos por grupo de edad. Fuente: SINAVE. (a) Diagramas

de caja que muestra la proporción de casos que representa cada grupo de edad. (b) Diagramas de caja con la población económicamente activa separada en grupos decenales. (c) Proporción de casos pediátricos en cada municipio.

TABLA 3. Correlación entre grupos de edad y variables demográficas*

		TASA DE INCIDENCIA			IDH		POBLACIÓN INDÍGENA		
		2000	2005	2010	2000	2005	2000	2005	2010
MENORES DE 15 AÑOS	ρ	-0.028	0.127	-0.070	-0.028	-0.011	0.025	0.071	0.093
ENTRE 15 Y 64 AÑOS	ρ	0.768	0.179	0.460	0.771	0.907	0.789	0.456	0.327
MAYORES DE 65 AÑOS	ρ	0.100	0.177	0.302**	0.039	0.086	0.118	0.134	0.077
	ρ	0.293	0.061	0.001	0.682	0.362	0.215	0.157	0.415
65 AÑOS Y MAYORES	ρ	-0.003	-0.173	-0.162	-0.067	-0.090	-0.113	-0.141	-0.076
	ρ	0.977	0.066	0.087	0.478	0.344	0.232	0.135	0.423

* Correlación de Spearman para datos no paramétricos

** Correlación significativa a nivel de $p=0.001$

c) Tipo de tuberculosis. La mayoría de los pacientes que desarrollan tuberculosis activa presentan un cuadro pulmonar. Sin embargo, si la contención de la infección por el sistema inmune falla, el bacilo puede primero extenderse vía hematógena y posteriormente por vía linfática, infectando a otros órganos y causando varios cuadros extrapulmonares. En el estado de Michoacán, la proporción de TBE ha aumentado gradualmente hasta alcanzar el 22.5% de los casos registrados en el 2012 (Fig. 1.6a). La proporción de casos extrapulmonares por municipio puede observarse en la figura 1.6b. Al separar los casos de tuberculosis según su localización en el huésped, se encontró que aquellos municipios de menor IDH tienen mayor proporción de casos pulmonares, mientras que aquellos con mayor IDH presentan una mayor proporción de casos extrapulmonares (Tabla 4). El resto de las variables estudiadas no mostraron correlación con la proporción de casos según su localización a nivel municipal, incluyendo los grupos de edad. Esto a pesar de que a nivel estatal, los casos extrapulmonares son más frecuentes entre los pacientes pediátricos (tabla 1.5).

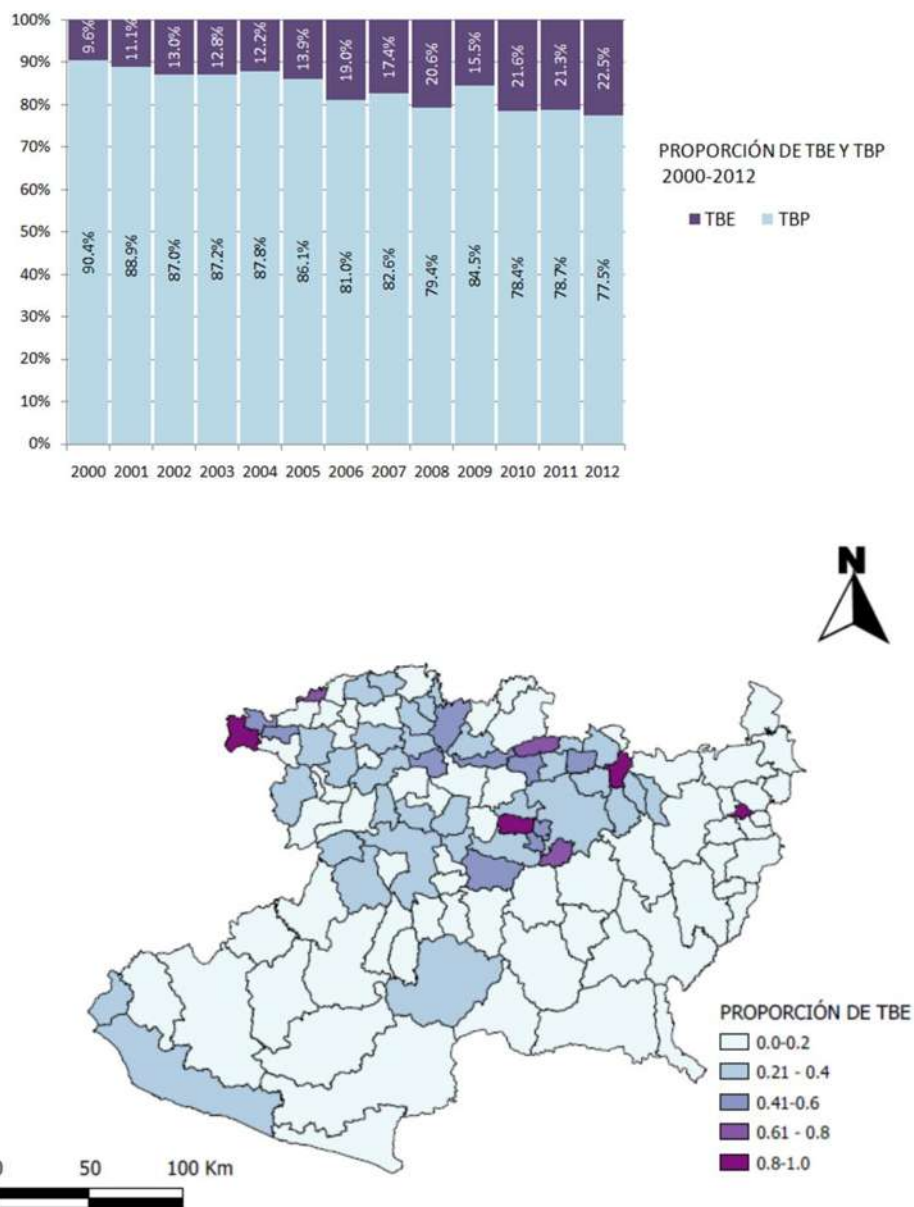


Figura 8. Proporción de los casos pulmonares (TBP) y extrapulmonares (TBE). Basada en datos de casos de nuevos registros en el SINAVE por localización de la enfermedad y por municipio de los años 2000 a 2012. (a) Proporción de TBP y TBE a nivel estatal cada año en el periodo de estudio. (b) Proporción de casos de TBP y TBE totales en cada municipio

TABLA 4
Correlación entre la localización de la enfermedad y variables demográficas*

	TASA DE INCIDENCIA			IDH		POBLACIÓN INDÍGENA			MENORES	DE 15 A	65 AÑOS
	2000	2005	2010	2000	2005	2000	2005	2010	DE 15 AÑOS	64 AÑOS	Y MAYORES
TBP [†] ρ	0.162	-0.047	0.153	-0.302**	-0.290**	0.062	0.054	0.005	-0.155	-0.034	0.177
p	0.086	0.623	0.105	0.001	0.002	0.513	0.571	0.960	0.102	0.718	0.061
TBE [‡] ρ	-0.162	0.047	-0.153	0.302**	0.290**	-0.062	-0.054	-0.005	0.155	0.034	-0.177
p	0.086	0.623	0.105	0.001	0.002	0.513	0.571	0.960	0.102	0.718	0.061

* Correlación de Spearman para datos no paramétricos

** Correlación significativa a nivel de $p=0.001$

[†] Proporción de casos de tuberculosis pulmonar

[‡] Proporción de casos de tuberculosis extrapulmonar

TABLA 5.
Casos de TBP[†] y TBE[‡] por grupo de edad

GRUPO DE EDAD	TBP Casos (%)	TBE Casos (%)
MENORES DE 15 AÑOS	150 (56.8)	114 (43.2)
DE 15 A 65 AÑOS	2690 (84.4)	499 (15.6)
65 AÑOS Y MAYORES	762 (89.2)	92 (10.8)

[†] Proporción de casos de tuberculosis pulmonar

[‡] Proporción de casos de tuberculosis extrapulmonar

d) Género. En Michoacán la proporción de casos por género, expresada en incidencia de casos masculinos entre la incidencia de casos femeninos (M/F), fue de 1.3. La distribución de los casos por género en los 113 municipios se muestra en la figura 1.7a. No existe una correlación entre la proporción M/F y el IDH en el año 2000 ($\rho=0.161$, $p=0.089$) o 2005 ($\rho=0.156$, $p=0.100$), ni entre dicha proporción y los valores de incidencia municipal del año 2000 ($\rho=0.168$, $p=0.075$) o 2005 ($\rho=-0.006$, $p=0.948$) o 2010 ($\rho=0.043$, $p=0.652$). Tampoco existe una correlación entre la proporción M/F y el porcentaje de población de habla indígena en cada municipio (2000: $\rho=-0.179$, $p=0.057$; 2005: $\rho=-0.152$, $p=0.109$; 2010: $\rho=0.074$, $p=0.436$).

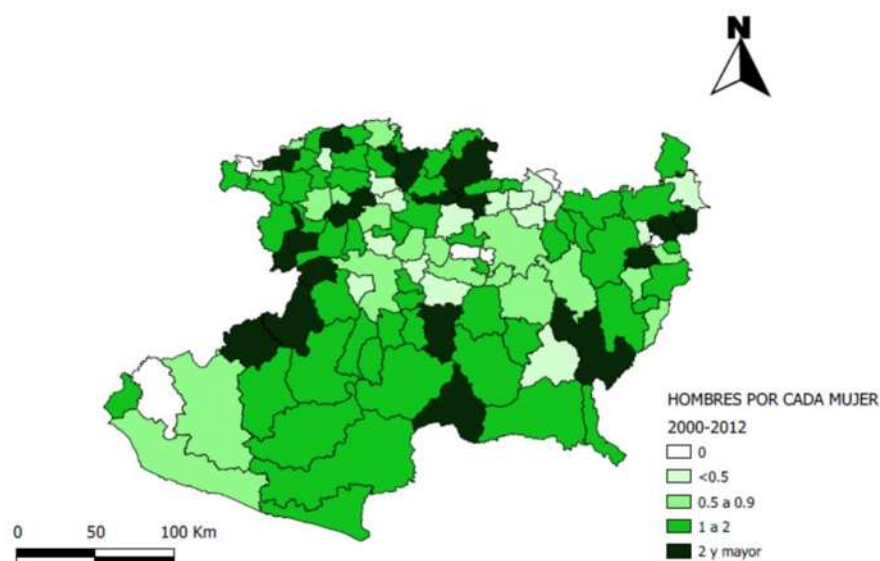


Figura 9. Proporción municipal de hombres por cada mujer diagnosticada con tuberculosis

e) Enfermedades asociadas. Durante el periodo de estudio un importante porcentaje de los casos anuales registraron la ausencia de enfermedades asociadas (rango: 29.9% - 65.5%). Este porcentaje disminuyó a partir de 2006 (Fig. 1.8), probablemente debido al mejor diagnóstico de dichas enfermedades entre los pacientes de tuberculosis. Esto se confirmó con la disminución de los casos en los que se ignoraba si existía alguna otro padecimiento preexistente. La enfermedad asociada más frecuente en todos los años fue la Diabetes Mellitus. Sin embargo, no se encontró correlación entre el porcentaje de casos asociados a esta enfermedad y la incidencia a nivel municipal ($\rho=0.148$, $p=0.116$). Antes de 2007 la coinfección con VIH ocurría en menos del 3% de los casos; este porcentaje se incrementó hasta un máximo de 17.6%, alcanzado en 2012. Se encontró que existe una correlación entre los casos de coinfección de VIH y los valores de incidencia municipales ($\rho=0.272$, $p=0.004$).

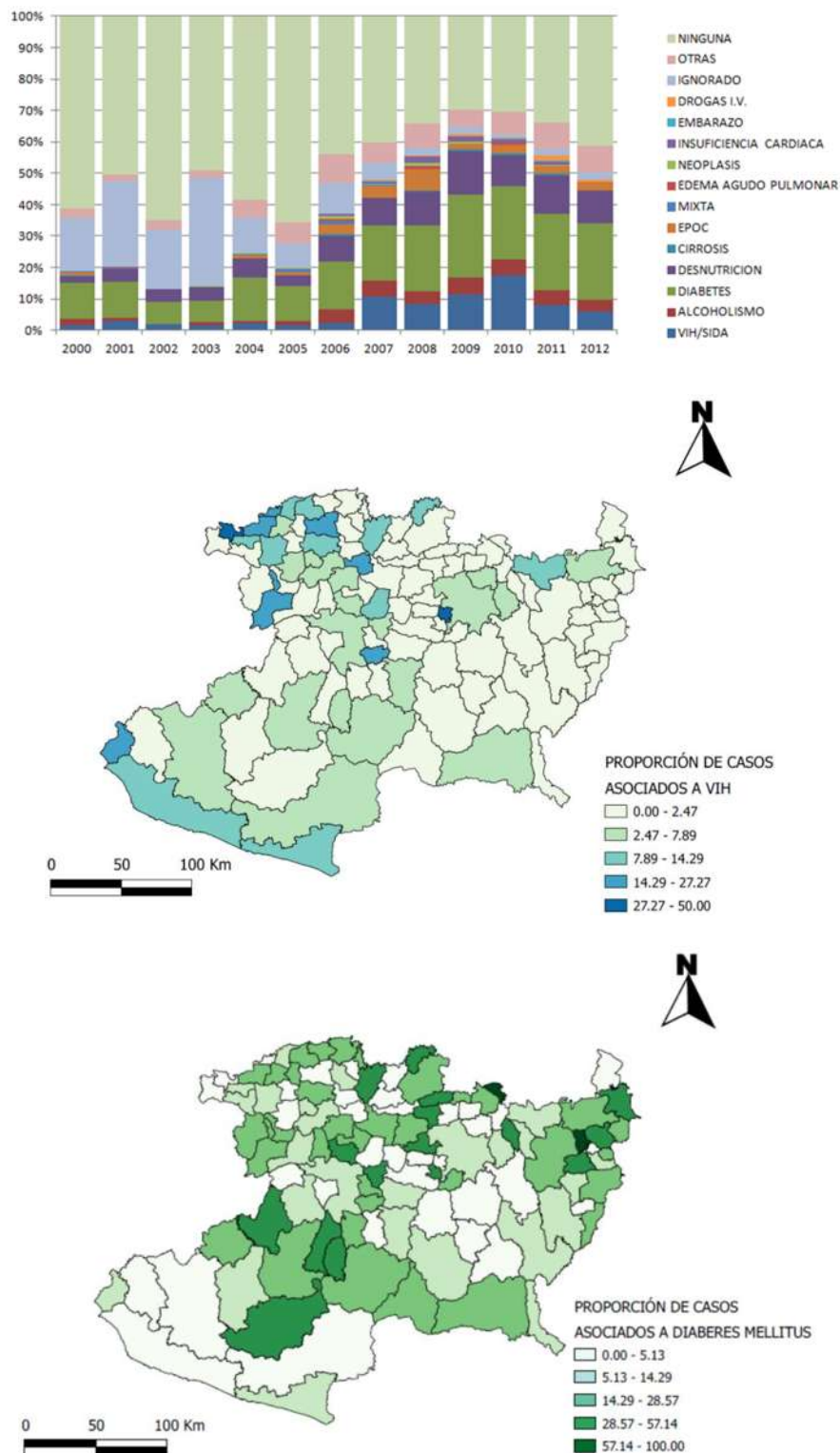


Figura. 10. Enfermedades asociadas a casos de tuberculosis . (a) Proporción de casos de tuberculosis asociados a diferentes enfermedades a nivel estatal, por año, durante el periodo de estudio. (b) Proporción de casos asociados a VIH a nivel municipal. (c) Proporción de casos asociados a Diabetes Mellitus a nivel municipal.

Esta relación puede observarse gráficamente en la figura 1.8b: los municipios costeros, indicados como de alta incidencia (ver fig. 1.4), presentan mayor porcentaje de casos asociados a VIH que otros municipios

Tendencias regionales

Dado que a escala municipal no fue posible encontrar relaciones entre el comportamiento de la tuberculosis y factores sociodemográficos, se hicieron comparaciones entre grupos de municipios para determinar si existían tendencias regionales. Los resultados se muestran en la tabla 6. Al analizar la distribución entre los municipios agrupándolos por porcentaje de población indígena, no se observó ninguna diferencia significativa. Este dato sugiere que las poblaciones indígenas no están más ni menos expuestas a contraer tuberculosis que la población mestiza.

a) Regiones climáticas. Se observó que los municipios de las zonas cálidas presentaron valores de incidencia significativamente más altos que las zonas templadas durante 2000 ($M_{eCÁLIDA}=8.94$, $M_{eTEMPLADA}=1.28$, $z=-2.077$) y 2005 ($M_{eCÁLIDA}=8.18$, $M_{eTEMPLADA}=3.30$, $z=-2.077$), patrón que parece desaparecer para el 2010 ($M_{eCÁLIDA}=5.78$, $M_{eTEMPLADA}=3.91$; $z=-1.285$). Los casos extrapulmonares fueron más frecuentes entre los municipios de la zona templada ($M_{eCÁLIDA}=0.09$, $M_{eTEMPLADA}=2.22$, $z=-3.63$).

TABLA 6. Comparación de la distribución de casos por regiones

		ZONAS CLIMÁTICAS ^{†1} <i>U (p)</i>	REGIÓN ^{‡2} $\chi^2 (p)$	POBLACIONES INDÍGENAS ³ $\chi^2 (p)$	JS ⁴ $\chi^2 (p)$
INCIDENCIA	2000	828.00 (0.012)*	23.44 (0.005)**	7.67 (0.175)	26.63 (0.000)**
	2005	888.50 (0.038)*	9.58 (0.386)	7.02 (0.220)	11.41 (0.122)
	2010	1003.00 (0.199)	13.70 (0.133)	2.90 (0.716)	15.15 (0.034)**
EDAD	MENORES DE 15 AÑOS	1031.50 (0.275)	8.57 (0.478)	6.17 (0.290)	8.44 (0.296)
	DE 15 A 64 AÑOS	1144.00 (0.759)	14.84 (0.096)	5.86 (0.320)	8.70 (0.275)
	65 AÑOS Y MAYORES	1159.00 (0.836)	16.70 (0.054)	3.47 (0.627)	14.85 (0.038)**
LOCALIZACIÓN	TBP ⁵	646.00 (0.000)*	42.61 (0.000)**	1.70 (0.889)	31.61 (0.000)**
	TBE ⁶	646.00 (0.000)*	42.61 (0.000)**	1.70 (0.889)	31.61 (0.000)**
GÉNERO	M/F ⁷	944.50 (0.102)	32.24 (0.000)**	5.02 (0.413)	14.79 (0.039)**
ENFERMEDADES	DIABETES MELLITUS	1181.00 (0.952)	13.71 (0.133)	5.67 (0.339)	9.36 (0.228)
ASOCIADAS	VIH/SIDA	1173.50 (0.901)	25.20 (0.003)**	1.43 (0.921)	27.48 (0.000)**

*Diferencia significativa entre los dos grupos comparados

**Diferencia significativa entre medianas de al menos dos de grupos comparados

[†]Prueba de Mann-Whitney

[‡]Prueba de Kruskal-Wallis

¹2 zonas

²10 regiones según criterio de PNUD

³6 regiones

⁴8 jurisdicciones sanitarias

⁵Proporción de casos pulmonares

⁶Proporción de casos extrapulmonares

b) Regiones PNUD. Al evaluar los municipios agrupados por las regiones referidas por PNUD, se encontró que dichas regiones presentaban diferencia sólo en el año 2000 y no en el 2005 y 2010. Las comparaciones pareadas permitieron identificar que los municipios con mayor incidencia pertenecen a las regiones de Tepalcatepec y Sierra-Costa, siendo sus medianas significativamente mayores a las del resto; ambas regiones forman parte de la zona cálida del estado. Tanto los casos extrapulmonares como la proporción M/F se distribuyeron de manera desigual entre las 10 regiones. Mediante comparaciones pareadas, se encontró que los municipios con mayor proporción de casos extrapulmonares se encuentran en las regiones Lerma-Chapala, Bajío, Cuitzeo y Pátzcuaro-Zirahuén. Por el contrario, en las regiones Oriente, Tepalcatepec, Tierra Caliente, Sierra Costa e Infiernillo se encontraron los municipios con mayor proporción de casos pulmonares. En cuanto a la proporción M/F, las regiones con registros más altos fueron la del Bajío, Tepalcatepec e Infiernillo.

c) Jurisdicciones sanitarias. Finalmente, se observó que sí hubo diferencias significativas en los valores de incidencia de por lo menos dos JS, excepto en el año 2005. Las comparaciones pareadas mostraron que en el año 2000 las regiones con mayor incidencia correspondieron a las jurisdicciones de La Piedad, Apatzingán y Lázaro Cárdenas. En el año 2010, las jurisdicciones que agrupaban a los municipios con mayores tasas de incidencia fueron Zitácuaro y Apatzingán. La distribución de los casos por grupo de edad en cada jurisdicción fue significativamente diferente sólo para el grupo de mayores de 65 años; los municipios con más casos entre la población mayor de 65 años pertenecen a la jurisdicción de Zitácuaro, mientras que los municipios en los que este grupo etario fue menos afectado se encuentran en las jurisdicciones de La Piedad, Pátzcuaro, Apatzingán y Lázaro Cárdenas. Los casos extrapulmonares fueron significativamente menos frecuentes entre los municipios de las jurisdicciones de Zitácuaro, Lázaro Cárdenas y Apatzingán, mientras que en las jurisdicciones de Morelia, Zamora, Pátzcuaro y La Piedad se ubicaron municipios con proporciones atípicamente altas de este tipo de tuberculosis. La distribución de los casos por género difirió significativamente entre los municipios de las jurisdicciones sanitarias. Los municipios con mayor proporción de casos entre los varones se ubicaron en las jurisdicciones de La Piedad y Apatzingán. Las medianas de la proporción M/F del resto de las jurisdicciones presentaron valores cercanos a 1.

DISCUSIÓN

En el estado de Michoacán no existe una diferencia significativa entre los valores de incidencia registrados para los años 2000, 2005 y 2010 (tabla 2), sin embargo se observó que los casos no se distribuyen geográficamente de manera constante (Fig. 1.4). Esta observación se refuerza por el hecho de que la asociación que existía en 2000 de los valores de alta incidencia con las regiones estatales del PNUD, se perdió en 2005 y 2010. En el año 2000 las regiones que contenían a los municipios con mayor tasa de incidencia fueron Tepalcatepec (IDH=0.7763; PNUD 2007) y Sierra-Costa (IDH=0.8027 (PNUD, 2007)). Esta última fue la segunda región con mejor IDH en 2005. Al revisar los datos municipales en estas dos regiones se observó que dos municipios mantienen de manera constante altos valores de incidencia: Lázaro Cárdenas y Apatzingán. Éstos constituyen un importante foco de atención, ya que no han logrado reducir los niveles de incidencia por debajo de 25/100,000 hab y los mecanismos que influyen para mantener estos valores no son claros. Ambos municipios tienen valores de IDH que se encuentran entre los más altos del estado. Así, en estos municipios la relación incidencia-IDH es sorpresiva, ya que los altos valores de incidencia de tuberculosis suelen estar relacionados con la pobreza e inequidad (Cantwell *et al.* 1997; Biggs *et al.*, 2010). A nivel global se ha demostrado que la incidencia de tuberculosis se reduce más rápidamente entre los países con un alto IDH (Dye *et al.* 2009). En nuestro entorno, también se ha reportado la asociación de la tuberculosis con la pobreza: más de la mitad de los casos del estado de San Luis Potosí provienen de zonas con altos índices de marginación (López-Rocha *et al.*, 2013).

La aparición intermitente de valores de muy alta incidencia (>25/100,000 hab) en otros municipios de las regiones Lerma-Chapala, Bajío y Oriente parece no obedecer a algún patrón, particularmente en los municipios de menor población, en los que la aparición de pocos casos impacta considerablemente los datos de incidencia municipal. Ejemplo de esto es el municipio de Zináparo, con poco más 3,000 hab, que aparece con alta incidencia en el 2000, sin casos en 2005 y con una incidencia atípica de más de 50/100,000 hab en 2010 (Fig. 1.4c). Los aumentos súbitos en los

valores de incidencia de una región suelen encontrarse mediante búsquedas intencionadas en las que se incrementa el número de pacientes detectados por los servicios de salud (Dye *et al.*, 2009). El hecho de que los aumentos no se mantengan en años sucesivos sugiere que dichas búsquedas intencionadas son puntuales y no un programa permanente, como ocurre en las investigaciones de contactos de pacientes previamente diagnosticados. El aumento súbito de incidencia entre municipios de la región de Oriente, una de las regiones con más bajo IDH en el estado (0.7453, 8º lugar estatal; PNUD, 2007), sugiere que en esta zona existe un subregistro de casos.

Transición epidemiológica en términos de grupos de edad

La distribución de la tuberculosis por grupos de edad está en relación con la incidencia, según se ha reportado ampliamente en otros países. En los países de baja incidencia, el perfil epidemiológico de la tuberculosis tiene un componente migratorio muy importante. Los inmigrantes suelen provenir de regiones de bajo desarrollo con altas tasas de incidencia tuberculosis. Los estudios recientes llevados a cabo en estos países tienden a separar los resultados de los pacientes nativos de los pacientes migrantes que provienen de zonas con alta incidencia de tuberculosis. Así, por ejemplo, la población migrante afectada suele tener una media de edad por arriba de los 50 años, mientras que los pacientes nativos presentan una media de alrededor de los 30 años (Laifer *et al.*, 2007; Odone *et al.*, 2011; Peerek *et al.*, 2011; Kamper-Jørgensen *et al.*, 2012). Las poblaciones de migrantes afectados por tuberculosis reflejan el comportamiento de la enfermedad en los países de alta incidencia, donde la mayoría de los casos ocurren entre los adultos jóvenes (Tessema *et al.* 2013; Reis-Santos *et al.* 2013; Rosales *et al.* 2010).

En Michoacán la mayoría de los casos se concentran en la población con un rango de edad de 15 a 64 años (Fig. 1.6a). Cuando se separó este grupo en subgrupos decenales, se observó que la distribución fue homogénea entre ellos, siendo significativamente mayor la proporción de casos en el grupo de mayores de 65 años (Fig. 1.7b). Esta distribución es distinta de la observada a nivel nacional, en la que existe un claro aumento de casos entre los 25 y 45 años (SS, 2011). En los estados

de alta incidencia del país, los casos de tuberculosis se concentran en grupos de mediana edad, pero no de manera homogénea, como es nuestro caso. En los estados con mayor incidencia del país como Nuevo León y Guerrero, las edades más frecuentes oscilan entre los 20 y 40 años (Molina-Torres *et al.*, 2010; Nava-Aguilera *et al.*, 2011). Chiapas (25.2/100,000 hab) y San Luis Potosí (15.8/100,000 hab) reportan más casos entre la población de entre 36 y 55 años (Sánchez-Pérez *et al.*, 2010; López-Rocha *et al.*, 2013). Se debe considerar que los datos reportados en estos estudios corresponden a una muestra de la población y no a la totalidad de los registros estatales. Sin embargo, es posible observar que la distribución de los casos en el estado no corresponde completamente con las regiones de alta o baja incidencia, sino que indica una transición epidemiológica, en la que la población de la tercera edad comienza a predominar, pero en la que no se han logrado abatir los casos entre la población joven, que usualmente provienen de eventos de transmisión reciente.

Un indicador de que la transmisión reciente no se ha abatido a los niveles correspondientes de una zona de baja incidencia son los casos de tuberculosis pediátrica, dado que en su mayoría los niños presentan síntomas de 6 a 12 meses después de la exposición primaria (Marais *et al.*, 2004). En los países de baja incidencia los casos entre menores de 15 años constituyen hasta un 5% de todos sus casos anuales, mientras que en los de alta incidencia, el porcentaje sube hasta en un 20% (Nelson y Wells, 2004). En el estado, la tuberculosis pediátrica puede ser hasta del 50% de los casos en algunos municipios (Fig. 1.6). Es notable el hecho de que no exista correlación entre los valores de incidencia, el IDH y la proporción de casos pediátricos, pues se esperaría que los municipios con mayor incidencia de tuberculosis y menor desarrollo humano registraran más casos entre los menores. La falta de correlación sugiere que entre los municipios de baja incidencia existen algunos con altos porcentajes de casos pediátricos, lo que reflejaría un sub-registro de casos en dichos municipios. Este problema no parece estar circunscrito a las regiones marcadas por el PNUD, puesto que la distribución entre ellas es semejante (Tabla 6).

Distribución de la tuberculosis extrapulmonar en el estado

Uno de los aspectos evaluados en este trabajo fue la distribución de los casos extrapulmonares. La tuberculosis extrapulmonar ocurre cuando durante la diseminación hematógena del bacilo, éste se aloja en cualquier órgano del huésped. Dado que la oxigenación en la mayoría de los tejidos es subóptima para el bacilo, el desarrollo de la enfermedad extrapulmonar es lento e insidioso (Kristki y Fiuza de Melo, 2007). Solo de un 10% a un 20% de los pacientes inmunocompetentes que desarrollan la enfermedad activa presentan un cuadro extrapulmonar, mientras que el porcentaje se eleva al 60% entre los pacientes inmunocomprometidos (Fanlo y Tiberio, 2007).

En nuestro estado, la concentración de casos extrapulmonares entre la población menor a 65 años (tabla 5) coincide con las estadísticas previamente reportadas en otras regiones (Ducomble *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013). A nivel estatal la proporción de casos extrapulmonares ha ido en aumento desde el año 2000 (Fig. 1.6). Este aumento podría reflejar el descenso en el número de casos pulmonares, como se ha reportado en la Unión Europea (Sandgren *et al.*, 2013). Sin embargo, mientras la proporción de casos extrapulmonares ha aumentado más del doble en el periodo de estudio, los niveles de incidencia no han disminuido significativamente. A nivel municipal se observó que los municipios con mayor proporción de casos extrapulmonares se concentran al norte del estado, en las regiones Lerma-Chapala, Bajío, Cuitzeo, Pátzcuaro-Zirahuén. Estas regiones corresponden con zonas que presentan una prevalecía mayor al 0.5% de tuberculosis bovina, causada por *M. bovis* (SAGARPA, 2012). La tuberculosis bovina puede transmitirse a los humanos por contacto directo con los animales enfermos, lo que se conoce como tuberculosis zoonótica. La aparición de este tipo de tuberculosis puede explicar parte del aumento de la proporción de casos extrapulmonares, ya que *M. bovis* tiene mayor propensión a diseminarse en el organismo (Majoor *et al.* 2011; Hlavsa *et al.* 2008). En algunos países latinoamericanos se ha reportado que *M. bovis* es responsable del 1 al 2.5% de los casos de TB humana; sin embargo, se considera que estos datos subestiman el problema, ya que no existen programas permanentes de búsquedas intencionada

de casos zoonóticos (Kantor *et al.*, 2008). Se ha documentado la presencia de *M. bovis* en pacientes con tuberculosis pulmonar del estado de Michoacán (Vázquez-Marrufo *et al.*, 2008), en uno de 46 aislados analizados (2.1%). El hecho de que en una muestra tan pequeña se encuentre a *M. bovis* sugiere que dicho patógeno puede representar un porcentaje importante de casos en la entidad. En otros estados se ha reportado el aislamiento de *M. bovis* en 13.8% de los pacientes estudiados en Querétaro (Pérez-Guerrero *et al.*, 2008), y en 28% de los pacientes estudiados en Jalisco (Portillo-Gómez y Sosa-Iglesia, 2011). Ambos estados colindan con las regiones en las que se concentran los casos extrapulmonares. Lamentablemente, dado que el cultivo e identificación del agente causal no es un procedimiento de rutina, no se cuentan con datos para determinar si efectivamente, *M. bovis* tiene o no un papel relevante en los casos extrapulmonares reportados en el norte del estado.

Tuberculosis y género

La proporción de casos por género en el estado indica poca disparidad. Solo algunos municipios presentan grandes desigualdades. Aquellos en los que predominan los casos femeninos se agrupan en las regiones del Bajío, Tepalcatepec e Infiernillo. La región Bajío también tiene mayor proporción de casos extrapulmonares. La predominancia del género femenino entre los casos de tuberculosis extrapulmonar ha sido reportada previamente (Hlavsa *et al.* 2008; Majoor *et al.* 2011; Sandgren *et al.* 2013). Otros factores a los que se atribuye la desigualdad de la afectación por género son las disparidades en el riesgo laboral, en la propensión a la búsqueda de atención médica y en el acceso que se tiene a ella (Allotey y Gyapong, 2008). Las diferencias de género también se han atribuido a factores biológicos como las hormonas esteroideas, haciendo notar que las mujeres en edad reproductiva son más propensas a desarrollar la enfermedad activa que aquellas que ya han pasado por esa etapa (Neyrolles y Quintana-Murci, 2009). Los datos recopilados en este trabajo no permiten identificar las razones de las diferencias de género entre los municipios con proporción M/F extrema.

Enfermedades asociadas a los casos de tuberculosis

La coinfección de *M. tuberculosis* y VIH ha sido el centro de atención a nivel global ya que la pandemia de SIDA fue la causa del aumento de casos de tuberculosis durante la última parte del siglo XX. Actualmente los países con mayor prevalencia de VIH son también los que tienen una mayor prevalencia de tuberculosis (Palmero, 2007; WHO, 2013).

En nuestro país, la comorbilidad encontrada con mayor frecuencia es la Diabetes Mellitus (20.1% de los casos), seguida por la desnutrición (13.1%), VIH/SIDA (5.8%) y alcoholismo (5.7%) (SS, 2010). Estos datos concuerdan con lo encontrado en nuestro estado (ver fig. 1.8a). Que un municipio presente una mayor proporción de casos asociados a Diabetes Mellitus no necesariamente correlaciona con la incidencia local de tuberculosis. Esta falta de correlación puede deberse a la carencia de un registro exacto de la comorbilidad presente en pacientes de tuberculosis (Kv et al. 2013); ya que la asociación entre ambas enfermedades ha sido observada en México (Ponce de León, 2004) y en el resto el mundo (Jeon y Murray, 2008), e incluso era aceptada en la época anterior a la quimioterapia (Dooley y Chaisson, 2009).

Por otro lado, el porcentaje de casos de tuberculosis asociados a VIH/SIDA correlacionó con la incidencia municipal, lo cual indica que, a pesar de presentarse en un número reducido de casos, esta comorbilidad podría tener un papel importante en la diseminación de la enfermedad, como ocurre en otras regiones del mundo (WHO, 2013).

Tuberculosis y la dinámica administrativa de los programas de salud pública

La regionalización que mejor permitió encontrar diferencias significativas entre diferentes tipos de pacientes de tuberculosis fue la que se llevó a cabo con base en la organización administrativa de los programas de vigilancia epidemiológica, es decir, la agrupación por municipios en jurisdicciones sanitarias. Las jurisdicciones de Apatzingán y Lázaro Cárdenas se han mantenido como aquellas con mayores valores de incidencia municipal. Ambas jurisdicciones tienen el comportamiento típico

de una región de alta incidencia: sus municipios tienen baja proporción de casos entre mayores de 65 años y una baja proporción de casos extrapulmonares. Los municipios de la jurisdicción de Apatzingán tienen una proporción M/F, entre 1 y 2, con una ligera predominancia de los casos entre pacientes masculinos, mientras que en la jurisdicción de Lázaro Cárdenas, la mediana de dicha proporción es más cercana a 1.

Por otro lado, el comportamiento de la jurisdicción de Zitácuaro no es tan claro. En el 2010 fue una de las jurisdicciones con mayores tasas de incidencia, contrastando con su comportamiento en los años censales anteriores. Presentó una mayor proporción de casos entre pacientes mayores de 65 años y una baja proporción de casos extrapulmonares. Sin embargo, uno de los municipios con proporciones extraordinariamente altas de este tipo de tuberculosis pertenece a dicha jurisdicción. El hecho de que en la jurisdicción sanitaria de Zitácuaro se encuentren algunos de los municipios con menor índice de desarrollo (región Oriente, IDH 0.7453) y el comportamiento poco consistente de la tuberculosis, sugiere un sub-registro de casos en la región.

Finalmente, las jurisdicciones de Zamora, La Piedad, Uruapan, Páztcuaro, Morelia, contienen a los municipios con mayor proporción de casos extrapulmonares, y presentan características heterogéneas en cuanto a tasas de incidencia, proporción M/F y distribución de casos por edad, aunque son más cercanos a los valores de baja incidencia.

Todos estos datos indican que la dinámica de cada una de las jurisdicciones afecta la información que se obtiene del comportamiento regional de la enfermedad, y que esta influencia sobrepasa la que tienen factores sociodemográficos, como el índice de desarrollo humano. Sin embargo, mediante esta revisión de los datos fue posible encontrar diferencias regionales en el comportamiento de la tuberculosis que pueden permitir la toma de acciones específicas en función de sus características.

Uno de los aspectos evaluados en este trabajo fue la distribución de los casos extrapulmonares. La tuberculosis extrapulmonar ocurre cuando durante la diseminación hematológica del bacilo, éste se aloja en cualquier órgano del huésped. Dado que la oxigenación en la mayoría de los tejidos es subóptima para el bacilo, el desarrollo de la enfermedad extrapulmonar es lento e insidioso (Kristki y Fiuza de Melo, 2007). Solo de un 10% a un 20% de los pacientes inmunocompetentes que desarrollan la enfermedad activa presentan un cuadro extrapulmonar, mientras que el porcentaje se eleva al 60% entre los pacientes inmunocomprometidos (Fanlo y Tiberio, 2007).

En nuestro estado, la concentración de casos extrapulmonares entre la población menor 65 años (tabla 5) coincide con las estadísticas previamente reportadas en otras regiones (Ducomble *et al.* 2013; Lin *et al.* 2013). A nivel estatal la proporción de casos extrapulmonares ha ido en aumento desde el año 2000 (Fig. 1.6). Este aumento podría reflejar el descenso en el número de casos pulmonares, como se ha reportado en la Unión Europea (Sandgren *et al.* 2013). Sin embargo, mientras la proporción de casos extrapulmonares ha aumentado más del doble en el periodo de estudio, los niveles de incidencia no han disminuido significativamente. A nivel municipal observamos que los municipios con mayor proporción de casos extrapulmonares se concentran al norte del estado, en las regiones Lerma-Chapala, Bajío, Cuitzeo, Pátzcuaro-Zirahuén. Estas regiones corresponden con las zonas que presentan una prevalencia mayor a 0.5% de tuberculosis bovina, causada por *M. bovis* (SAGARPA, 2012). La tuberculosis bovina puede transmitirse a los humanos por contacto directo con los animales enfermos, lo que se conoce como tuberculosis zoonótica. La aparición de éste tipo de tuberculosis puede explicar parte del aumento de la proporción de casos extrapulmonares, ya que *M. bovis* tiene mayor propensión a diseminarse en el organismo (Majoer *et al.* 2011; Hlavsa *et al.* 2008). En algunos países latinoamericanos se ha reportado que *M. bovis* es responsable del 1 al 2.5% de los casos de TB humana; sin embargo, se considera que estos datos subestiman el problema, ya no existen programas permanentes de búsquedas intencionada de casos zoonóticos (Kantor, *et al.* 2008). En México, se ha reportado el aislamiento de *M. bovis* en 13.8% de los pacientes estudiados en Querétaro (Pérez-Guerrero *et al.*

2008), y en 28% de los pacientes estudiados en Jalisco (Portillo-Gómez y Sosa-Iglesia, 2011). Ambos estados colindan con las regiones en las que se concentran los casos extrapulmonares. Lamentablemente, dado que el cultivo e identificación del agente causal nos es un procedimiento de rutina, no se cuentan con datos para determinar si efectivamente, *M. bovis* tiene o no un papel relevante en los casos extrapulmonares reportados en el norte del estado.

Tuberculosis y género

La proporción de casos por género en el estado indica poca disparidad. Solo algunos municipios presentan grandes desigualdades. Aquellos en los que predominan los casos femeninos se agrupan en las regiones del Bajío, Tepalcatepec e Infiernillo. La región Bajío también tiene mayor proporción de casos extrapulmonares. La predominancia del género femenino entre los casos de tuberculosis extrapulmonar ha sido reportada previamente (Hlavsa *et al.* 2008; Majoor *et al.* 2011; Sandgren *et al.* 2013). Otros factores a los que se atribuye la desigualdad de la afectación por género son las disparidades en el riesgo laboral, en la propensión a la búsqueda de atención médica y en el acceso que se tiene a ella (Allotey y Gyapong, 2008). Las diferencias de género también se han atribuido a factores biológicos como las hormonas esteroideas, haciendo notar que las mujeres en edad reproductiva son más propensas a desarrollar la enfermedad activa que aquellas que ya han pasado por esa etapa (Neyrolles y Quintana-Murci, 2009). Los datos recopilados en este trabajo no nos permiten identificar las razones de las diferencias de género entre los municipios con proporción M/F extrema.

Tuberculosis y la dinámica administrativa de los programas de salud pública.

La regionalización que mejor permitió encontrar diferencias significativas entre diferentes tipos de pacientes de tuberculosis fue la que se llevó a cabo en base a la organización administrativas de los programas de vigilancia epidemiológica, es decir, la agrupación por municipios por jurisdicciones sanitarias. Las jurisdicciones de Apatzingán y Lázaro Cárdenas se han mantenido como las jurisdicciones con mayores valores de incidencia municipal. Ambas jurisdicciones tienen el

comportamiento típico de una región de alta incidencia: sus municipios tienen baja proporción de casos entre mayores de 65 años y una baja proporción de casos extrapulmonares. Los municipios de la jurisdicción de Aptzingán tienen una proporción M/F, entre 1 y 2, con una ligera predominancia de los casos entre pacientes masculinos, mientras que en la jurisdicción de Lázaro Cárdenas, la mediana de dicha proporción es más cercana a 1.

Por otro lado, el comportamiento de la jurisdicción de Zitácuaro no es tan claro. En el 2010 fue una de las jurisdicciones con mayores tasas de incidencia, contrastando con su comportamiento en los años censales anteriores. Presenta una mayor proporción de casos entre pacientes mayores de 65 años y una baja proporción de casos extrapulmonares. Sin embargo, uno de los municipios con proporciones extraordinariamente altas de este tipo de tuberculosis pertenece a ésta jurisdicción. El hecho de que en la jurisdicción sanitaria de Zitácuaro se encuentren algunos de los municipios con menor índice de desarrollo (región Oriente, IDH 0.7453) y el comportamiento poco consistente de la tuberculosis, sugiere un sub-registro de casos en la región.

Finalmente, las jurisdicciones de Zamora, La Piedad, Uruapan, Pátzcuaro, Morelia, contienen a los municipios con mayor proporción de casos extrapulmonares, y presentan características heterogéneas en cuanto a tasas de incidencia, proporción M/F y distribución de casos por edad, aunque son más cercanos a los valores de baja incidencia.

Todos estos datos nos indican que la dinámica de cada una de las jurisdicciones afecta la información que se obtienen del comportamiento regional de la enfermedad, y que esta influencia sobrepasa la que tienen factores sociodemográficos como el índice de desarrollo humano. Sin embargo, mediante esta revisión de los datos fue posible encontrar diferencias regionales en el comportamiento de la tuberculosis que pueden permitir la toma de acciones específicas en función de sus características.

Los datos generados permiten distinguir tres zonas con diferente comportamiento y necesidades de contención y prevención:

1. **Zona de alta incidencia:** Comprendida por la región Sierra-Costa, y parte de los municipios de la Región Tepalcatepec. Perteneciente a las jurisdicciones sanitarias de Lázaro Cárdenas y Apatzingán. El perfil de la enfermedad en esta región indica alta frecuencia de los eventos de transmisión. Se sugiere una vigilancia más cercana y a mayor plazo y amplitud de los contactos de los pacientes diagnosticados y considerar la búsqueda intencionada de casos de infección latente.
2. **Zona con probable sub-registro de casos:** Comprendida por los municipios de la región Oriente y Tierra Caliente. Perteneciente a la jurisdicción de Zitácuaro. Se sugiere la búsqueda intencionada de casos de tuberculosis activa en los centros de salud de la jurisdicción, principalmente en los municipios que mostraron un aumento en los valores de incidencia para el año 2010.
3. **Zona con probable prevalencia de tuberculosis zoonótica:** Comprendida por los municipios de las regiones Lerma-Chapala, Bajío, Pátzcuaro-Zirahuén, y algunos municipios de la región Cuitzeo, perteneciente a las jurisdicciones de Zamora, La Piedad, Morelia, Pátzcuaro y Uruapan. Se sugiere un programa de cultivo e identificación de todas las muestras extrapulmonares y la coordinación con los programas de vigilancia de tuberculosis bovina para la búsqueda intencionada de casos en comunidades donde ésta tenga altos valores.

CONCLUSIONES

En análisis anterior nos permite concluir que el perfil de la tuberculosis en el estado es complejo y no se puede explicar en términos estatales. El estado se encuentra en una zona de transición epidemiológica que no es homogénea a través de nuestro territorio.

Por lo tanto es posible rechazar la hipótesis propuesta, ya que se muestra que la tuberculosis en el estado de Michoacán no se comporta de acuerdo a lo esperado para zonas de baja incidencia. Sin embargo, se requiere una caracterización más profunda y detallada en cada zona del estado para determinar los factores sociodemográficos que influyen en las características que presenta la enfermedad a nivel local.

PERSPECTIVAS

A partir de este trabajo surgen una serie de preguntas epidemiológicas que pueden orientar futuras investigaciones en el área:

1. ¿Qué factores sociodemográficos impiden la reducción significativa de la incidencia en Lázaro Cárdenas y Apatzingán?
2. ¿Qué tan frecuente es la tuberculosis zoonótica en el norte del estado?
3. ¿Existen características asociadas al huésped o al patógeno que favorezcan la aparición de casos extrapulmonares en el norte del estado?
4. ¿Cuál es el perfil epidemiológico de la tuberculosis extrapulmonar?

Futuros trabajos que combinen la epidemiología clínica, la microbiología y la tipificación molecular del agente causal pueden responder estas y otras preguntas, por lo que el campo de la epidemiología de la tuberculosis en el estado es aún un campo fértil de investigación.

REFERENCIAS

Allotey, P. y M. Gyapong. 2008. **Gender in tuberculosis research.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 12(7):831-836.

Atun, R. A., Y.A. Samyshkin, F. Drobniowski, S.I. Kutznetsov, I.M. Fedorin, y R.J. Coker. 2005. **Seasonal variation and hospital utilization for tuberculosis in Russia: hospitals as social care institutions.** *Eur J Public Health.* 15(4):350-354.

Biggs, B., L. King, S. Basu y D. Stuckler. 2010. **Is wealthier always healthier? The impact of national income level, inequality, and poverty on public health in Latin America.** *Soc Sci Med.* 71(2):266-273.

Bonita, R. Beaglehole, R. y Kjellström, T. 2006. **Basic Epidemiology.** 2a. Ed. World Health Organization. Geneva. 212 pp.

Borgdorff, M.W., N.J. Nagelkerke, C. Dye y P. Nunn. 2000. **Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 4(2):123-132.

Broekman, J.F., G.B. Migliori, H.L. Rieder, J. Lees, P. Ruutu, R. Loddenkemper, M.C. Raviglione, World Health Organization, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease y Royal Netherlands Tuberculosis Association Working Group. 2002. **European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence.** *Eur Resp J.* 19(4):765-775.

Cantwell, M.F., M.T. McKenna, E. McCray y I.M. Onorato. 1997. **Tuberculosis and Race/Ethnicity in the United States. Impact of Socioeconomic Status.** *Am J Respir Crit Care Med.* 157(4 pt 1):1016-1020.

CDC. 2009. **CDC Immigration Requirements; technical instructions for tuberculosis screening and treatment using cultures and directly observed therapy.** Center for Disease Control and Prevention (Recuperado el 30 de Mayo de 2013)

Clancy, L., H.L. Rieder, D.A. Enarson, y S. Spinaci. 1991. **Tuberculosis elimination in the countries of Europe and other industrialized countries.** *Eur Respir J.* 4(10):1288-1295.

Dooley, K.E. y R.E. Chaisson. 2009. **Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics.** *Lancet Inf Dis.* 9(12):737-746

Ducomble, T., K. Tolksdorf, I. Karagiannis, B. Hauer, B. Brodhun, W. Haas y L. Fiebig. 2013. **The burden of extrapulmonary and meningitis tuberculosis: an investigation of national surveillance data, 2002-2009.** *Euro Surveill.* 18(12):pii=20463.

Dye, C. y M. Borgdorff. 2008. **Global Epidemiology and Control of Tuberculosis.** En S.H. Kaufmann y P. van Helden (Eds) **Handbook of Tuberculosis: Clinics, Diagnostics, Therapy and Epidemiology.** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim. pp.1-21.

Dye, C., K. Lönnroth, E. Jaramillo, B.G. Williams y M. Raviglione. 2009. **Trends in tuberculosis incidence and their determinants in 134 countries.** *Bull World Health Organ.* 87(9):683-691.

Fanlo, P. y G. Tiberio. 2007. **Extrapulmonary tuberculosis.** *An Sist Sanit Navar.* 30(Suppl2):143-162.

Foxman, B. y L. Riley. 2001. **Molecular epidemiology: Focus on infection.** *Amer J Epidemiol.* 153(12):1135-1141

Hlavsa, M.C., P.K. Moonan, L.S. Cowan, T.R. Navin, J.S. Kammerer, G.P. Morlock, J.T. Crawford y P.A. Lobue. 2008. **Human Tuberculosis due to Mycobacterium bovis in the United States, 1995-2005.** *Clin Infect Dis.* 47(2):168-175.

Holmes, C.B., H. Hausler y P. Nunn. 1998. **A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis.** *Int. J Tuberc Lung Dis.* 2(2):96-104.

INEGI. 2013. **Mapa digital de México, v.5**. Instituto nacional de Geografía Estadística e Informática. <http://gaia.inegi.org.mx/mdm5/viewer.html#> (Recuperado el 25 de abril de 2013).

INEGI. 2012. **México en Cifras: Información Nacional, por Entidad Federativa y Municipios**. . Instituto nacional de Geografía Estadística e Informática. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=16> (Recuperado el 13 de noviembre de 2012)

Jeon, C.Y. y M.B. Murray. 2008. **Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies**. *PLoS Med.* 5(7):e152

Kamper-Jørgensen, Z., A. Bengaard-Andersen, A. Kok-Jensen, M. Kamper-Jørgensen, I.C. Bygbjerg, P.H. Andersen, V.O. Thomsen, T. Lillebaek. 2012. **Migrant tuberculosis: the extent of transmission in a low burden country**. *BMC Infec Dis.* 12:60.

Kantor, I. N., M. Ambroggi, S. Poggi, N. Morcillo, M.A. da Silva Telles, M. Osório Ribeiro, M.C. Garzón Torres, C. Llerena Polo, W. Ribón, V. García, D. Kuffo, L. Asencios, L.M. Vásquez Campos, C. Rivas, J.H. de Waar. 2008. **Human Mycobacterium bovis infection in ten Latin American countries**. *Tuberculosis* 88(4):358-365.

Kristki, A., y A. Fiuza de Melo. 2007. **Tuberculosis in Adults**. En: J.C. Palomino, S. Cardoso-Leão y V. Ritacco (Eds). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Belgium, Brazil, Argentina: TuberculosisTextbook.com. pp. 487-524

Kv, N., K. Duraisamy, S. Balakrishnan, S. M, J.S. S, K.D. Sagili, S. Satyanarayana, A.K. Mv y D.A. Enarson. 2013. **Outcome of tuberculosis treatment in patients with diabetes mellitus treated in the revised national tuberculosis control programme in Malappuram District, Kerala, India**. *PLoS One.* 8(10):e76275

Laifer, G., A.F. Widmer, M. Simcock, S. Bassetii, A. Trampuz, R. Frei, M. Tamm, M. Battegay y U. Fluckiger. 2007. **TB in a Low-Incidence Country: Differences Between New Immigrants, Foreign-Born Residents and Native Residents.** *Amer J Med.* 120(4):350-356.

Liao, C.M., N.H. Hsieh, T.L. Huang, Y.H. Cheng, Y.J. Li, C.-P. Chio, S.C. Chen y M.P. Ling. 2012. **Assessing trends and predictors of tuberculosis in Taiwan.** *BMC Public Health.* 12(1):29-40.

Lin, C.Y., T.C. Chen, P.L. Lu, C.C. Lai, Y.H. Yang, W.R. Lin, P.M. Huang, Y.H. Chen. 2013. **Effects of Gender and Age on Development of Concurrent Extrapulmonary Tuberculosis in Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Population Based Study.** *PLoS One.* 8(5):e63936.

Lindoso, A. A., E.A. Waldman, N.K. Komatsu, S.M. Figueiredo, M. Taniquichi y L.C. Rodrigues. 2008. **Profile of tuberculosis patients progressing to death, city of São Paulo, Brazil, 2002.** *Rev Saude Publica.* 42(5):805-812.

López-Rocha, E., J. Juárez-Álvarez, L. Riego-Ruiz, L. Enciso-Moreno, F. Ortega-Aguilar, J. Hernández-Nieto, J.A. Enciso-Moreno, R. López-Revilla R. 2013. **Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosí, México.** *BMC Res Notes.* 6:172.

Luquero, F. J., E. Sánchez-Padilla, F. Simón-Soria, J.M. Eiros y J.E. Golub. 2008. **Trend and seasonality of tuberculosis in Spain, 1996-2004.** *Inter J Tuberc Lung Dis.* 12(2):221-224.

MacLahan, J. H., C.J. Lavender y B.C. Cowie. 2012. **Effect of Latitude on Seasonality of Tuberculosis, Australia 2002-2011.** *Emerg Infect Dis.* 18(11):1879-1881.

Majoor, C. J., C. Magis-Escurra, J. van Ingen, M.J. Boeree y D. van Soolingen. 2011. **Epidemiology of *Mycobacterium bovis* Disease in Humans, the Netherlands, 1993–2007.** *Emerg Infec Dis.* 17(3):457-463.

Marais, B. J., R.P. Gie, H.S. Schaaf, A.C. Hesselning, C.C. Obihara, J.J. Stareke, D.A. Enarson, P.R. Donald, N. Beyers. 2004. **The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era.** *Int J Tuberc Lung D.* 8(4):392-402.

Martineau, A. R., S. Nhamoyebonde, T. Oni, M.X. Rankaga, S. Marais, N. Bangani, R. Tsekela, L. Bashe, V. de Azevedo, J. Caldwell, T.R. Venton, P.M. Timms, K.A. Wilkinson y R.J. Wilkinson. 2011. **Reciprocal seasonal variation in vitamin D status and tuberculosis notifications in Cape Town, South Africa.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(47):19013-19017.

Millet, J.P., A. Moreno, L. Fina, L. del Baño, A. Orcau, P.G. de Olalla y J.A. Caylà. 2013. **Factors that influence current tuberculosis epidemiology.** *Eur Spine J.* 22(Suppl4):539-548

Molina-Torres, C.A., E. Moreno-Torres, J. Ocampo-Candiani, A. Rendón, K. Blackwood, K. Kremer, N. Rastogi, O. Welsh y L. Vera-Cabrera. 2010. ***Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes in Monterrey, Mexico.** *J Clin Microbiol.* 48(2):448-455.

Montoro, E. y R. Rodriguez. 2007. **Global Burden of Tuberculosis.** En: J.C. Palomino, S. Cardoso-Leão y V. Ritacco (Eds). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care.** Belgium, Brazil, Argentina: TuberculosisTextbook.com. pp. 263-282.

Nava-Aguilera, E., Y. López-Vidal, E. Harris, A. Morales-Pérez, S. Mitchell, A. Flores-Moreno, A. Villegas-Arrizón, J. Legorreta-Soberanis, R. Ledogar y N. Andersson. 2011. **Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* Cases in Acapulco: Spoligotyping and Risk Factors.** *Clin Dev Immunol.* 2011:408375.

Nellson, L.J., y C.D. Wells. 2004. **Global epidemiology of childhood tuberculosis.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 8(5):636-647.

Neyrolles, O. y L. Quintana-Murci, L. 2009. **Sexual Inequality in Tuberculosis.** *PLoS Med.* 6(12):e1000199.

Odone, A., M. Riccò, M. Morandi, B.M. Borrini, C. Pasquerella y C. Signorelli. 2011. **Epidemiology of tuberculosis in a low-incidence Italian region with high immigration rates: differences between not Italy-born and Italy-born TB cases.** *BMC Public Health*. 11:376.

Palmero, D.J. 2007. **Tuberculosis and HIV/AIDS.** En: J.C. Palomino, S. Cardoso-Leão y V. Ritacco (Eds). *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*. Belgium, Brazil, Argentina: TuberculosisTextbook.com. pp. 559-592

Parrinello, C. M., A. Crossa, A. y T.G. Harris. 2012. **Seasonality of tuberculosis in New York City, 1990-2007.** *Inter J Tuberc Lung Dis*. 16(1):32-37.

Peerek, M., J.P. Watson, L.P. Ormerod, O.M. Kon, G. Woltmann, P.J. White, I. Abubakar y A. Lalvani. 2011. **Screening of immigrants in the UK for imported latent tuberculosis: a multicentre cohort study and cost-effectiveness analysis.** *Lancet Infect Dis*. 11(6):435-444.

Pérez-Guerrero, L., F.Millián-Suazo, C. Arriaga-Díaz, C. Romero-Torres, C. y M. Escartín-Chávez. 2008. **Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México.** *Salud Pub Mex*. 50(4):286-291.

PHE. 2013. **World Health Organization (WHO) estimates of tuberculosis incidence by country, 2011 (sorted by country).** Public Health England. <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Tuberculosis/TBWorldwideSurveillanceData/tbepiWhoTable1/> (Recuperado el 30 de mayo de 2013)

PNUD. 2007. **Informe para el Desarrollo Humano Michoacán 2007.** Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. México DF:

Ponce-De-Leon, A., M.L. Garcia-Garcia, C. Garcia-Sancho, F.J. Gomez-Perez, J.L. Valdespino-Gomez, G. Olaiz-Fernandez, R. Rojas, L. Ferreyra-Reyes, B. Cano-Arellano, M. Bobadilla, P.M. Small y J. Sifuentes-Osornio. 2004. **Tuberculosis and Diabetes in Southern Mexico.** *Diabetes Care*. 27(7):1584-1590

Portillo-Gómez, P. y E.G. Sosa-Iglesia. (2011). **Molecular identification of *Mycobacterium bovis* and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients.** *Int J Tuberc Dis.* 15 (10):1409-1414.

Puri, J., A. Gaye, S. Kurukulasuriya y T. Scoot. 2007. **Measuring Human Development, a primer.** Programa para el Desarrollo de las Naciones Unidas. Nueva York.

Reis-Santos, B., R. Locatelli, B.L. Horta, E. Faerstein, M.N. Sanchez, L.W. Riley y E.L. Maciel. 2013. **Socio-Demographic and Clinical Differences in Subjects with Tuberculosis with and without Diabetes Mellitus in Brazil – A Multivariate Analysis.** *PLOS One.* 8 (4):e62604.

Rosales, S., L. Pineda-García, S. Ghebremichael, N. Rastogi y S.E. Hoffner. 2010. **Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Honduras.** *BMC Microbiol.* 10:208.

SAGARPA. (2012). **Plan Estratégico de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina 2008-2012.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Puerto Vallarta.

Sánchez-Pérez, H. J., A. Díaz-Vázquez, J.C. Nájera-Ortíz, S. Balandrano y M. Martín-Mateo. 2010. **Multidrug-resistant pulmonary tuberculosis in Los Altos, Selva and Norte regions, Chiapas, Mexico.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 4(1):34-39.

Sandgren, A., V. Hollo y M.J. van der Werf. 2013. **Extrapulmonary tuberculosis in the European Union and European Economic Area, 2002 to 2011.** *Euro Surveill.* 8(12):pii=20431.

SS. 2011. **Situación Actual de la Tuberculosis en México... Avances y Desafíos.** Secretaría de Salud. México D.F.

SSM. 2008. **Jurisdicciones Sanitarias del Estado de Michoacán.** Secretaría de Salud del Gobierno del Estado. <http://salud.michoacan.gob.mx> (Recuperado el 14 de marzo de 2010).

Tessema, B., J. Beer, M. Merker, F. Emmirch, U. Sack, A.C. Rodloff, S. Niemann. 2013. **Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia.** *BMC Infect Dis.* 13:131.

WHO. 2012. **Global Tuberculosis Report 2012**). World Health Organization. Geneva.

**CAPÍTULO 2: *Mycobacterium. tuberculosis*: EVOLUTIONARY AND
EPIDEMIOLOGICAL INSIGHTS AS REVEALED BY MOLECULAR GENETIC
ANALYSIS**

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Publicado en: Lodeiro, A. (Ed) 2010. Bacterial Populations: Basic and Applied
Aspects of Their Structure and Evolution, 2010: 79-95. ISBN: 978-81-7895-486-8
Editor: Anibal Lodeiro



Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Bacterial Populations: Basic and Applied Aspects of Their Structure and Evolution, 2010: 79-95
ISBN: 978-81-7895-486-8 Editor: Anibal Lodeiro

5. *Mycobacterium tuberculosis*: Evolutionary and epidemiological insights as revealed by molecular genetic analysis

Ana Laura Guillén-Nepita¹, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas²
and Gerardo Vázquez-Marrufo¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

²División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Abstract. Tuberculosis is a global health concern. In 2007 more than nine millions of new cases were reported worldwide. The slow growth of *Mycobacterium tuberculosis*, the causal agent of this disease, hampers the diagnosis and the characterization of the isolates using traditional microbiology methods. Because of this, efforts have been made for almost 20 years, to take advantage of the techniques of molecular biology to improve the detection and characterization of *M. tuberculosis*. From the first protocols based on amplification of ribosomal regions and the subsequent sequencing or hybridization, to analysis of repeated sequences in the chromosome and even whole genome comparisons, the techniques of molecular biology have made possible to identify the species of the bacilli present in a clinical specimen, to put isolates into groups called genotypes, to improve epidemiological

Correspondence/Reprint request: Dr. Gerardo Vázquez-Marrufo, Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: hongo_indigo@prodigy.net.mx

monitoring and even delve into the evolution of this microorganism. In this chapter we review the progress made in the understanding of the epidemiology and evolution of this pathogen through the application of techniques of molecular biology.

Introduction

Tuberculosis (TB) is a severe public health problem throughout the world. During the year 2007, 9.27 million new cases of TB were reported worldwide, a larger figure than the 9.24 million new cases reported in 2006 [1]. Asia and Africa are the regions with a higher incidence, with a 55% and a 31% of registered cases, respectively. The WHO attributes the larger number of cases to the generalized increase in population, given that the incidence rate in 2007 of 139 for each 100,000 inhabitants remains below the peak registered in 2004 of 142 cases for each 100,000 inhabitants. Despite the global downward trend of incidence there are important regional differences. The Eastern Europe region remains stable, while African countries with low prevalence of VIH present a growing incidence of TB. Nevertheless, the rates of prevalence and mortality have reduced worldwide (Figure 1). The data of multi-drug resistant TB (MDR-TB) are particularly relevant. In the year 2007, 30,000 new cases of MDR-TB were detected, most of which were concentrated in Europe (in particular, in Eastern Europe) and Africa (particularly in South Africa). By the year 2008, 55 countries and territories reported at least one case of extensively drug-resistant TB (XDR-TB), which are virtually untreatable. In the African region, the high incidence rate of co-infection with HIV is of additional concern. From these data two important trends can be observed: on one side, most of the new cases of TB are concentrated in the Asiatic region; while in the European region there is a higher incidence of MDR-TB cases, which may contribute to the stability of the incidence of TB over the past years [1].

The causal agents of human TB are mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC), in first instance integrated by the species *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* (with two subtypes) and *M. microti* [2]. Recently, the MTCB has been expanded with the addition of new members including *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* and the dassie bacillus [3]. *Mycobacterium tuberculosis* is considered to be the main causal agent of human TB [1, 4], although cases associated to *M. bovis* are continuously being reported, making this zoonosis to become a public health problem, mainly because of its association with patients immunosuppressed by HIV [5, 6, 7, 8]. It has been estimated that the prevalence of TB caused by *M. bovis* is of a 3.1% of the cases of human TB and that the possibility *M. bovis* may be generating surges of human TB

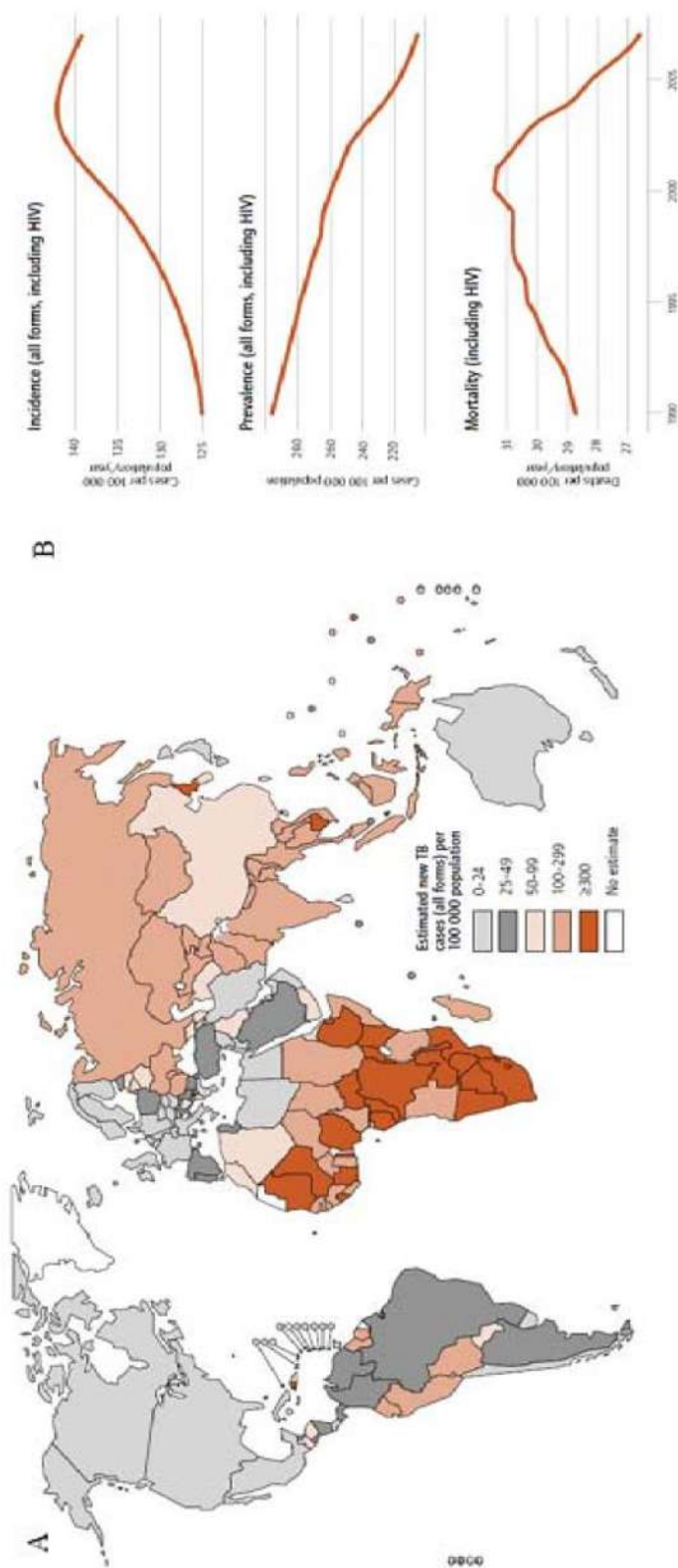


Figure 1. World statistics of tuberculosis. **A.** Incidence rates by country in the year 2007. **B.** World TB incidence, prevalence and mortality rates, including HIV patients, from 1999 to 2007. Reproduced from reference [1] with WHO authorization.

without it being detected is of particular importance in Africa, where an 80% of countries have registered cases of bovine TB and there is a high prevalence of HIV [9]. Although the human-to-human transmission of *M. bovis* can occur between immunocompromised patients, a case of transmission between two immunocompetent persons has been recently reported [10], which highlights the importance of taking into consideration the typification of species involved in TB surges. For the particular case of *M. bovis*, efforts have been made to genotype the isolates present in cases of bovine TB [11].

The information collected by the WHO is generated through data gathering forms that are filled by each country's authorities responsible for epidemiologic surveillance, mainly based on diagnostics through microscopy, radiology and bacterial culture. However, since the last decade of the past century, studies of the MTBC through molecular genetics techniques have exponentially expanded, a variety of tools being incorporated since then (see Table 1). The use of molecular genetics analysis tools has allowed for the increasingly precise disclosure of the evolution pattern of taxa within the MTBC [3, 12], as well as for knowing both the levels of genetic variation among clinical isolates and the incidence and distribution of different genotypes at the regional and global scales. The resolution of molecular genetics tools spans several levels of the taxonomic hierarchy, thus allowing for: establishing subspecies within the MTBC [13]; discerning between mycobacteria falling within the MTBC and atypical mycobacteria [14,15,16]; and establishing subfamilies and the evolutionary relation between them [17, 18]. Among the epidemiologic applications contributed by molecular genetics tools are: the identification of cases due to reactivation or recent transmission; identification of drug-resistance patterns in some strain groups; and the description of transmission dynamics within particular populations. In the present chapter an analysis is presented of the molecular genetics tools applied to studies of phylogeny and epidemiology of the main constituent of the MTBC associated with pulmonary TB cases in humans, i.e., *M. tuberculosis*.

***M. tuberculosis*, an ancient human pathogen**

Tuberculosis is an ancient human disease. Evidence from paleopathological studies has documented the typical lesions of TB in human bones. More recently, analysis of ancient DNA (aDNA) has detected genetic prints of *M. tuberculosis* in human remains dating from the predynastic period in Egypt, Neolithic Europe and Pre-Columbian America [19]. However, it was until the development and generalized use of molecular genetic typification methods that the evolutionary history of *M. tuberculosis*

and other members of the MTBC have been better understood. Early studies using sequences of the 16S subunit of rRNA indicated low genetic diversity, both among members of the MTBC as between *M. tuberculosis* isolates [20, 21]. This observation was reinforced by the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in other regions of the bacterial chromosome, which lead to the hypothesis of the derivation of the pathogen from a relatively recent bottleneck event occurred about 15,000 or 20, 000 years ago [22]. More recent studies have found a higher level of polymorphism between species and isolates of the MTBC, dating the common ancestor of the present strains of *M. tuberculosis* at 35, 000 years ago [23]. Analysis of chromosomal deletions present in MTBC members allowed for identifying species-specific deletions; in addition, presence/absence of the TbD1 region allowed for a classification in modern and ancient groups at the intra- and interspecific levels [24]. Such data show that *M. bovis*, and other members of the MTBC, diverged from *M. tuberculosis* prior to the occurrence of the TbD1 deletion, and that *M. bovis* is the member of the MTBC having the larger number of deletions. In consequence, it is unlikely that *M. bovis* is the ancestor of *M. tuberculosis*, discarding the hypothesis of TB being acquired by humans from infected animals along the domestication process of bovines occurred during the Neolithic period.

Recently, Gagneux and collaborators [25] made an analysis of deletions, also known as Large Sequence Polymorphisms (LSPs), in a collection *M. tuberculosis* isolates from patients having different ethnic origins. Their results clustered the isolates in 6 lineages (Figure 2) that agree with their geographic origin. These lineages are consistent with the evolutionary scenario proposed by Brosch and collaborators [24] and display a clear tendency of transmission between individuals from matching ethnic groups, i.e., isolates from the East Asian lineage corresponded to patients of Chinese origin while isolates from the Euro-American lineage were more frequent among patients born in North America, despite all patients were residents of the United States of America (US). In addition, it was found that the lineages having the “ancient” marker (intact TbD1 region) as well as the Indo-Oceanic lineage and the isolates of *M. africanum* came from patients from Africa and India. All these data suggest that the common ancestor of the MTBC was a pathogen of humans in existence before these left Africa and from which *M. bovis* and other members of the complex evolved by successive deletions, while modern strains appeared after a bottleneck event marked by the TbD1 deletion. The lengthy parasite-host coexistence would have allowed for the adaptation of the bacilli to a specific human population and would account for the high percentage of subclinical infections. Nevertheless, deletions are unique and irreversible events to which it is not possible to assign a time

scale, besides these having a low resolution between related isolates. Therefore, other attempts to understand the evolutionary process of the pathogen have been based on the search of SNPs in large gene groups or, furthermore, on comparison of whole genomes [26, 27]. Such approaches have shown that while members of the MTBC are largely clonal, among the known punctual mutations non-synonymous predominate over synonymous (silent mutations) SNPs, which indicates the absence of significant purifying selective force acting over these microorganisms and that genetic drift is the main force directing their evolution. This conclusion is consistent with the

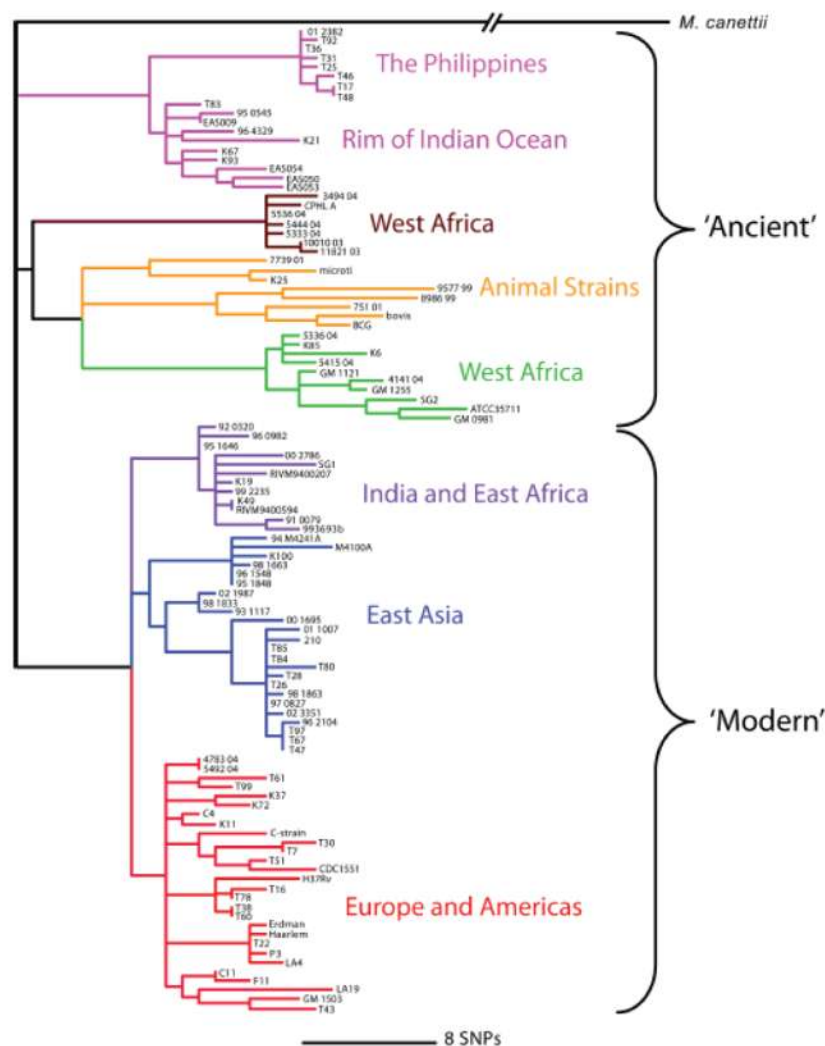


Figure 2. Phylogeny of the *M. tuberculosis* complex. Branches are colored according to lineages previously identified by LSPs, indicating their predominant geographic regions. Reproduced from reference [27] under the terms of the Creative Commons license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

the fact that members of the MTBC have gone through a number of genetic bottlenecks [27]. In addition, the phylogeny generated by means of the sequences of 89 genes in 108 isolates agrees with the results of the analysis of deletions, strengthening the hypothesis of members of the MTBC being related to an ancestral strain of *M. tuberculosis* and, hence, that coexistence of the pathogen with humans predates the domestication of cattle. The lack of purifying natural selection acting over populations of *M. tuberculosis* indicates that those mutations that were linked to the acquisition of antibiotic immunity could have remained in the population despite the absence of such selective pressure [27]. These data underscore the need for monitoring the different genotypes of the pathogen at the regional and global scales as an additional tool to the recommendations of the WHO for the eradication of TB.

Discrimination between isolates of the MTBC at several levels of the taxonomic hierarchy

Because of the slow growth of clinically important strains of the genus *Mycobacterium*, diagnostic laboratories do not apply biochemical typification techniques. Symptomatology, thoracic radiography and the Zielh-Neelsen stain are the most commonly used tools for diagnosing TB, particularly in developing countries. However, such tools are largely unspecific, besides that the Zielh-Neelsen stain has a limited sensitivity. In consequence, significant efforts have been made along the past nearly twenty years to develop molecular tools for the detection and typification of mycobacteria, in order to provide with fast, sensitive and specific diagnostic methods that facilitate the task of controlling and eradicating TB (Table 1).

Molecular diagnosis essays currently used are largely based on variations of the PCR techniques. Primers have been designed that are specific for *Mycobacterium* [15] and for discriminating between species belonging to the MTBC and those that do not, which are generically known as *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* (MOTT) [14, 16, 28]. In the latter case, some protocols required to know the sequence of the amplified product or to perform an additional step of hybridization with specific probes in order to distinguish between isolates at the level of species. In particular, primers addressed at the *IS6110* insertion region allow for discerning between *M. tuberculosis* and *M. bovis* and between these and the remaining species in the MTBC. Sequencing and comparing whole genomes have optimized the discrimination level of PCR assays [29]. The accumulated data enabled Huard and collaborators [13] to design a PCR typification panel allowing for identifying members of the MTBC by means of 7 sets of primers amplifying

regions of the chromosome containing deletions specific for each of its members. If a given isolate has a particular deletion, no PCR product will be detected using the corresponding set of primers, the amplification pattern allowing for strain identification [13]. Through that procedure, it is possible to identify cases of TB caused by different members of the MTBC, which can be highly relevant to identify zoonosis events for which specific control and prevention measures can be adopted. An important feature of isolate discriminating techniques based on PCR is that they enable direct clinical analysis, particularly of sputum and blood, obviating the need for culture and isolation of the pathogen, which considerably reduces the time needed for diagnosis.

It is also important to give consideration to the fact that techniques based on Southern blot hybridization are tools that offer discrimination at a finer level than that provided by the presence/absence of bands in the above-mentioned PCR assays. Thus, spoligotyping is a dot blot hybridization assay using a set of 43 probes of the direct repeat locus (DR), allowing for the assignation of a given isolate to large genetic groups of *M. tuberculosis*. Databases have been compiled containing spoligotyping patterns that allow for pattern comparison of isolates obtained worldwide, which makes possible to trace the dispersion patterns of particular genotypes, as in the case of *M. tuberculosis* Beijing [30, Figure 3]. Likewise, RFLP patterns obtained using a region of the insertion sequence *IS6110* allows for discriminating between isolates of *M. tuberculosis* belonging to the same lineage [17, 18], which has a direct application in molecular epidemiology because it enables to follow a transmission chain and, thus, to generate measures for the management and contention of TB surges.

The development of molecular epidemiology for the monitoring of TB began in the middle 1990's and had a significant advance with the standardization of the RFLP analysis of insertion sequence *IS6110* and spoligotyping (Table 1). The advances as well as the costs and benefits of these and other techniques having discriminatory power between isolates and species have been amply and iteratively reviewed [17, 18, 31]. The rise of molecular epidemiology made possible to first identify large clusters of isolates having very similar banding patterns, which were named genotypes. The first such genotype identified as predominant in a population was described from isolates from Eastern Asia and was named Beijing [32], whose individuals share a *IS6110*-RFLP banding pattern with a similarity of over a 66%. Later studies have described the presence of that genotype in other areas of Asia, and even in North America where it was initially identified as strain W. The predominance of the Beijing genotype among the Asiatic population generated the hypothesis that it has a biological advantage

Table 1. Methods for genotyping of MTBC.

METHODS	FUNDAMENT	COMMENTS
IS6110 RFLP	IS6110 is an insertion sequence found in a variable number of repeat copies in the genome of <i>M. tuberculosis</i> . Digestion of DNA with the restriction enzyme <i>PvuII</i> generates fragments of variable size, which are separated by electrophoresis and hybridized with probes specific for the insertion sequence. The resulting banding pattern is highly polymorphic allowing for strain discrimination.	Remains to be the golden standard for isolate genotyping due to its high resolution power. Isolates with 6 or less copies of IS6110 may not be reliably identified by the technique. Can be used in combination with other genotyping methods for a more precise analysis. A laborious procedure requiring subculture and DNA extraction.
Spoligotyping	Analysis makes use of the DR region including multiple variable direct repeats (DVRs). Each DVR is made up of a short repetitive sequence of 36bp and a non-repetitive spacer of similar length (35-45pb). Some groups of isolates may lack some of the spacers due to deletions produced by recombination or transposition events. Specific oligonucleotides for repeated sequences are used for amplifying the spacers present between them. The PCR product is hybridized to probes specific for different spacers and the results are presented as positive or negative for the presence or absence, respectively, of hybridization to a particular spacer.	A simple to perform and highly reproducible technique Because results are presented in binary format (positive/negative) for each spacer, comparison across laboratories is simplified. Has a low resolution power and can be little informative in geographic regions where endogenous strains are present. Despite the above, allows for grouping in broad "spoligotypes" and the analysis can be complemented with other higher resolution methods.
MIRU-VNTR	Analysis of loci with a variable number of tandem repeats (VNTR), in particular of elements particular of mycobacteria called mycobacteria interspersed repetitive units (MIRUs). MIRUs are tandem repeat sequences having variable size. Each locus is amplified with specific primers and size determined by gel electrophoresis.	A simple to perform and highly reproducible technique. Results are presented in number of repeats for each locus, making comparison across laboratories to be simple. Has a resolution power comparable to that of IS6110-RFLP, because of which its use as a standard technique has been promoted.
SNPs	Consisting in the search for point mutations, or single nucleotide polymorphisms (SNPs), that are either synonymous (resulting in the same amino acid) or non synonymous (resulting in a change in amino acid) in a set of genes or in a region of the bacterial chromosome. Requires the sequencing of a number of loci or of the whole genome of a strain.	Highly informative for reconstructing phylogenies. Some SNPs are associated with traits such as antibiotic resistance. Allowed for the grouping of strains in three large principal genetic groups (PGGs)
LSPs	Large sequence polymorphisms (LSPs) that in mycobacteria result from large deletions and rearrangements of the bacterial chromosome and not from horizontal gene transmission. These deletions can be analyzed by hybridization or simply by PCR assay.	Because not being derived from horizontal gene transmission LSPs are irreversible, which makes that once acquired by a strain, its descendants can be identified. Has made possible to establish large lineages included within genotypes identified by different techniques.
RAPDs	A single oligonucleotide with an arbitrary sequence is used to amplify random regions of the genome having sequences complementary to that of the primer being utilized. In each reaction, a banding pattern is obtained that is specific to each strain. Several oligonucleotides can be used in separate reactions, thus generating informative banding patterns allowing for the characterization of each isolate analyzed.	A fast and low-cost technique that has not been accepted due to existing doubts about its reproducibility in different laboratories.

Strain	Spoligotype
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	
<i>M. bovis</i> BCG	
<i>M. tuberculosis</i> "Beijing"	
<i>M. tuberculosis</i> "Manilla"	
<i>M. tuberculosis</i> "East African-Indian"	
<i>M. tuberculosis</i> "seal"	
<i>M. tuberculosis</i> subsp. <i>caprae</i>	
<i>M. tuberculosis</i> subsp. <i>canettii</i>	
<i>M. microti</i>	

Figure 3. Binary results of spoligotyping. Shown are some of the specific fingerprints. For example, *M. bovis* displays a characteristic absence of spacers 39 to 43. Reproduced from reference [50] with authorization.

over other variants, such as a higher frequency of multi-drug resistance [17, 33]. Interestingly, it has been observed that all isolates of the Beijing genotype have an identical spoligotyping pattern. The above-mentioned example shows how the use of different genotyping methods makes possible establishing relations between isolates at different level: high resolution markers, such as *IS*6110-RFLP, are used to establish short-term relations in order to identify cases of recent transmission, hence being useful in the search of infection chains under the premise that isolates having a recent divergence from a common ancestor will display patterns having more similarity between them than with unrelated isolates. In turn, markers having a more limited resolution power allow for establishing relations between genotypes at a more dilated time scale. By all means, the correct interpretation of the genetic relation between isolates requires of the information provided by the methods of classical epidemiology, of which molecular epidemiology is a complement and not a substitute.

One of the first PCR-based techniques for assessing genetic diversity among clinical isolates of *M. tuberculosis* was the RAPD assay. That technique has been used to characterize surges of *M. tuberculosis* and pseudo-epidemics of other species of mycobacteria [34, 35, 36, 37, 38]. RAPD-based studies have shown that the characterized isolates can be grouped in large clusters, an indication of their clonality, but nevertheless posses enough diversity to distinguish variation between isolates. One of the advantages of RAPD assays is that it screens over the whole genome and a high fraction of the loci (bands) turn out to be polymorphic, which accounts for the high values (over 0.90) of genetic diversity reported by most researchers. Despite that RAPD assays are easy to implement and have a low cost; they have not been generally accepted due to existing doubts about its

reproducibility in different laboratories. However, the combination of RAPD assays with techniques having a finer resolution, such as DNA microarrays, would allow for a much finer differentiation between *M. tuberculosis* isolates [29]. Tazy and collaborators offer an interesting discussion regarding this issue [39]. Another technique that generates complex banding patterns is the amplification of variable number of tandem repeats (VNTR) regions, which in mycobacteria are known as Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRUs). Assays based on MIRUs have been of great aid for assessing the genetic diversity between collections of isolates and reach a resolution comparable to that obtained with either RAPD or RFLP assays, with the added advantage over these two latter techniques of being highly reproducible and not requiring of Southern blot hybridization, respectively. Recent studies made in Taipei [40], Burkina Faso [41], India [42], Spain [43] and Brazil [44] have demonstrated the usefulness of MIRUs in the genotyping of local strains and in the establishment of the above-mentioned characteristics of lineages. The data generated have been compiled in databases, which similarly to databases of spoligotypes, make it possible to compare the information generated worldwide. Other authors have analyzed genetic diversity by means of SNPs, which use is increasingly replacing that of RFLPs [27]. However, the main application of SNPs is to establish evolutionary relations between lineages of *M. tuberculosis*, as discussed above in this Chapter.

Applications of molecular techniques in the diagnosis and epidemiologic management of TB

The identification of the causal agent of a case of TB has implications in the control and management of the disease. For example, a study made in the US., revealed the presence of *M. bovis* among the isolates from a TB surge in San Diego. The cases related with *M. bovis* were more frequent among the Hispanic community, in particular among Mexicans. The authors of that study attributed such cases to the consumption of unpasteurized dairy products, although not discarding the possibility of a human-human transmission of the disease [6]. Recently, a study determined the presence in Mexico of an isolate of *M. bovis* in a set of 45 clinical isolates, which suggests that this member of the MTBC can have a relevant presence among TB cases in that region [38].

Techniques of molecular typification have extended the knowledge of the epidemiologic behavior of the pathogen. For instance, due to genotyping using molecular typification techniques it has been established that recent

transmission occurs in some countries with high economic level, which have a low incidence of TB. It was long believed that new cases of TB were mainly due to endogenous reactivation, however several molecular epidemiologic studies in the US, the Netherlands and Denmark have demonstrated that recent transmission of TB accounted for nearly a 40% of the cases, given that these could be clustered together, i.e., groups of isolates having very similar or identical DNA profiles [17]. Another way to assess the role of recent transmission is to identify cases of exogenous reinfection in patients with recurrence of TB. When patients suffer a second episode of TB, this may be due to reactivation of the strain or to infection with a different strain. In the former case, the RFLP banding pattern will be identical, which would not happen in the case of exogenous reinfection [4].

A second contribution of molecular epidemiology studies is the identification of chains of transmission that could not be established by traditional surveillance methods. A number of studies have demonstrated that traditional surveillance, based on the following of contacts, covers a low percentage (from a 10 to a 30%) of the related cases that are detected through molecular techniques [18]. A higher coverage of related cases has allowed for establishing risk groups or areas in which active transmission is occurring, cases belonging to a surge in a given region, or cases associated to migratory displacements.

In fact, thanks to the genotyping of *M. tuberculosis* isolates throughout the world, the existence of genetic variability in the pathogen and the association of certain genotypes to particular world's regions is now well established [45, 46, Figure 4]. For every genotyping technique groups or genotypes of *M. tuberculosis* have been determined, however, efforts have been made to unify the existing nomenclatures (Table 2). Thus, 4 large lineages of *M. tuberculosis* identified by LSPs have been recognized: the Indo-Oceanic lineage present in east Africa, southeast Asia and southern India; the East Asian lineage found in eastern Asia, Russia and South Africa; the East African-Indian lineage mostly isolated in east Africa, northern India and Pakistan; and the Euro-American, also called Euro-American-African lineage [46] distributed in America, Europe, the Middle East and northern Africa. Two additional lineages have been recognized formed by isolates of *M. africanum* subtypes 1 and 2, a species having high incidence in African countries [25]. As shown in Table 2, each one of the lineages contains subgroups that were previously identified by spoligotyping or by analysis of SNPs [45, 47]. Recent studies have confirmed the relation between ethnic groups and genotypes of *M. tuberculosis* predominant in each region, which is preserved when such groups migrate to other regions [46, 48]; however, those studies involve recent migration events, for which it cannot be stated

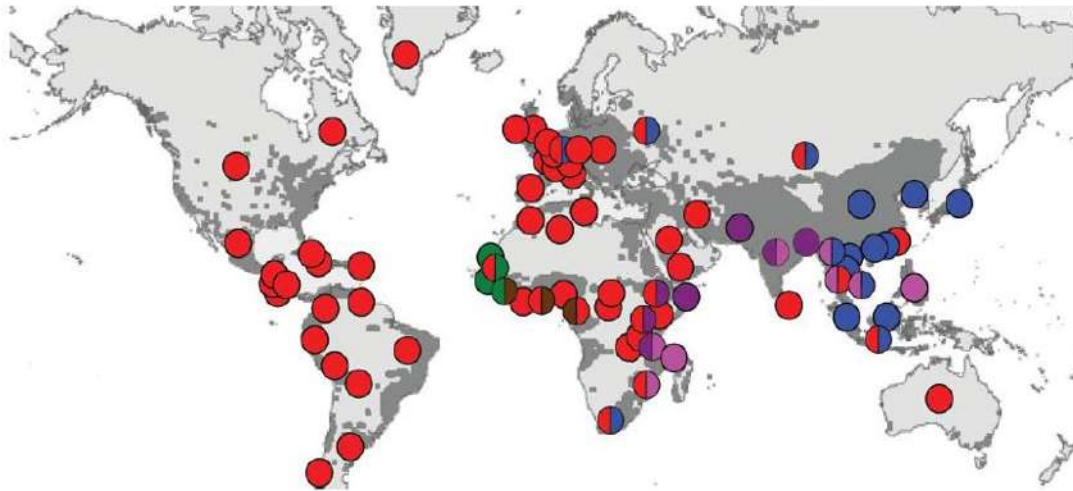


Figure 4. Geographic distribution of TB lineages adapted to particular human groups. Red: Euro-American lineage; blue: East Asian lineage; purple: East African-Indian lineage; brown and green: West African (*M. africanum*) lineage 1 and lineage 2, respectively; magenta: Indo-Oceanic lineage. Reproduced from reference [27] under the terms of the Creative Commons license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Table 2. Comparison of terminology and molecular markers of the six principal lineages of *M. tuberculosis* and *M. africanum*.

	Lineage 1	Lineage 2	Lineage 3	Lineage 4	Lineage 5	Lineage 6
SNP (Sreevatsan et al ⁴)	Principal genetic group 1	Principal genetic group 1	Principal genetic group 1	Principal genetic groups 2 and 3	Principal genetic group 1	Principal genetic group 1
SNP (Baker et al ¹³)	Lineage IV	Lineage I	Lineage III	Lineage II	Not done	Not done
LSP (Gagneux et al ¹⁶)	Indo-Oceanic lineage	East Asian lineage	East African-Indian lineage	Euro-American lineage	West African lineage I	West African lineage II
SNP (Gutacker et al ¹⁰)	Cluster I	Cluster II	Cluster II.A	Clusters III-VII	Not done	Not done
SNP (Filliol et al ¹⁴)	Cluster group 1	Cluster group 2	Cluster group 3a	Cluster groups 3b-6b	Not done	Not done
Spoligotyping (Brudey et al ¹²)	EAI	Beijing	CAS	Haarlem, LAM, T, X	AFRI2	AFRI1
LSP marker ¹⁸	RD239	RD105	RD750	Pks15/1 Δ7bp	RD711	RD702
SNP marker	OryR C37T ¹¹	Rv3815c G81A ¹⁸	RpoB T2646G ¹¹	KatG T1388G ⁴ RpoB C3243T ¹¹	Not known	Not known
Geographical association	East Africa, southeast Asia, south India	East Asia, Russia, South Africa	East Africa, north India, Pakistan	Americas, Europe, north Africa, middle east	Ghana, Benin, Nigeria, Cameroon	Senegal, Guinea-Bissau, The Gambia
Comments	Similar to ancestor based on presence of TbD1 ^{16,17}	..	..	..	Traditionally known as <i>M. africanum</i> subtype 1 (Clade 1)	Traditionally known as <i>M. africanum</i> subtype 1 (Clade 2)

Reprinted from The Lancet Infectious Diseases 7 (5), Gagneux S and PM Small, Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development, pages 328-337, Copyright (2009), with permission from Elsevier. Reference [45].

that such a relation is completely stable. Epidemiologic surveillance in several world regions made possible to further characterize each one of the lineages. For example, a study established that the more common spoligotypes in Burkina Faso were the LAM, T and Harlem, all belonging to

the Euro-American lineage [41]. This same study did not find significant correlations between the Euro-American lineage and antibiotic resistance or coinfection with HIV [41]. On the contrary, it was observed that the dominant genotype in the Taipei region was Beijing, which exhibits a higher frequency of antibiotic resistance [40]. This is consistent with findings of a study carried on in the US of two strains responsible of TB surges in the country, HN878 and W4 that were previously assigned to the Beijing genotype, which present an enhanced virulence and a larger capacity to inhibit the inflammatory response than the laboratory control strain H37Rv and the CDC1551 strain that does not belong to the Beijing genotype [49]. A combination of molecular techniques lead to the identification in Spain of a new strain that only through MIRU-VNTRs could be related with strains of the LAM groups of the Euro-American lineage [43]. Such strain appears to have appeared in Spain during the past decade, given that the RFLP patterns and spoligotyping are identical among isolates, which indicates recent transmission. The above-mentioned facts have conducted to believe that each lineage may have phenotypic particularities influencing their virulence and transmissibility [33, 49], which underlines the importance of combining classical and molecular epidemiology during surveillance of TB surges, both at local and worldwide scales.

Concluding remarks

After nearly 20 years of research, a number of molecular tools are currently available allowing for establishing the genetic structure of populations of *M. tuberculosis* and its allied species, the propensity of certain groups to an enhanced virulence or antibiotic resistance, the association of genotypes with particular human groups, the phylogenetic relations between members of the MTBC and the evolutionary process they have undergone. These molecular genetics tools also allow for identification of species and members of the MTBC that are present in clinical samples. In front of the accumulation of information and available tools, it becomes interesting, and even necessary, to onset a new stage having the priorities of evaluating such techniques in clinical diagnosis, their standardization, and their implementation in laboratories, in particular in developing countries. While this happens, the data generated by molecular epidemiologic regional studies will enable to guide the campaigns to control and prevent TB, such that the goal of the WHO of eradicating the disease becomes more feasible, particularly in high incidence zones.

References

1. Bauquerez, R., Blanc, L., Bierrenbach, A., Brands, A., Ciceri, K. *et al.* 2009, World Health Organization Report 2009.
2. Tiruvilumala, P., and Reichman, L. B. 2002, *Annu. Rev. Public Health.* **23**: 403-426.
3. Mostowy, S. and Behr, M. A. 2005, *Clin. Chest Med.* **26**(2): 207-216.
4. Burgos, M.V. and Pym, A.S. 2002, *Eur. Resp. J.* **20**, Supplement 36: 54S-65S.
5. Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F.A.K., de Kantor, I. and Meslin, F.X., 1998, *Emerg. Infect. Dis.* **4**(1): 59-70.
6. LoBue, P. A., Betacourt, W., Peter, C. and Moser, K. S. 2003, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **7**(2): 180-185.
7. Grange, J.M. 2001, *Tuberculosis*, **81**(1):71-77.
8. Thoen, C.O. and LoBue, P.A. 2007, *Lancet*, **369** (9569): 1236-1238.
9. Ayele, W. Y., Neill, S., D., Zinsstag, J., Weiss, M. G., and Pavlik, I. 2004, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **8**(8): 924-937.
10. Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirol, M. L. and Besnier, J. M. 2009, *J. Clin. Microbiol.* **47**(4): 1249-1251.
11. Boniotti, M. B., Gorla, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zanoni, M., Zoppi, S. *et al.* 2009, *J. Clin. Microbiol.* **47**(3): 636-644.
12. Arnold, C. 2007, *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 120-128.
13. Huard, R. C., Lazzarini, L. C. O., Butler, E. R., van Soolingen, D. and Ho, J. L. 2003, *J. Clin. Microbiol.* **41**(4): 1637-1650.
14. Talenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C. and Bodner, T. 1993, *J. Clin. Microbiol.* **31**(2):175-178.
15. Takewaki, S. I., Okuzumi, K., Manabe, I., Tanimura, M., Miyamura, K., Nakahara, K. I., Yazaki, Y., Ohkubo A. and Nagai, R. 1994, *Int. J. Syst. Bacter.* **44**(1): 159-166.
16. Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwig, W. and Mauch, H. 1998, *J. Clin. Microbiol.* **36**(1): 139-147.
17. van Soolingen, D. 2001, *J. Intern. Med.* **249**: 1-26.
18. Mathema, B., Kurepina, N. E., Bifani, P. J. and Kreiswirth, B. N. 2006. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**(4): 658-685.
19. Donoghue, H. D. 2008, *Paleomicrobiology: Past Human Infections*. Raoult, D and Drancourt, M (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 75-97.
20. Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U., Meier, A. Wrede, A., Kiekenbeck, M., Bange, F. C. and Böttger, E. C. 1993, *J. Clin. Microbiol.* **31**(11):2882-2889
21. Frothingham, R., Hills, H. G., and Wilson, K. H. 1994, *J. Clin. Microbiol.* **32**(7):1639-1643.
22. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S. and Musser, J. M. 1997, *PNAS.* **94**:9869-9874.
23. Hughes, A. L., Friedman, R., and Murray, M. 2002, *Emer. Infect. Dis.* **8**(11):1342-1346.

24. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., *et al.* 2002, PNAS, **99**(6):3684-3689.
25. Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B. C., Narayanan, S., Nicol, M. *et al.* 2006, PNAS **103**(8): 2869-2873.
26. Gutacker, M. M., Smoot, J. C., Migliaccio, C. A. L., Ricklefs, S. M., Hua, S., Cousins, D. V., Gravis, E. A. *et al.* 2002, Genetics, **162**:1533-1543.
27. Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P. M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J. C. *et al.* 2008, PLoS Biology, **6** (12):e311.
28. Saboor, S.A., Johnson, N. M. and McFadden, J. 1992, Lancet. **339**:1012-1015.
29. Díaz, R., Siddiqi, N. and Rubi, E. J. 2006, Tuberculosis. **86**:314-318.
30. Brudey, K., Driscoll, J. R., Rigouts, L., Prodinger, W. M., Gori, A., Al-Hajoj, S. A., Allix, C., Aristimuño, L., Arora, J. *et al.* 2006, BMC Microbiology. **6**:23.
31. Murray, M. and Nardell, E. 2002, Bulletin of the World Health Organization **80**(6): 477-482.
32. van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E. W., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. and van Embden, J. D. A. 1995, J. Clin. Microbiol. **33**(12): 3234-3238.
33. Nicol, M. P. and Wilkinson, R. J. 2008, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **102**(10): 955-65.
34. Linton, C. J., Jalal, H., Leeming, J. P. and Millar, M. R.. 1994, J. Clin. Microbiol. **32**(9): 2169-2174.
35. Harn, H. J., Shen, K. L., Ho, L. I., Yu, K. W., Liu, G. C., Yueh, K. C. and Lee, J. H. 1997, J. Clin. Pathol. **50**: 505-508.
36. Zhang, Q., Kennon, R., Koza, M. A., Hulten, K. and Clarridge III, J. E. 2002, J. C. Microbiol. **40**(4): 1134-1139.
37. Esteban, J., Fernández-Roblas, R., Ortiz, A. and García-Cía, J. I. 2006, Clin. Microbiol. Infect. **12**(7): 677-679.
38. Vázquez-Marrufo, G., Marín-Hernández, D., Zavala-Páramo, M.G., Vázquez-Narvaez, G., Álvarez-Aguilar, C. and Vázquez-Garcidueñas, M.S. 2008, Can. J. Microbiol. **54**:610-618.
39. Tazi, L., Kreiswirth, B., Carrière, C. and Tibayrenc, M. 2002, Infect. Genet. Evol. **2**: 153-158.
40. Dou, H. Y., Tseng, F. C., Lin, C. W., Chang, J. R., Sun, J. R., Tsai, W. S., Lee, S. Y., Su, I. J. and Lu, J. J. 2008, BMC Infect. Dis. **8**: 170.
41. Godreuil, S., Torrea, G., Terru, D., Chevenet, F., Diagbonga, S., Supply, P., Van de Perre, P., Carriere, C. and Bañuls, A. L. 2007, J Clin. Microbiol. **45**(3): 921-927.
42. Stavrum, R., Myneedu, V. P., Arora, V. K., Ahmed, N. and Grewal, H. M. S. 2009, PLoS ONE **4**(2): e4540.
43. López-Calleja, A. I., Gavín, P., Lezcano, M. A., Vitoria, M. A., Iglesias, M. J., Guimbao, J., Lázaro, M. A., *et al.* 2009, BMC Pulmonary Medicine. **9**: 3.
44. Lazzarini, L. C. O., Huard, R. C., Boechat, N. L., Gomes, H. M., Oelemann, M. C., Kurepina, N., Shashkina, E. *et al.* 2007, **45**(12): 3891-902.
45. Gagneux, S. and Small, P. M. 2007, Lancet Infect. Dis. **7**(5): 328-337.

46. Reed, M. B., Pichler, V. K., McIntosh, F., Mattia, A., Fallow, A., Masala, S., Domenech, P. *et al.* 2009, *J. Clin. Microbiol.* **47**(4): 1119-1128.
47. Sebban, M., Mokrousov, I., Rastogi, N., and Sola, C. 2002, *Bioinformatics* **18** (2): 235-243.
48. Baboolal, S., Millet, J., Akpaka, P. E., Ramoutar, D. and Rastogi, N. 2009, *J. Clin. Microbiol.* **47**(6):1911-1914.
49. Tsenova, L., Ellison, E., Harbacheuski, R., Moreira, A. L. Kurepina, N., Reed, M. B., Mathema, B., Barry III C. E. and Kaplan, G. 2005, *J. Infect. Dis.* **192**: 98-106.
50. Möstrom, P., Gordon, M., Sola, C., Ridell, M., Rastogi, N. 2002, *Clin. Microbiol. Infect.* **8**(11):694-704.

**CAPÍTULO 3: RAPD DISCLOSES HIGH MOLECULAR DIVERSITY OF
Mycobacterium tuberculosis FROM MICHOACÁN, MEXICO**

ARTÍCULO CIENTÍFICO

. Publicado como: Guillén-Nepita A.L., Vázquez-Marrufo G., F., Blanco-Guillot, F.,
Figueroa-Aguilar, G. A. and Vázquez-Garcidueñas, M.A.* (2013) RAPD
DISCLOSES HIGH MOLECULAR DIVERSITY OF *Mycobacterium tuberculosis*
FROM MICHOACÁN, MEXICO. New Microbiológica 36(413-418)

RAPD discloses high molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Michoacán, Mexico

A.L. Guillén-Nepita^{1,3}, G. Vázquez-Marrufo¹, E.T. Blanco-Guillo², G.A. Figueroa-Aguilar², M.S. Vázquez-Garcidueñas³

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo;

²Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán;

³División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

SUMMARY

Random amplified polymorphism DNA (RAPD) is an easy, inexpensive technique for the characterization of pathogens in low-income countries. In this study we used RAPD to assess the genetic diversity of a small collection of isolates of mycobacteria from the Mexican state of Michoacán. In contrast with the low annual tuberculosis incidence in Michoacán relative to the national average, we found a high molecular diversity value suggesting high population diversity of *M. tuberculosis* in the studied region. Our findings justify further typing efforts with other molecular tools such as MIRUS and spoligotyping.

KEY WORDS: *Mycobacterium tuberculosis*, RAPDs, Mexico, Genetic diversity.

Received March 04, 2013

Accepted June 14, 2013

In 2010, the tuberculosis (TB) incidence in Mexico averaged 16.8 cases per 100,000 inhabitants; Michoacán and Guanajuato reported 7.7 and 7.4 cases per 100,000 inhabitants, respectively (Secretaría de Salud, 2011). Typing of *M. tuberculosis* and molecular epidemiological studies of TB currently rely on IS6110-RFLP (van Embden *et al.*, 1993), spoligotyping (Kamerbeek *et al.*, 1997) and MIRU-VNTR (Supply *et al.*, 2006).

These molecular techniques are complex, lengthy and expensive, so the variation of the bacterial genome in low-income settings with a high prevalence of TB can be assessed more simply, quickly and inexpensively by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990).

The RAPD technique is one of the molecular tools available for tracking pathogenic bacteria outbreaks (Li *et al.*, 2009). Local studies made in clinic and research laboratories can rely on RAPD for the characterization of a wide range of bacteria including *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (Holley *et al.*, 2008; Dione *et al.*, 2012), *Campilobacter ssp* (Adzitey *et al.* 2012), and *M. tuberculosis* (Richner *et al.*, 1997; Tazi *et al.*, 2004; Vázquez-Marrufo *et al.*, 2008; Hashemi *et al.*, 2012). In this work we assessed by RAPD the molecular diversity of a small sample of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from prevalent TB cases reported in the states of Michoacán and Guanajuato, Mexico, of which available epidemiological data were examined. The results of this preliminary study justify extending joint efforts with the regional public health authorities for characterization by MIRUS and spoligotyping of a larger number of local strains of *Mycobacterium tuberculosis*.

The studied strains derived from 33 human samples of sputum and extrapulmonary fluids (cere-

Corresponding author

Dr. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas
Ave. Rafael Carrillo
esq. Dr. Salvador González Herrejón s/n
Col. Cuauhtémoc, Morelia, Michoacán Mexico - C.P. 58020
E-mail: marisolvaz@yahoo.com

brospinal fluid and urine) from the state of Michoacán provided by the State Public Health Laboratory and the General Hospital "Dr. Miguel Silva" between 2009 and 2010, and two sputum samples were obtained from the neighboring state of Guanajuato through the State General Hospital. Epidemiological data were collected anonymously (Table 1). *M. tuberculosis* H37Rv was used as a reference strain. The samples were processed as indicated by the Institute of Epidemiological Diagnosis and Reference (InDRE, http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/interior/lab_micobacterias.html). Isolate species were identified from IS6110 amplification reports by InDRE. Isolates failing to produce an amplicon were considered mycobacteria other than tuberculosis (MOTT).

The mycobacteria colonies from axenic cultures were inactivated by incubation in 400 µL of lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH8, 0.2% SDS, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA) at 80°C for 1h, after which they were ready for genomic DNA isolation by the phenol-chloroform method (Vázquez-Marrufo *et al.*, 2008). RAPD reactions were performed in separate PCR assays using 6 different primers: N9, R8, U10, U13 (Tazi *et al.*, 2004), DG93 (Miyata *et al.*, 1995) and DG102 (Chansiripornchai *et al.*, 2000). The reaction mix and the amplification program followed Williams *et al.* (1990).

Amplification products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels. Assays were carried out in triplicate and only reproducible bands were taken into account for analysis. The size of the obtained bands was calculated using Quantity One 4.4.1 Software (BIORAD, USA). All bands in the gel below 4K were analyzed by the MATCH function, and a presence/absence binary matrix was built. For comparison purposes, Shannon's index (H') was calculated using $\log_2$, $\log_{10}$ and $\ln$ (Shannon, 1948). Simpson's index (D) and dendrograms were obtained from the matrix using PAST software and Ward's method (Hammer *et al.*, 2001).

The epidemiological traits of patients from whom isolates were obtained are listed in Table 1. No epidemiological links were reported between these patients. Diabetes mellitus type II (DM-II) was the most frequent co-morbidity factor, which is consistent with national statistics (Secretaría de Salud, 2009). Only three isolates (8.5%) were

derived from extrapulmonary TB patients diagnosed with tuberculous meningitis (TBM).

Through RAPD we identified 84 bands suitable for analysis ranging in size from 370 to 3500 bp, from which 43 were present in less than 10% of the isolates. The dendrogram (Figure 1a, A-C) shows that all 35 isolates and the H37Rv strain can be grouped in 3 main clusters, from which 13 groups of closely related isolates derive (Figure 1a, G1-G13). The D value for the RAPD technique was 0.925, showing the usefulness of RAPD typing, even in cases of clonal organisms such as *M. tuberculosis*.

Shannon's Index is not commonly applied for assessing the diversity of *M. tuberculosis*, except for a single report of Vázquez-Marrufo *et al.* (2008). The Shannon's Index values we calculated were: $H'_2=3.4749$, $H'_n=2.4086$ and $H'_{10}=1.46$ - a value similar to $H'_{10}=1.54$ reported for an independent set of strains from Mexican patients (Vázquez-Marrufo *et al.*, 2008). These values exceed those reported for human associated *Streptococcus aureus* ($H'_2=0.56$) (Reinoso *et al.*, 2004), and for phylogenetic subgroups of human *Escherichia coli* ($H'_n=0.6598$) (Carlos *et al.*, 2010), but resemble those of invasive populations of *Streptococcus pneumoniae* (H'_2 from 1.92 to 3.75) (de la Pedralosa *et al.*, 2009), and environmental *E. coli* populations (H'_n from 2.6191 to 2.9264) (Nelson *et al.*, 2008).

These values also reflect the lack of clustering observed in the dendrogram, and suggest high diversity between isolates. Other researchers in different settings (Richner *et al.*, 1997; Tazi *et al.*, 2004) have also observed high molecular diversity of *M. tuberculosis* isolates. In contrast to the report of Vázquez-Marrufo *et al.* (2008), we were able to examine possible links between epidemiological traits and RAPD patterns. Diverse patterns were found between isolates obtained from patients with common co-morbidity, age or geographical region.

TBM strains, for example, are dispersed throughout the dendrogram (Figure 1a, G4, G5, and G8) as anticipated by the absence of a common index case. Thus, in our region TBM may be caused by more than one strain, as also suggested by regional epidemiological information. Each year since 2008, 1 to 2% (3 to 7 cases) of the reported total annual incidences of TB have been of central nervous system tuberculosis (CNST) includ-

TABLE 1 - Epidemiological traits of patients included in this study.

Patient	Disease location	Age	Gender			
1	Pulmonary	57	M	3	None	001, 011
2	Renal/No TB	24	F	1	None	002
3	Meningeal	60	M	7	Cysticercosis	003
4	Meningeal	nd	M	1	None	004
6	Pulmonary	67	F	5	Diabetes	006
7	Pulmonary	37	M	7	Diabetes	007
8	Pulmonary	66	M	5	Alcoholism	008
9	Pulmonary	24	F	5	None	009
10	Pulmonary	88	M	1	None	010
11	Pulmonary	34	M	3	None	012
12	Pulmonary	59	M	3	Alcoholism	013, 014
13	Pulmonary	53	F	1	Diabetes	015
15	Pulmonary	67	M	6	Diabetes	017
16	Pulmonary	29	M	7	None	018
17	Pulmonary	53	F	1	None	019
18	Pulmonary	55	F	7	Diabetes	020
19	Pulmonary	89	M	3	None	021
20	Pulmonary	77	M	1	None	022
21	Pulmonary	Nd	F	Nd	None	023
22	Pulmonary	48	M	2	Diabetes	024
23	Pulmonary	55	F	1	Diabetes	025
24	Meningeal	31	M	1	None	026
25	Pulmonary	19	M	Nd	None	027
26	Pulmonary	87	F	Nd	Diabetes	028
27	Pulmonary	39	M	7	I.V. Drug User	029
28	Pulmonary	29	F	7	None	030
29	Pulmonary	Nd	F	1	None	031
30	Pulmonary	30	F	8	None	032
31	Pulmonary	20	M	7	Malnutrition	033
32	Pulmonary	55	F	Gto	Diabetes	034
33	Pulmonary	Nd	M	Gto	None	035

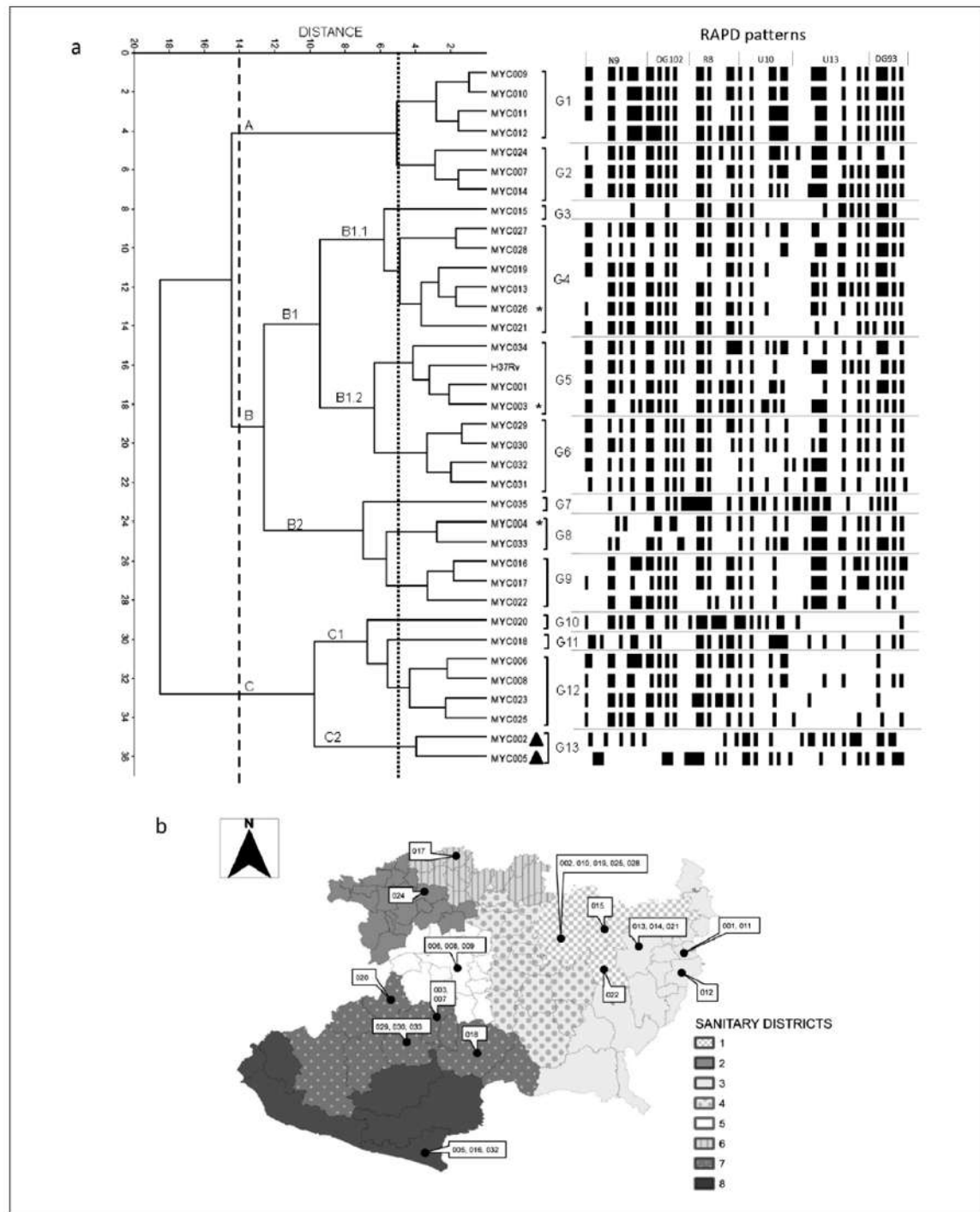


FIGURE 1 - RAPD - based dendrogram and geographic location of the MYC isolates. a) Dendrogram obtained by Ward's method. Dashed line: distance value of 14. Dotted line: distance value of 5. RAPD patterns are a graphic representation of presence (black area) or absence (white area) of each of the 84 bands obtained across the 6 primers used. (*) TBM isolates. (5) MOTT isolates. b) Geographic location of MYC strains from Michoacán.

ing TBM (SINAVE, 2012), all of which have occurred dispersed throughout the state of Michoacán. Such incidence rates and the dispersed geographical distribution of TBM cases agree with our RAPD results.

Therefore, we are interested in this seemingly diverse mycobacterial population, particularly within the TBM isolates. Further typing of a larger strain sample including those from the present study is currently being made. We emphasize that the use of a fast, inexpensive technique such as RAPD may reveal interesting data from isolate collections and is useful as a preliminary tool to direct research to fruitful directions.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Grant 16.4 from Coordinación de la Investigación Científica-U.M.S.N.H. ALGN is indebted to Doctoral fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- ADZITEY F., RUSUL G., HUDA N., COGAN T., CORRY J. (2012). Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Int. J. Food Microbiol.* **154**, 197-205.
- DIONE M.M., GEERTS S., ANTONIO M. (2012). Characterisation of novel strains of multiply antibiotic-resistant *Salmonella* recovered from poultry in Southern Senegal. *J. Infect. Dev. Ctries.* **6**, 436-442.
- CARLOS C., PIRES M.M., STOPPE N.C., HACHICH E.M., SATO M.I., GOMES T.A., AMARAL L.A., OTTOBONI L.M. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* **10**, 161.
- CHANSIRIPORNCHAI N., RAMASOOT P., BANGTRAKULNONT A., SASIPREEYAJAN J., SVENSON, S.B. (2000). Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing Avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 221-225.
- DE LA PEDROSA E.G., BAQUERO F., LOZA E., NADAL-SERRANO J.M., FENOLL A., DEL CAMPO R., CANTÓN R. (2009). High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (2000-07). *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 1165-1169.
- HAMMER O., HARPER D.A.T., RYAN P.D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontol. Electron.* **4**, 9.
- HASHEMI A., SHOJAEI H., HEIDARIEH P., ASLANI M. M., NASER A.D. (2012). Genetic diversity of Iranian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *New Microbiol.* **35**, 61-65.
- HOLLEY R., WALKTY J., BLANK G., TENUTA M., OMINSKI K., KRAUSE D., NG L.K. (2008). Examination of *Salmonella* and *Escherichia coli* translocation from hog manure to forage, soil, and cattle grazed on the hog manure-treated pasture. *J. Environ. Qual.* **37**, 2083-2092.
- KAMERBEEK J., SCHOOLS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., ET AL. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 907-914.
- LI W., RAOULT D., FOURNIER P.E. (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 892-916.
- MIYATA M., AOKI T., INGLIS V., YOSHIDA T., ENDO M. (1995). RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. *J. App. Bacteriol.* **79**, 181-185.
- NELSON M., JONES S.H., EDWARDS C., ELLIS J.C. (2008). Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping. *Dis. Aquat. Organ.* **81**, 53-63.
- REINOSO E., BETTERA S., FRIGERIO C., DIRENZO M., CALZOLARI A., BOGNI C. (2004). RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiol. Res.* **159**, 245-255.
- RICHNER S., MEIRING J., KIRBY R. (1997). A study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in the Eastern Province of South Africa using random amplified polymorphic DNA profiling. *Electrophoresis.* **18**, 1570-1576.
- SECRETARÍA DE SALUD. (2009). Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. Mexico City.
- SECRETARÍA DE SALUD. (2011). Situación Actual de la Tuberculosis en México. Avances y Desafíos. Mexico City.
- SHANNON C.E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal.* **27**, 379-423.
- SINAVE (2012). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. <http://www.sinave.gob.mx> Accessed May 15th 2013.
- SUPPLY P., ALLIX C., LESJEAN S., CARDOSO-OELEMANN M., RUSCH-GERDES S., WILLERY E., ET AL. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4498-4510.
- TAZI L., EL BAGHDADI J., LESJEAN S., LOCHT C., SUPPLY P., TIBAYRENC M., BANULS A.L. (2004). Genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tu-*

- berculosis* in Casablanca, a Moroccan city with high incidence of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 461-466.
- VAN EMBDEN J.D., CAVE M.D., CRAWFORD J.T., DALE J.W., EISENACH K.D., GICQUEL B., ET AL. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 406-409.
- VAN BELKUM, VAN PELT-VERKUIL E., HAYS J.P. (2009). The application of randomly amplified DNA analysis in the molecular epidemiology of microorganisms. In D.A. Caugant (ed.) *Molecular Epidemiology of Microorganisms, Methods in Molecular Biology*. Vol. 55. Humana Press, New York USA. 37-46.
- VÁZQUEZ-MARRUFO G., MARÍN-HERNÁNDEZ D., ZAVALA-PÁRAMO M.G., VÁZQUEZ-NARVÁEZ G., ÁLVAREZ-AGUILAR C., VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS M.S. (2008). Genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexican patients. *Can. J. Microbiol.* **54**, 610-618.
- WILLIAMS J.G., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.

CAPÍTULO 4: LINAJES DE *M. tuberculosis* CIRCULANTES EN MICHOACÁN

INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia que la tuberculosis (TB) representa como problema de salud pública mundial, la información epidemiológica que permita conocer el comportamiento de la enfermedad tiene gran relevancia en el control y erradicación de ésta. Además de los métodos epidemiológicos clásicos, actualmente las técnicas de análisis genético-molecular han permitido identificar de una manera cada vez más precisa las cepas de micobacterias que afectan a una población, los niveles de variación genética entre aislados clínicos y la incidencia y distribución de distintos genotipos a nivel regional y global (Mostowy y Berh, 2005; Arnold, 2007). La resolución de las técnicas genético-moleculares abarca distintos niveles de la jerarquía taxonómica, permitiendo diferenciar subespecies dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (Huard *et al.*, 2003), establecer subfamilias y evaluar las relaciones evolutivas entre éstas (van Soolingen, 2001; Mathema *et al.* 2006). Entre las aplicaciones epidemiológicas aportadas por las herramientas de genética molecular se pueden mencionar la identificación de casos debido a reactivación o por transmisión reciente (Farnia *et al.* 2008; Ferndinand *et al.* 2013), la identificación de patrones de resistencia a drogas presentes en ciertos grupos de cepas (Glynn *et al.* 2002; loerger *et al.* 2010) y la descripción de la dinámica de transmisión dentro de poblaciones específicas (Gehre *et al.* 2013). Conforme ha aumentado el número de estudios de epidemiología molecular se ha observado la predominancia de ciertos linajes en las regiones correspondientes (Gutierrez *et al.* 2006; Lazzarini *et al.* 2007; Asiimwe *et al.* 2008), la presencia de linajes cosmopolitas (Brudey *et al.* 2006) y también se ha monitoreado la introducción de linajes foráneos por eventos de migración (Alonso *et al.* 2008; Guillén-Nepita *et al.* 2010; Kamper-Jørgensen *et al.* 2011; Varghese *et al.* 2013). Estos datos subrayan la necesidad del monitoreo de los diversos genotipos a nivel regional y global como una herramienta adicional a las medidas recomendadas por la OMS para la erradicación de esta enfermedad.

Los marcadores moleculares utilizados con fines epidemiológicos en la caracterización de *M. tuberculosis* incluyen el análisis de una región de repetidos directos (DR) que se encuentra en el cromosoma de todos los miembros del CMTB (Kamerbeek *et al.*, 1997). La región de repetidos directos contiene un número variable de repeticiones de una secuencia bien conservada de 36 pb, intercaladas con secuencias espaciadoras no repetitivas de 34 a 41 pb. Las variaciones se deben a eventos de recombinación homóloga entre las secuencias DR o a re-arreglos de secuencias de inserción (Kamerbeek *et al.*, 1997). Dado que dichos eventos son unidireccionales, se asume que aquellas cepas que compartan las mismas secuencias espaciadoras comparten un ancestro común. La técnica de *spoligotyping* ha permitido clasificar a los aislados de *M. tuberculosis* y otros miembros del CMTB en familias genéticas, clados o espoligotipos, haciendo una distinción a nivel intraespecífico que arroja mayor información acerca de las cepas circulantes en ciertas regiones. La abundante información que puede generar una herramienta como el *spoligotyping* se ve limitada cuando existe un genotipo predominante, ya que su poder de resolución es limitado (Mathema *et al.* 2006). Sin embargo, con base en esta herramienta se han logrado describir la estructura de poblaciones de *M. tuberculosis* en regiones de alta y baja incidencia. En regiones de alta incidencia es común encontrar un elevado número de genotipos, incluyendo genotipos no reportados previamente, con porcentajes de agrupamientos de alrededor del 80%, debido a lo cual uno de los genotipos (o un grupo filogenéticamente relacionado, como los clados de una misma familia) se muestra como predominante (Borsuk *et al.* 2005; Dong *et al.* 2010; Lahlou *et al.* 2012). Por el contrario, en las regiones de baja incidencia el porcentaje de agrupamiento es menor o cercano al 50% y los grupos son pequeños, por lo que los grupos dominantes suelen observarse en niveles de clasificación mayores, como linajes (Murray, 2002; Dahle *et al.* 2003; Fenner *et al.* 2012; Kamper-Jørgensen *et al.* 2012).

Para resolver los grandes grupos que generalmente son formados por dicha herramienta y encontrar relaciones epidemiológicas más precisas, se ha desarrollado la tipificación por regiones de repetidos en tándem. Un grupo de 15

loci donde se ubican estas secuencias repetitivas se ha establecido como herramienta de tipificación epidemiológica, siendo una versión más amplia (24 *loci*) lo suficientemente robusta como para inferir relaciones evolutivas entre grupos de aislados de *M. tuberculosis* (Supply *et al.* 2006). A pesar de la información que este tipo de herramientas provee sobre las cepas circulantes, su uso no es rutinario en México y se limita a los trabajos de investigación regionales (Molina-Torres *et al.* 2010; Nava-Aguilera *et al.* 2011; López-Rocha *et al.* 2013). En el estado de Michoacán no se cuenta con información sobre los espoligotipos de *M. tuberculosis* presentes. Se ha encontrado que la tuberculosis tiene un comportamiento complejo y regionalizado en el estado, y que las cepas circulantes tienen un fondo genético diverso (Guillen-Nepita *et al.* en preparación), aunque la identidad de las cepas no fue establecida. Los resultados previamente obtenidos mediante RAPDs no muestran un genotipo predominante (Guillén-Nepita *et al.* 2013), por lo que no se espera que exista un patrón de spoligotipo o MIRU-VNTR predominante en la colección. En este estudio se analiza cuáles son las familias de *M. tuberculosis* que circulan en Michoacán y se discuten las implicaciones epidemiológicas de su presencia.

HIPÓTESIS

Las cepas de *M. tuberculosis* circulantes en el estado de Michoacán pertenecen a diversas familias y linajes, sin predominancia de alguno en particular.

OBJETIVO GENERAL

Tipificar genéticamente aislados del complejo *M. tuberculosis* obtenidos de pacientes diagnosticados clínicamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los linajes y familias de *M. tuberculosis* presentes en la región
- Analizar el fondo genético de cepas con características clínicas de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de material biológico.

Para este estudio se obtuvieron muestras clínicas (esputo, orina y líquido cefalorraquídeo) de pacientes con diagnóstico de tuberculosis que asistieron al Hospital General “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia Michoacán, al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, a la Clínica No. 75 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Morelia Michoacán, y el Hospital General de Guanajuato, Guanajuato. Para su inclusión en el estudio se evaluó que la cantidad de muestra fuera suficiente para desarrollar el protocolo normativo de diagnóstico de tuberculosis estipulado por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (InDRE) y para inocular en dos tubos independientes de medio de cultivo Lowenstein-Jensen (BBL). Si un segundo cultivo no se requería para la confirmación del diagnóstico del paciente, éste podía ser incluido en el estudio.

Las muestras obtenidas se procesaron en el área de bioseguridad nivel II, con prácticas de bioseguridad nivel III del Laboratorio de Microbiología del Hospital Civil “Dr. Miguel Silva”, o del Laboratorio de Micobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, en la ciudad de Morelia, Michoacán. En breve, las

muestras descontaminadas y concentradas fueron cultivadas en tubos con medio Lowenstein-Jensen (BBL), e incubados a 37°C por un máximo de 8 semanas. Los cultivos se revisaron a las 24 y 48 h para descartar la presencia de contaminantes, y posteriormente cada 7 días para registrar el crecimiento. La ausencia de crecimiento a la octava semana se registró como un cultivo negativo. Los datos epidemiológicos de los pacientes cuyos cultivos se incluyeron en el estudio fueron obtenidos de manera anónima a través de los registros de las instituciones participantes y de la base de datos SINAVE (ver capítulo 1, Materiales y Métodos).

Aislamiento de ácidos nucleicos

Para el aislamiento del ADN, las colonias de las micobacterias fueron suspendidas en 400 µL de solución de lisis (Tris-HCl 100mM, pH 8.0, SDS 0.2% NaCl 100mM y EDTA 50 mM) y se inactivaron por incubación a 80°C durante 1h. Posteriormente, la suspensión fue enfriada hasta la temperatura ambiente. En seguida se agregaron 400 µL de mezcla de fenol y cloroformo 1:1 y se agitó vigorosamente por 10min. La mezcla fue centrifugada a 9.7xg por 10 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se añadió un volumen igual de mezcla de fenol y cloroformo 1:1. Se repitieron los pasos de agitación y centrifugado. El sobrenadante se recuperó una vez más en un tubo nuevo y se agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío. Hasta este punto, el manejo se llevó a cabo en una campana de bioseguridad nivel 2, con prácticas de bioseguridad nivel 3. La mezcla fue incubada a -20°C por un mínimo de 20 min, después de los cuales se centrifugó a 9.7xg por 10 min. La pastilla de ADN fue lavada con etanol al 70%, centrifugada a 9.7xg por 10 min y secada al aire hasta evaporación completa del etanol. La pastilla de ADN obtenida se resuspendió en 30 µL de agua bidestilada estéril. La concentración de ADN se determinó mediante espectrofotometría 280 nm y 260 nm, utilizando el espectrofotómetro UNICO®, USA. A partir de éste cálculo se prepararon diluciones de trabajo con una concentración de ADN de aproximadamente 20 ng/µL.

Identificación a nivel de especie.

Con el ADN previamente obtenido se llevó a cabo la tipificación a nivel de especie de los aislados incluidos en el estudio. Para ello se utilizó la técnica del panel de tipificación del CMTB descrito por Huard y colaboradores (2006). Se utilizaron ocho juegos de oligonucleótidos. Las reacciones de amplificación se prepararon con Tris pH 8.4 20mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 0.2mM 1µM de cada oligonucleótido, 1.25 U de *Taq* Polimerasa Recombinante (Invitrogen®, USA), DMSO al 4% y 50 ng de ADN. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos con una etapa de desnaturalización por 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C, seguidos de una extensión final de 5 min a 72°C (Huard *et al.* 2003). El patrón de amplificación característico de cada especie dentro del CMTB y los oligonucleótidos utilizados se enlistan en las tablas 7 y 8, respectivamente.

TABLA 7. Patrones de amplificación de las especies del CMTB¹

ESPECIE	1 16S rRNA	2 Rv0577	3 IS1561' (MiD3)	4 Rv1510	5 Rv1970	6 Rv3877/8	7 Rv2073c	8 Rv3120
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. africanum</i> I	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>M. africanum</i> II	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>M. caprae</i>	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>M. bovis</i>	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>M. bovis</i> BCG	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. microti</i>	+	+	-	+	-	+	-	+
" <i>M. canettii</i> "	+	+	+	+	+	+	+	-
MOTT ²	+	-	-	-	-	-	-	-

¹Modificada de Huard *et al.* 2003, 2006.

²MOTT, *Mycobacterium* other than tuberculosis. Micobacteria no perteneciente al CMTB.

TABLA 8. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

USO	REGIÓN BLANCO	ETIQUETA	SECUENCIA (5'→3')	REFERENCIA
Tipificación a nivel de especie	16S rRNA	16SrRNAF	ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C	Huard <i>et al.</i> 2003; Huard <i>et al.</i> 2006.
		16SrRNAR	TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A	
	Rv0577	Rv0577F	ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA	
		Rv0577R	CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA	
	IS1561' (MiD3)	IS1561' F	GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC	
		IS1561' R	TCT	
	Rv1510	Rv1510F	AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA CCA TTG ACT	
		Rv1510R	GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC	
	Rv1970	Rv1970F	TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C	
		Rv1970R	GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC	
	Rv3877/8	Rv3877/8F	CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG	
		Rv3877/8R	CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC	
	Rv2073c	Rv2073cF	CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C	
		Rv2073cR	TCG CCG CTG CCA GAT GAG TC	
			TTT GGG AGC CGC CGG TGG TGA TGA	

	Rv3120	Rv3120F Rv3120R	GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T	
Tipificación por spoligotyping	Región de repetidos directos	DRA DRb	Biotina-GGT TTT GGG TCT GAC GAC CCG AGA GGG GAC GGA AAC	Kamerbeek <i>et al.</i> 1997
Tipificación por MIRU-VNTR	MIRU4	MIRU4F MIRU4R	GCG CGA GAG CCC GAA CTG C GCG CAG CAG AAA CGC CAG C	
	MIRU26	MIRU26F MIRU26R	TAG GTC TAC CGT CGA AAT CTG TGA C CAT AGG CGA CCA GGC GAA TAG	
	MIRU40	MIRU40F MIRU40R	GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA	
	MIRU10	MIRU10F MIRU10R	GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT	
	MIRU16	MIRU16F MIRU16R	TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC	
	MIRU31	MIRU31F MIRU31R	ACT GAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA GTG CCG ACG TGG TCT TGA T	
	Mtub04	Mtub04F Mtub04R	CTT GGC CGG CAT CAA GCG CAT TAT T GGC AGC AGA GCC CGG GAT TCT TC	
	ETRC	ETRCF ETRCR	CGA GAG TGG CAG TGG CGG TTA TCT AAT GAC TTG AAC GCG CAA ATT GTG A	Supply <i>et al.</i> 2006
	ETRA	ETRAF ETRAR	AAA TCG GTC CCA TCA CCT TCT TAT CGA AGC CTG GGG TGC CCG CGA TTT	
	Mtub30	Mtub30F Mtub30R	CTT GAA GCC CCG GTC TCA TCT GT ACT TGA ACC CCC ACG CCC ATT AGT A	
	Mtub39	Mtub39F Mtub39R	CGG TGG AGG CGA TGA ACG TCT TC TAG AGC GGC ACG GGG GAA AGC TTA G	
	QUB4156	QUB4156F QUB4156R	TGA CCA CGG ATT GCT CTA GT GCC GGC GTC CAT GTT	
	QUB11b	QUB11bF QUB11bR	CGT AAG GGG GAT GCG GGA AAT AGG CGA AGT GAA TGG TGG CAT	
	Mtub21F	Mtub21F Mtub21R	AGA TCC CAG TTG TCG TCG TC CAA CAT CGC CTG GTT CTG TA	
	QUB26	QUB26F QUB26R	AAC GCT CAG CTG TCG GAT CGG CCG TGC CGG CCA GGT CCT TCC CGA T	

Tipificación mediante spoligotyping.

Sólo las cepas identificadas previamente como miembros de la especie *M. tuberculosis* fueron tipificadas por otros marcadores moleculares. Antes de iniciar la tipificación, la calidad del ADN fue evaluada primero visualmente, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 0.5µg/mL y después mediante espectrofotometría a 280 nm y 260 nm, utilizando el espectrofotómetro NANODrop (ThermoScientific®, USA).

Para obtener múltiples copias de la región DR se utilizaron los oligonucleótidos previamente descritos, DRA y DRb (ver tabla 8). La mezcla de reacción fue la siguiente: Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 0.02 mM de cada nucleótido, 0.08 µM de DRA, 0.08 µM de DRb, 0.5U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen®, USA), 4 ng/µL de ADN y agua desionizada estéril hasta un volumen final de 50 µL. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador TGRADIENT (Biometra, Germany), mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C por 4 min; 30 ciclos de desnaturalización a 96°C

por 1min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 5 min, con una extensión final a 72°C por 5 min (Kamerbeek *et al.*, 1997).

La hibridación se llevó a cabo utilizando la membrana para spoligotyping (Ocimum Biosolutions®, India), que contiene anclados dos juegos de 43 sondas correspondientes al mismo número de secuencias espaciadoras. Tras la reacción de amplificación, 20 µL de los productos se mezclaron con 150 µL de amortiguador 2xSSPE/0.1% SDS. La mezcla se calentó a 99°C por 10 min, e inmediatamente después se colocaron en hielo. La membrana se lavó previamente en 150 mL de buffer 2xSSPE/0.1% SDS a 60°C por 5 min y se colocó sobre un soporte suave en el miniblottter (45 Scientific ®). Cada mezcla se colocó en un carril del miniblottter y se hibridó a 60°C por 60 min en una superficie horizontal. Las muestras se removieron por aspiración y la membrana se retiró para ser lavada 2 veces en 50 mL de buffer 2xSSPE/0.5% SDS, por 10 min a 60°C. Tras los lavados, la membrana se dejó enfriar, se le agregó una mezcla 2.5 µL de conjugado estreptavidina-peroxidasa (500 U/mL, Boheringer ®) en buffer 2xSSPE/0.5% SDS y se incubó 60 min a 42°C. La membrana fue lavada dos veces en 50 mL de 2xSSPE por 5 min a temperatura ambiente, sin sobrepasar los 30°C.

Para la detección del ADN hibridado, la membrana se colocó en un refractario de vidrio y se agregó una mezcla preparada en el momento de 200 µL de luminol 250 mM, 88 µL de ácido p-cumárico (90 mM) y 2 mL de Tris-HCl pH 8.5 en 17.71 mL de agua, y una mezcla de 18 mL de peróxido de hidrógeno en 2 mL de Tris-HCl 1M pH 8.5 y 18 mL de agua desionizada. La membrana se incubó durante 2 min, agitando suavemente. Al finalizar se colocó en un casete para revelado junto con una película fotográfica. Tras la exposición de la película por 10 a 15 segundos se reveló con agentes reveladores y fijadores comerciales (Kamerbeek *et al.* 1997). Las películas se revisaron para determinar la presencia o ausencia de los espaciadores en cada muestra. Las presencias se anotaron como 1 y las ausencias como 0. Los datos fueron introducidos en la base de datos MIRUVNTRplus (Allix-Béguec *et al.* 2008; Weigner *et al.* 2010) y SITVIT, para

determinar los linajes a los que pertenecía cada aislado. El bosque de espigotipos fue obtenido con ayuda del software SpolTools (Tang *et al.* 2008)

Tipificación mediante MIRU-VNTR

Para obtener los perfiles alélicos de los aislados de la colección, se amplificaron 15 regiones repetitivas del genoma micobacteriano, conforme a lo descrito por Supply y colaboradores (2006). Los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla 8. Los 15 *loci* se amplificaron en reacciones independientes. La mezcla de reacción fue la siguiente: Tris pH 8.4 20 mM, KCl 50 mM, dNTPs 0.2 mM , 0.4 µM de cada oligonucleótido, 0.4 U de *Taq* Polimerasa Recombinante (Invitrogen®, USA), DMSO 4% y de 20 a 50 ng de ADN. La concentración de MgCl₂ varió según el locus amplificado, siendo de 3 mM para MIRU4, MIRU20, MIRU40, Mtub30m Mtub39 y QUB4156; de 2.0mM para MIRU10, MIRU16 y MIRU31; y de 1.5mM para Mtub04, ETRC, ETRA, QUB11b, Mtub21 y QUB56. En todos los casos el programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 59°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min, y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en una concentración de 0.5µg/mL, al cual se aplicó un voltaje de 70V por 2.5 h. La obtención del número de repetidos presente en cada locus se llevó a cabo con la ayuda del software Quantity One® de BIORAD® (USA) y sus herramientas Bands, Bands Matching y Variable Number of Tandem Repeats.

Los datos obtenidos fueron ingresados a la base de datos MIRU-VNTRplus para su posterior análisis y la generación de un dendrograma (Allix-Béguec *et al.* 2008; Weigner *et al.* 2010).

RESULTADOS

Para este estudio se obtuvieron cultivos axénicos de las muestras de 33 pacientes diagnosticados clínicamente con tuberculosis pulmonar, 5 pacientes con diagnóstico de tuberculosis meníngea y un paciente con presunta tuberculosis renal que acudieron a las instituciones de salud participantes. El caso de presunta tuberculosis renal fue descartado al encontrarse solamente micobacterias saprófitas del tracto urinario, por lo que los datos de este paciente no se consideran en la descripción epidemiológica de la muestra. Para el resto de los casos, se transcribieron los datos epidemiológicos de interés (tabla 8) y se encontraron datos incompletos para 5 de los pacientes. Sin embargo, debido a la cantidad de muestras obtenidas, ninguna de ellas fue descartada. La edad promedio de los pacientes es de 46.9 años, con un rango de 6 a 89 años. En la muestra predominan los pacientes del género masculino (65.8%, razón M/F=1.9). El promedio de edad de los pacientes masculinos es de 47.1 años (rango de 6 a 89 años), mientras que en los pacientes femeninos es de 46.7 años (rango de 21 a 87 años). Los pacientes con edades entre los 15 y los 65 años constituyeron la mayor parte de la muestra (68.4%), seguidos de los pacientes mayores de 65 años (21.1%). En este estudio sólo se obtuvo un caso pediátrico. Más de la mitad de los pacientes (52.6%) no reportó ningún otro padecimiento que le pudiera predisponer a desarrollar la forma activa de la tuberculosis. Entre los pacientes que sí sufren de un padecimiento adyacente, 28.9% padecen Diabetes Mellitus, 5.3% padecen alcoholismo y el resto sufre de desnutrición, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cisticercosis o son usuarios de drogas intravenosas (2.6% de la muestra en cada caso). El 86.8% de los casos fueron pulmonares, mientras que 12.8% fueron extrapulmonares. Todos los casos extrapulmonares fueron casos de tuberculosis meníngea. En dos casos se obtuvo un segundo cultivo proveniente de una muestra independiente.

En total, se obtuvieron 41 aislados axénicos, a los cuales se les asignó la clave MYC y un número progresivo de 3 dígitos (Tabla 9). Se extrajo el ADN de todos los aislados (incluyendo el obtenido del paciente 2) y se llevó a cabo la tipificación

genético molecular. Se utilizaron 35 de estos aislados para un análisis preliminar de diversidad genética mediante RAPDs (Guillén-Nepita, *et al.* 2013), y se encontraron altos valores de diversidad genética y patrones distintos entre aislados obtenidos de casos de tuberculosis meníngea, así como de aislados obtenidos de muestras independientes del mismo paciente (Guillén-Nepita, *et al.* 2013).

TABLA 9 Características epidemiológicas de los pacientes cuyos aislados se incluyeron en el estudio

PACIENTE	UBICACIÓN DE LA ENFERMEDAD	EDAD	GÉNERO ^a	JURISDICCIÓN SANITARIA ^b	COMORBILIDAD	AISLADO (MYC)
1	PULMONAR	57	M	3	NINGUNA	001, 011
2	RENAL/NO TB	--	--	--	--	002
3	MENÍNGEA	60	M	7	CISTICERCOSIS	003
4	MENÍNGEA	NE	M	1	NINGUNA	004
5	PULMONAR	6	M	8	NINGUNA	005
6	PULMONAR	67	F	5	DIABETES MELLITUS	006
7	PULMONAR	37	M	7	DIABETES MELLITUS	007
8	PULMONAR	66	M	5	ALCOHOLISMO	008
9	PULMONAR	24	F	5	NINGUNA	009
10	PULMONAR	88	M	1	NINGUNA	010
11	PULMONAR	34	M	3	NINGUNA	012
12	PULMONAR	59	M	3	ALCOHOLISMO	013, 014
13	PULMONAR	53	F	1	DIABETES MELLITUS	015
14	PULMONAR	42	M	8	NINGUNA	016
15	PULMONAR	67	M	6	DIABETES MELLITUS	017
16	PULMONAR	29	M	7	NINGUNA	018
17	PULMONAR	53	F	1	NINGUNA	019
18	PULMONAR	55	F	7	DIABETES MELLITUS	020
19	PULMONAR	89	M	3	NINGUNA	021
20	PULMONAR	77	M	1	NINGUNA	022
21	PULMONAR	NE	F	NE	NINGUNA	023
22	PULMONAR	48	M	2	DIABETES MELLITUS	024
23	PULMONAR	55	F	1	DIABETES MELLITUS	025
24	MENÍNGEA	31	M	1	NINGUNA	026
25	PULMONAR	19	M	NE	NINGUNA	027
26	PULMONAR	87	F	NE	DIABETES MELLITUS	028
27	PULMONAR	39	M	7	USUARIO	029

DROGAS IV						
28	PULMONAR	29	F	7	NINGUNA	030
29	PULMONAR	NE	F	1	NINGUNA	031
30	PULMONAR	30	F	8	NINGUNA	032
31	PULMONAR	20	M	7	DESNUTRICIÓN	033
32	PULMONAR	55	F	GTO	DIABETES MELLITUS	034
33	PULMONAR	NE	M	GTO	NINGUNA	035
34	MENÍNGEA	21	F	8	NINGUNA	036
35	MENÍNGEA	24	M	1	NINGUNA	037
36	PULMONAR	60	M	1	EPOC	039
37	PULMONAR	62	M	7	DIABETES	042
38	PULMONAR	41	M	7	DIABETES	044
39	PULMONAR	29	M	2	NINGUNA	045

^a M, Masculino; F, Femenino.

^b 1, Morelia; 2, Zamora; 3, Zitácuaro; 4, Pátzcuaro; 5, Uruapan; 6, La Piedad; 7, Apatzingán; 8, Lázaro Cárdenas.

GTO, Muestras obtenidas del estado de Guanajuato

NE, No especificado

El primer proceso de tipificación fue la identificación de la especie a la que pertenecían los aislados de la colección MYC, mediante el panel de tipificación del complejo *M. tuberculosis* descrito por Huard *et al.* (2006). Los resultados se muestran en la tabla 10. Los aislados MYC002, MYC005 y MYC020 sólo amplificaron la región del gen *16SrRNA*, lo que indica que se trata de micobacterias que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis*. A estas micobacterias se les denomina como micobacterias no tuberculosas (MNT). El aislado MYC002 proviene del caso en el que se descartó tuberculosis renal. El aislado MYC005 proviene de un caso pediátrico de tuberculosis pulmonar. El aislado MYC020 proviene de un caso de una mujer adulta, diabética y con tuberculosis pulmonar. El aislado MYC014 no presentó la región 4 (Rv1150), el cual es un patrón no esperado en el panel para las especies del complejo, ya que la ausencia de esta región no ha sido reportada. Sin embargo, al presentar el resto de las regiones genómicas que están presentes en la especie *M. tuberculosis* se le asignó esta identidad. El aislado proviene de un paciente masculino, que padece de alcoholismo y que proporcionó dos muestras independientes. El aislado MYC013 también proviene de este paciente, pero si presenta la región 4.

TABLA 10. Tipificación de aislados a nivel de especie

MYC	1 16s RNA	2 cfp32	3 MiD3	4 Rv1510	5 Rv1970	6 Rv3877/8	7 Rv2073c	8 Rv3120	ESPECIE
001	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
002	1	0	0	0	0	0	0	0	MNT ^a
003	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
004	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
005	1	0	0	0	0	0	0	0	MNT ^a
006	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
007	1	1	R ^b	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i> DR ^{RIO}
008	1	1	R ^b	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i> DR ^{RIO}
009	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
010	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
011	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
012	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
013	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
014	1	1	1	0 ^c	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i> -4
015	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
016	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
017	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
018	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
019	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
020	1	0	0	0	0	0	0	0	MNT ^a
021	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
022	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
023	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
024	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
025	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
026	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
027	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
028	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
029	1	1	R ^b	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i> DR ^{RIO}
030	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
031	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
032	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
033	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
034	1	1	1	1	1	1	1	0	<i>M. tuberculosis</i>
035	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
036	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
037	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
039	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
042	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
044	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>

045	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>M. tuberculosis</i>
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	------------------------

^a MNT: Micobacteria no tuberculosa
^b Presencia de la deleción RD^{RIO}
^c Patrón no esperado.

Por otro lado, los aislados MYC007, MYC008, MYC029 no presentaron la región 3 (*MiD3*). La ausencia de esta región en aislados de *M. tuberculosis* ha sido previamente reportada y caracterizada como la pérdida de 26.3kb de ADN que afecta a 10 genes. Esta variación genómica fue denominada como RD^{RIO} dado que las cepas que la presentan son predominantes en la ciudad de Río de Janeiro, Brasil (Lazzarini *et al.* 2007). Mediante el diseño de oligonucleótidos que tienen como blanco los genes adyacentes a la región genómica afectada, Rv3346c/55c en el extremo 5' y *fold* en el extremo 3', se puede amplificar la secuencia resultante después de la deleción, de 1175 pb. Estos oligonucleótidos (Tabla 8) fueron utilizados en las muestras de interés para confirmar si la ausencia de la región 3 se debía a la eliminación RD^{RIO}. Los resultados se presentan en la figura 4.1. En la figura 4.1a se pueden observar los patrones de amplificación de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y del aislado MYC001, identificado como *M. tuberculosis*. La ausencia de la región 3 es evidente para los aislados MYC007, MYC008, MYC029. En la figura 4.1b, se puede observar el amplicón característico de las cepas de *M. tuberculosis* con la RD^{RIO}, lo cual no ocurre con la cepa H37Rv, ni con el aislado MYC001. Los tres aislados RD^{RIO} provienen de casos de tuberculosis pulmonar. Éste es el primer reporte de cepas RD^{RIO} en nuestro país.

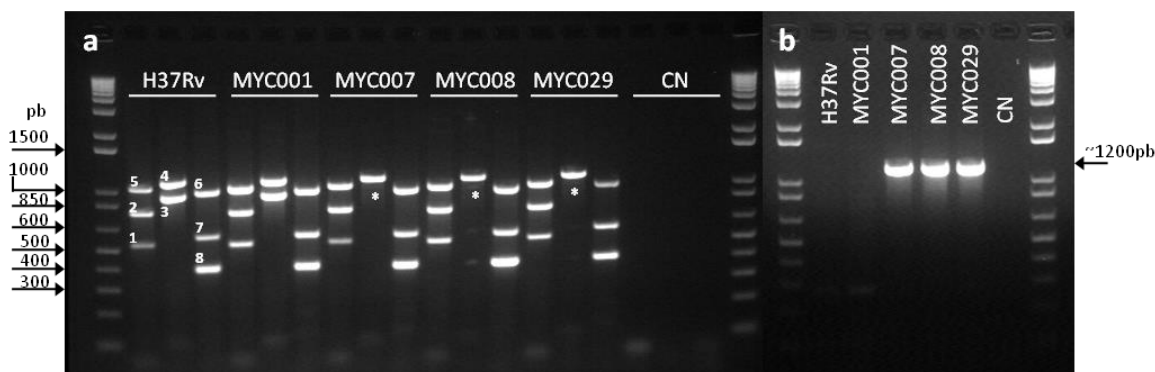


Figura 11. Panel de tipificación del CMTB e identificación de cepas RD^{RIO}. (a) Panel de identificación del CMTB, según Huard *et al.* (2007). Carriles: 1, 16s *rRNA*; 2, *cfp32*; 3, *MiD3*; 4, Rv1510; 5, Rv1970; 6, Rv3877/8; 7, Rv2073c; 8, Rv3120; CN, Control negativo,

reacción sin DNA. (*): Ausencia de amplicón de la región *MiD3*. Las reacciones se llevaron a cabo por separado. Los productos se mezclaron como se indica en los carriles de la cepa H37Rv, para fines de visualización. **(b)** Amplificación de la secuencia puente formada tras la eliminación de la región *MiD3*, característica de las cepas RD^{RIO}, en los aislados MYC007, MYC008 y MYC029. Controles negativos: H37Rv y MYC001, que sí amplificaron la región *MiD3* en (a). CN: Control negativo, reacción sin DNA.

Sólo las cepas identificadas previamente como *M. tuberculosis* fueron sometidas a tipificación por *spoligotyping*, el cual fue obtenido exitosamente para 36 cepas (Tabla 11). En total se obtuvieron 27 patrones diferentes, de los cuales 5 agrupan al menos a 2 aislados. Los patrones obtenidos fueron utilizados como consultas en la herramienta TB Insigth para asignar linaje, y la base de datos SITVIT para asignar clado y tipo internacional de espoligotipo (SIT). En la colección MYC se encontraron cepas de 3 linajes distintos: Euro-Americano (86.1%), del Este de Asia (2.8%) e Indo-Oceánico (11.1%). Los clados y SITs identificados se enlistan en la tabla 11. Un total de 10 cepas (27.8%) presentaron patrones distintos y sin número internacional asignado en SITVIT. De éstas, 7 pertenecen al linaje Euro-Americano y 2 al linaje Indo-Oceánico. La cepa del Este de Asia pertenece al genotipo Beijing.

En general, los clados más frecuentes fueron el T1 y el X1, con 5 aislados cada uno. Las cepas T1 presentaron el tipo internacional (SIT) 53 en 4 casos y el SIT393 en un caso. Las cepas X1 presentaron el SIT119 en cuatro casos y el SIT221 en un caso. La distribución de los SIT en cada familia y clado se puede observar en la figura 4.2.

Las cepas RD^{RIO} presentan patrones distintos pero todos pertenecientes a la familia LAM del linaje Euro-Americano. Los aislados MYC001 y MYC011, ambas del paciente 1, presentan patrones de espoligotipo distintos. Los aislados del paciente 12, MYC013 y MYC014 presentan el mismo patrón. Los aislados obtenidos de casos de tuberculosis meníngea (MYC003, MYC004, MYC026, MYC036 y MYC037) pertenecen a 3 diferentes linajes. Los aislados MYC003, MYC036 y MYC037 corresponden al clado T1, del linaje Euro-Americano. El aislado MYC004 pertenece a la familia Beijing del linaje del Este de Asia y el aislado MYC026 presenta un patrón no reportado del linaje Indo-Oceánico.

TABLA 11. Tipificación de aislados mediante espoligotipo

MYC	PATRÓN DE ESPOLOGOTIPO	SIT ^a	CLADO ^a	LINAJE ^b
001	[Pattern]	221	X1	EURO-AMERICANO
003	[Pattern]	53	T1	EURO-AMERICANO
004	[Pattern]	1	BEIJING	ESTE DE ASIA
006	[Pattern]	119	X1	EURO-AMERICANO
007	[Pattern]	150	LAM9	EURO-AMERICANO
008	[Pattern]	20	LAM1	EURO-AMERICANO
009	[Pattern]	119	X1	EURO-AMERICANO
010	[Pattern]	119	X1	EURO-AMERICANO
011	[Pattern]	NR	SNR1	EURO-AMERICANO
013	[Pattern]	1751	X3	EURO-AMERICANO
014	[Pattern]	1751	X3	EURO-AMERICANO
015	[Pattern]	NR	SNR2	EURO-AMERICANO
016	[Pattern]	NR	SNR3	EURO-AMERICANO
017	[Pattern]	53	T1	EURO-AMERICANO
018	[Pattern]	NR	SNR4	EURO-AMERICANO
019	[Pattern]	47	H1	EURO-AMERICANO
021	[Pattern]	NR	SNR5	EURO-AMERICANO
022	[Pattern]	119	X1	EURO-AMERICANO
023	[Pattern]	95	LAM6	EURO-AMERICANO
024	[Pattern]	118	T2	EURO-AMERICANO
025	[Pattern]	753	LAM9	EURO-AMERICANO
026	[Pattern]	NR	SNR6	INDO-OCEÁNICO
027	[Pattern]	8	EAI5	INDO-OCEÁNICO
028	[Pattern]	NR	SNR7	EURO-AMERICANO
029	[Pattern]	42	LAM9	EURO-AMERICANO
030	[Pattern]	NR	SNR8	EURO-AMERICANO
031	[Pattern]	20	LAM1	EURO-AMERICANO
032	[Pattern]	NR	SNR9	INDO-OCEÁNICO
034	[Pattern]	NR	SNR10	EURO-AMERICANO
035	[Pattern]	53	T1	EURO-AMERICANO
036	[Pattern]	393	T1	EURO-AMERICANO
037	[Pattern]	53	T1	EURO-AMERICANO
039	[Pattern]	2111	H3	EURO-AMERICANO
042	[Pattern]	185	X2	EURO-AMERICANO
044	[Pattern]	118	T2	EURO-AMERICANO
045	[Pattern]	NR	SNR11	INDO-OCEÁNICO

^a SIT, Spoligotype International Type. De acuerdo a la base de datos internacional SITVIT.

^b De acuerdo a la base de datos internacional TB-Insight.

NR, No reportado

SNR, SIT no reportado

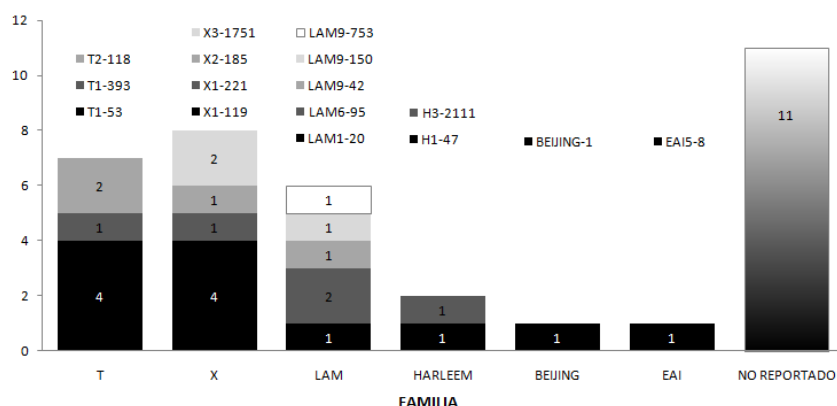


Figura 12. Frecuencia de los diferentes SIT identificados en la colección MYC, agrupados por familia. Los patrones no reportados previamente se muestran como un solo conjunto, aunque cada uno de ellos es distinto.

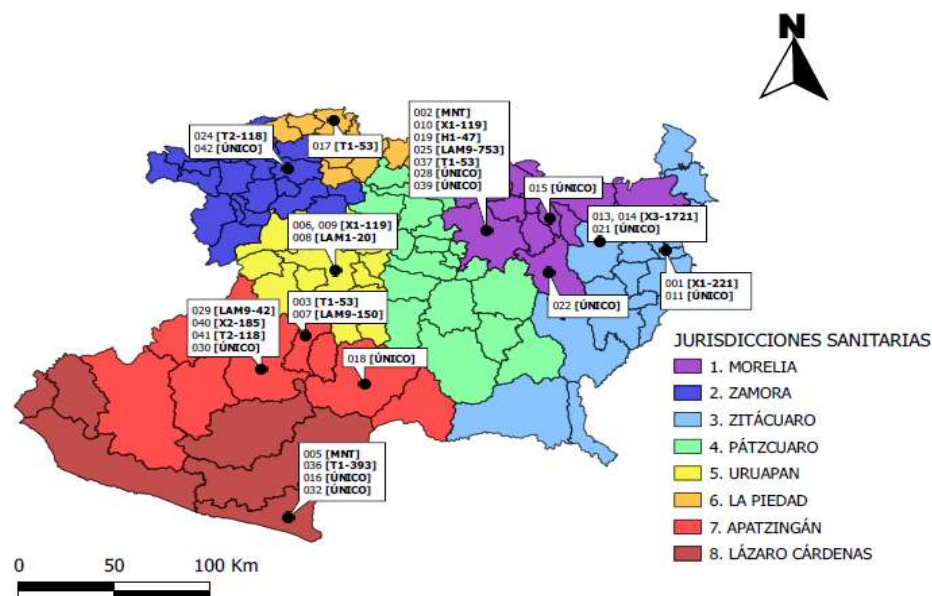


Figura 13. Distribución de las cepas de *M. tuberculosis* según su clado y tipo internacional de espigotipo (en negritas y entre corchetes).

Las familias encontradas con mayor frecuencia en la muestra (X, T y LAM) se encuentran dispersas en todo el estado. Los municipios que aportaron más casos al estudio, Morelia, Apatzingán y Lázaro Cárdenas muestran una gran variedad de tipos internacionales. No se observa acumulación de algún tipo internacional en alguna región en particular (fig. 4.3).

Ante el gran número de cepas con tipos internacionales no reportados se hizo uso de la herramienta SpolTool (<http://www.emi.unsw.edu.au/spolTools/>) para la elaboración de un bosque de espigotipos que permitiera elucidar posibles relaciones entre los patrones no reportados y los asignados a un clado y familia. El bosque resultante se muestra en la figura 4.4. Con los datos obtenidos, el algoritmo puede determinar que el patrón SNR4 proviene de cepas X1-SIT119 tras una gran eliminación de las secuencias espaciadoras 4 a 11. El patrón SNR11 deriva de las cepas EAI5-SIT8, tras la eliminación, y el patrón SNR5 procede de las cepas SNR3. No fue posible determinar el origen de SNR3 ni del resto de los patrones no reportados previamente.

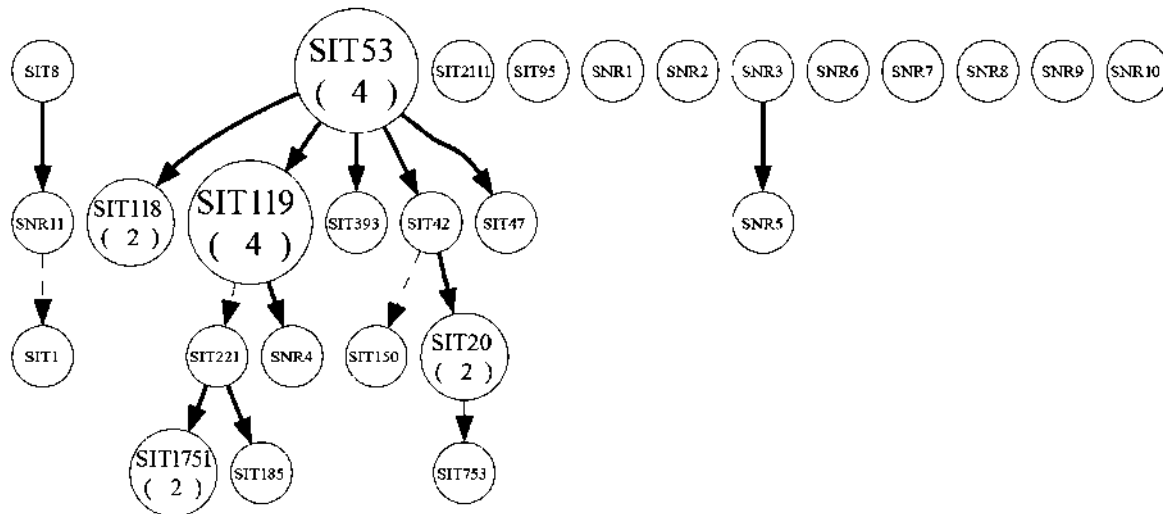


Figura 14. Bosque de espoligotipos. Las flechas continuas muestran las relaciones filogenéticas más probables entre los grupos de aislados de diferente tipo internacional (SIT). SNR=Spoligotipo no reportado.

Dado que la resolución del *spoligotyping* es muy baja, se llevó a cabo la tipificación por MIRU-VNTR para determinar si las cepas con el mismo SIT se encontraban relacionadas entre sí. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.5. Ninguna de las cepas de la colección tuvo un perfil alélico idéntico. Entre las cepas con menor distancia genética, destacan MYC013 y MYC014, obtenidas a partir de muestras independientes de un solo paciente; sin embargo estas cepas no son idénticas. La mayoría de las cepas se agrupan adecuadamente por espoligotipo. Es el caso de las cepas Haarlem y LAM. Entre éstas últimas, podemos observar que las tres cepas RD^{RIO} poseen un perfil alélico distinto. Algunas de las cepas no agrupadas corresponden a cepas cuyos espoligotipos no se encontraban registrados previamente (SNRs). Para agrupar éstas y el resto de las cepas no agrupadas, es probable que se requiera una muestra de mayor tamaño.

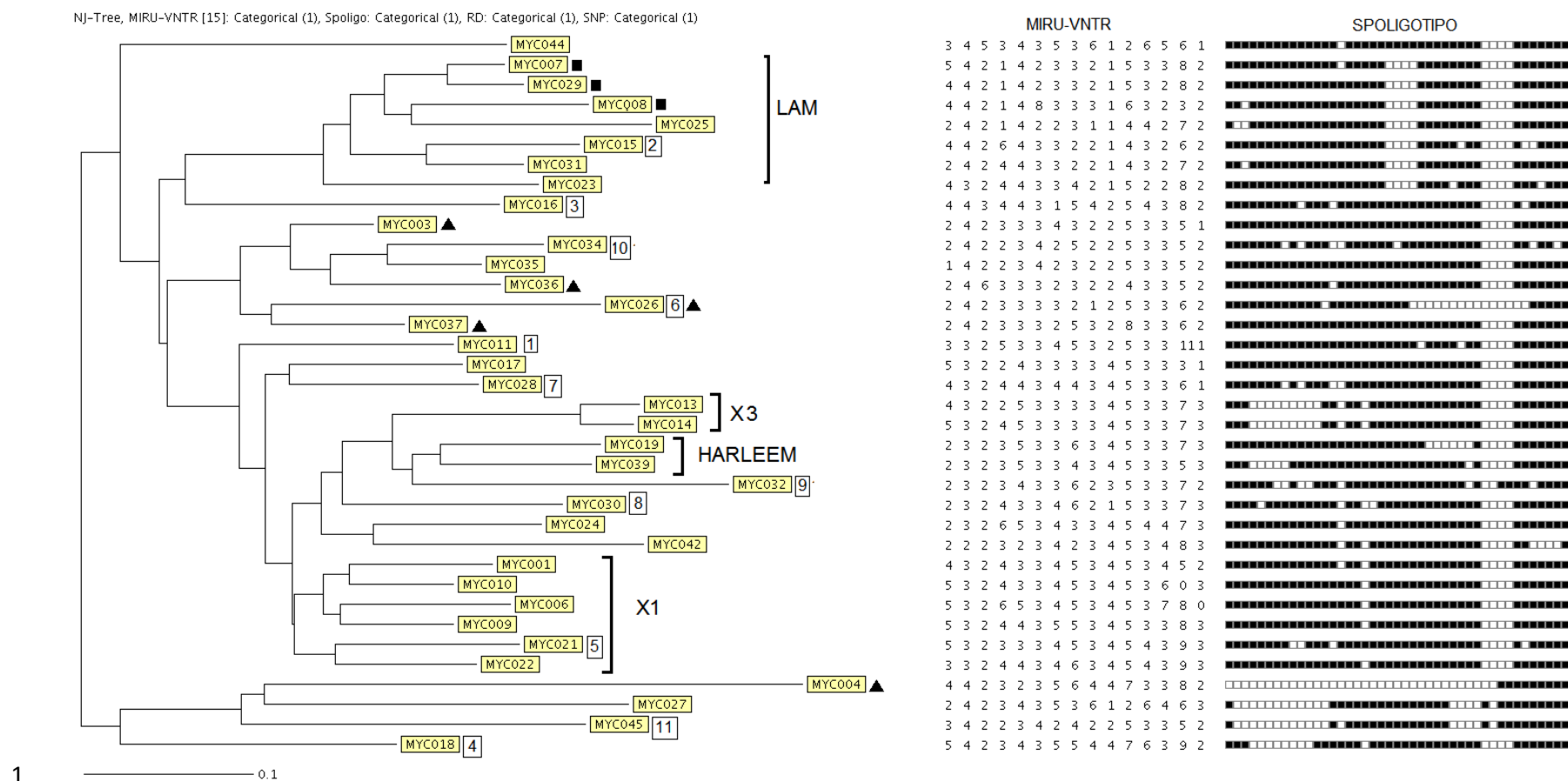


Figura 15. Dendrograma basado en datos de tipificación por MIRU-VNTR. A la derecha del dendrograma se indica el número de copias de cada locus MIRU-VNTR en el siguiente orden: Mtub04, ETRC, MIRU4, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU34, Mtub39 QUB26 y QUB4156. A la extrema derecha se muestra el patrón de espoligotipo. Los números en cajas corresponden los patrones de espoligotipos desconocidos según la numeración asignada en la tabla 11 (■) Cepas RD^{RIO}. (▲) Cepas obtenidas de casos de tuberculosis meníngea.

DISCUSIÓN

La colección de aislados de micobacterias obtenida para este estudio es pequeña, sin embargo, presenta características muy interesantes. En primer lugar, las características epidemiológicas de los pacientes cuyas muestras fueron incluidas describen a una población joven (46.9 años), predominantemente masculina. Estos datos coinciden con las características descritas para la población mexicana que padece de tuberculosis (93% de los casos entre los 20 y 59 años de edad; proporción M/F de 1.6). La muestra también coincide con los datos de la población Michoacana descrita en el capítulo 1 en cuanto a la edad (Fig. 1.5a), mientras que la proporción de hombres por cada mujer es mucho mayor en la muestra que en la población michoacana en general. Todos los casos extrapulmonares, 12.8%, fueron casos de tuberculosis meníngea, mientras que en el país el porcentaje de esta forma de la enfermedad se limita al 1.6%. Esta tendencia de una mayor captación de muestras de líquido cefalorraquídeo está influida tanto por el número de muestras que se reciben en comparación con muestras de otros tejidos extrapulmonares, como por la posibilidad de disponer de ellos para cumplir los protocolos de diagnóstico y de inclusión en el estudio. Independientemente de este sesgo, la muestra incluye aislados provenientes de casi todas las jurisdicciones del estado (Fig. 4.3), por lo que nos permite tener un panorama preliminar muy amplio sobre la diversidad genética de las cepas circulantes en la región.

Dentro de la colección encontramos 3 aislados de micobacterias que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis*. Uno de ellos (MYC002) provino de una muestra de orina de un paciente con diagnóstico presuntivo de tuberculosis renal. Al encontrarse solamente una micobacteria saprófita, las cuales son abundantes en este tipo de muestra, el caso fue descartado. El segundo caso corresponde a un paciente pediátrico y el tercero a una paciente con Diabetes Mellitus. Los cuadros clínicos causados por MNT se denominan micobacteriosis y son más frecuentes entre pacientes con algún compromiso inmunológico (Katoch, 2004). La incidencia de casos de micobacteriosis pulmonar varía en cada región, pero se ha

reportado un incremento general desde la década de 1990 (Martín-Casabona *et al.* 2004; Lai *et al.* 2010). Sin embargo, este incremento puede deberse a la mayor sensibilidad de los métodos de cultivo para detectar micobacterias saprófitas que estén colonizando al paciente. Para evitar la sobrestimación de los casos de micobacteriosis pulmonar por MNT, se han delineado criterios mínimos para su diagnóstico y tratamiento. Estos criterios incluyen que al menos dos cultivos independientes resultaran positivos para MNT, además de tener evidencia clínica de enfermedad pulmonar y que se haya descartado otro cuadro pulmonar (Griffith *et al.* 2007). En el caso de los pacientes 5 y 18, de quienes se obtuvieron los aislados MYC005 y MYC020 respectivamente, se reportó enfermedad pulmonar semejante a tuberculosis, pero no se contó con cultivos adicionales independientes para confirmar la presencia de la MNT.

El resto de los aislados fue identificado como *M. tuberculosis*. Dentro de este grupo, son de particular interés los aislados identificados como RD^{RIO}. Estas cepas pertenecen a la familia LAM, aparecen con mayor frecuencia en Sudamérica pero se encuentran distribuidas alrededor del mundo, formando clados predominantes en las regiones donde han sido reportadas (Gibson *et al.* 2008; Weisenberg *et al.* 2012). Por lo general, las cepas RD^{RIO} presentan un alto porcentaje de agrupamiento en comparación con el resto de las cepas de la familia LAM. Esto indica que dichas cepas se transmiten entre personas con mayor frecuencia que las cepas no RD^{RIO}, contribuyendo en la diseminación de la enfermedad. El grado de virulencia de estas cepas no ha sido claramente definido, pues se han reportado resultados contradictorios de comparaciones de los signos y síntomas de pacientes infectados con cepas RD^{RIO}. Algunos de los reportes indican una relación entre la infección por cepas RD^{RIO} y mayor cavitación, hemoptisis más frecuente, pérdida de peso en el paciente y mayor carga bacilar en la muestra de esputo (Lazzarini *et al.* 2007; Weisenberg *et al.* 2012); sin embargo, en una población menor, no se presenta dicha relación (Barbosa *et al.* 2012). Un aspecto que no se debe pasar por alto es la mayor carga bacilar que, según algunos autores, arrojan los pacientes infectados con las cepas RD^{RIO}. Una mayor descarga bacilar implica un mayor riesgo de contagio, lo que explicaría el mayor

porcentaje de agrupación de estas cepas. Aunque este genotipo no ha sido reportado en el país previamente, su distribución se puede inferir a partir de los datos de tipificación por *spoligotyping* previamente reportados. Las cepas RD^{RIO} suelen pertenecer a los clados LAM1, LAM2 y LAM9. En particular, más del 90% de las cepas de la familia LAM1 estudiadas tienen la eliminación RD^{RIO} (Gibson *et al.* 2008). Con estos datos, se puede sugerir que las cepas RD^{RIO} podrían estar circulando en Monterrey, donde se encontraron 5 cepas LAM1 agrupadas y una cepa LAM9 (Molina-Torres *et al.* 2010); en Acapulco, donde el 1.5% de los aislados tipificados pertenecieron al clado LAM1, 0.4% al clado LAM2 y 7.5% al clado LAM9 (Nava-Aguilera *et al.* 2011); en San Luis Potosí donde se encontraron 14 cepas LAM9, el segundo clado más grande encontrado en el estudio, y 7 cepas LAM1 (López-Rocha *et al.* 2012), e incluso entre pacientes con VIH de la zona metropolitana del Distrito Federal, en los que el clado LAM9 (SIT-42) fue el predominante (López-Álvarez *et al.* 2010). En nuestra muestra, las tres cepas RD^{RIO} pertenecen a los clados LAM1 (MYC008) y LAM9 (MYC007 y MYC029). Dos cepas LAM6 y una cepa LAM9 adicional no presentaron la eliminación RD^{RIO}. Las cepas LAM9 RD^{RIO} provienen de dos municipios de la jurisdicción sanitaria 7, Apatzingán, y corresponden a dos SIT distintos (Tabla 11), mientras la cepa LAM1 RD^{RIO} proviene de la jurisdicción sanitaria 5, en Uruapan. Esto sugiere que el genotipo RD^{RIO} se encuentra distribuido en el estado y que además ya presenta cierto grado de variación genética. Esta variación puede sugerir cierto grado de adaptación de dichas cepas a la población michoacana, por lo que su detección, rastreo y control cobra prioridad en términos de vigilancia epidemiológica.

En cuanto a la estructura de la muestra, se encontró que la colección es muy diversa (27 genotipos en 36 aislados) y con un bajo nivel de agrupamiento (38.8%). Los estudios realizados en otras regiones del país también muestran una gran diversidad genética pero un alto porcentaje de agrupamiento, así como predominancia de algún clado en particular el cual agrupa más del 20% de los casos: en Monterrey, Nuevo León, el clado predominante es el T1, que incluye al 23.89% de los casos (Molina-Torres *et al.* 2010); en Acapulco, Guerrero, el clado EAI-2 agrupó el 26.2% de los casos (Nava-Aguilera *et al.* 2011), y en el estado de

San Luis Potosí, de nuevo, el clado T1 agrupó el 29.3% de los casos (López-Rocha et al.2013). Todas estas regiones aparecen en las estadísticas de la Secretaría de Salud con inidencias mayores a los 10/100,000hab. Guerrero y Nuevo León incluso están por encima de los 20/100,000hab. La ausencia de agrupamiento en la muestra debe tomarse con cuidado, debido al pequeño tamaño de la misma. Considerando que el estado registra un promedio de 325 casos nuevos anuales (Guillen *et al.*, en preparación) y que la muestra se compone de 36 aislados de un periodo de 3 años, ésta representa menos del 10% de los casos anuales estatales, lo cual no nos permite afirmar que el patrón de agrupamiento que vemos sea reflejo preciso de la realidad (Glynn *et al.* 1999). Sin embargo, queda claro que existe una alta diversidad genética con características semejantes a las de otras regiones del país.

En la muestra, la familia X fue la más abundante (22.2%), seguida por la familia T (19.4%) y la familia LAM (16.7%). Ambas familias pertenecen al linaje Euro-Americano. De acuerdo a la base de datos SITVIT, la familia T es cosmopolita, pero cobra importancia en Europa y el continente americano, mientras que la familia X contribuye a un número importante de casos de tuberculosis en el norte de Europa, Sudáfrica, Norte y Centroamérica. La familia LAM aparece frecuentemente en Centro y Sudamérica, aunque también es notoria su presencia en Europa y África (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/description.jsp#). Los resultados aquí obtenidos son semejantes a los reportados en Monterrey, el estado de San Luis Potosí y el Distrito Federal, donde las familias identificadas con más frecuencia fueron T, X y LAM (Molina-Torres *et al.* 2010; López-Alvarez *et al.* 2010; López-Rocha *et al.* 2013), pero discrepan considerablemente de lo descrito en Acapulco, Guerrero, en el que un 44.6% de los aislados pertenecen a la familia EAI del linaje Indo-Oceánico. Las familias LAM y T fueron la segunda y tercera familia más frecuente en Acapulco, con alrededor de 11% de los aislados cada una.

Entre los 5 aislados que proceden de casos de casos de tuberculosis meníngea se encontró 1 cepa Beijing y 1 cepa EAI. Las cepas Beijing fueron identificadas por

primera vez mediante IS1661-RFLP en China como un genotipo dominante (van Soolingen *et al.* 1995). Sin embargo, con la generalización de la tipificación molecular de *M. tuberculosis* en otras regiones del mundo, se ha observado que esta cepa es cosmopolita y que suele asociarse con casos de tuberculosis meníngea (Tsenova *et al.* 1999; Caws *et al.* 2006; Thwaites *et al.* 2008). En general, se ha observado que las cepas de los linajes del Este de Asia e Indo-oceánico están asociados con casos de tuberculosis extrapulmonar, mientras que dicha asociación no se presenta entre las cepas del linaje Euro-Americano (Thwaites *et al.* 2008). Con estos antecedentes, no es sorpresivo que la cepa MYC004, Beijing, y la cepa MYC026, de espoligotipo no reportado, pero perteneciente al linaje Indo-oceánico, provengan de casos de tuberculosis meníngea. Sin embargo, el resto de las cepas de casos meníngeos de la muestra analizada (MYC003, MYC036 y MYC037) pertenecen al clado T1, del linaje euro-americano. La capacidad de las cepas de dicho linaje de producir tuberculosis extrapulmonar y de atravesar la barrera hematoencefálica ha sido demostrada en modelos animales (Pando *et al.* 2010; Be *et al.* 2011). En la muestra hay otros 2 aislados T1 que provienen de casos pulmonares. La presencia de un padecimiento predisponente no parece ser un factor para que una cepa T1 pueda diseminarse, ya que en dos de los casos (MYC036 y MYC037) no se reporta dicha situación, siendo ambos pacientes adultos jóvenes (21 y 24 años, respectivamente). Si bien no se cuenta con información adicional sobre el estado inmunológico de estos pacientes, los datos previamente mencionados sugieren que las cepas que causaron estos cuadros poseen determinantes genéticos que les permiten diseminarse y atravesar la barrera hematoencefálica y que dichos determinantes son independientes de los marcadores moleculares utilizados para su tipificación. Es necesario realizar una caracterización más detallada de estas cepas para determinar la posible presencia de determinantes genéticos que aparentemente les confieren mayor virulencia. Estos determinantes pueden ser componentes de la pared celular o proterínas secretoras, enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos, factores de transcripción reguladores del metabolismo primario o reguladores de respuestas a diferentes estímulos (Smith, 2003). Por ejemplo, el

factor de transcripción PhoP que regula la respuesta a la hipoxia, el metabolismo respiratorio, la secreción del antígeno ESAT-6 (o ESXA) , la síntesis de lípidos patogénicos, la respuesta a estrés y la persistencia del bacilo (González-Asensio *et al.* 2008); o la familia de proteína ESX, que son antígenos importantes durante la relación huésped-patógeno y se ha encontrado que presentan polimorfismos entre aislados clínicos (Uplekar *et al.* 2011). Los genes de las familias de proteínas PE y PPE abarcan hasta el 10% de la secuencia codificante del cromosoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.* 1998). Las proteínas para las que codifican son capaces de inducir la respuesta humoral en modelos animales (Delogu y Brennan, 2001; Brennan *et al.*, 2001; Delogu *et al.*, 2004). Estos genes son altamente polimórficos entre los aislados clínicos (Talarico *et al.* 2008), y dichos polimorfismos están asociados con variaciones en las características fenotípicas de importancia clínica de la micobacterias (Talarico *et al.*, 2007). Aunque en este trabajo no se hizo énfasis en la resistencia a antibióticos debido a la carencia de datos clínicos al respecto, éste es otro aspecto de interés en la colección estudiada. La resistencia a antibióticos es uno de los obstáculos más importantes para la contención y eliminación de la tuberculosis (World Health Organization, 2013). Aunque se han encontrado mutaciones presentes en la mayoría casos de resistencia, también se reportan aislados resistentes que no presentan dichas mutaciones (Campbell *et al.* 2011). Estudios recientes siguen reportando nuevas mutaciones (Nicol y Wilkinson, 2008; Lopez-Alvarez *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2011;) y muchas de ellas parecen haber sido adquiridas por diferentes cepas en eventos independientes (Loerger *et al.*, 2010)

Finalmente, la tipificación mediante MIRU-VNTR de las cepas de estudio confirma lo observado previamente mediante los marcadores RAPD (Guillén-Nepita *et al.*, 2013), respecto a la gran diversidad genética que conforma la población analizada. Tanto las cepas RD^{RIO}, como las cepas que provienen de los mismos pacientes presentan perfiles alélicos distintos. En el caso del paciente 1, de quien se obtuvieron los aislados MYC001 y MYC011, es probable que se trate de una infección mixta, es decir, causada por más de una cepa de *M. tuberculosis*. Este tipo de infecciones es frecuente, constituyendo hasta el 19% de los casos en

zonas de alta incidencia, debido a la constante exposición de pacientes ya infectados (Shamputa *et al.* 2006; Fang *et al.* 2008; Mokrousov *et al.* 2009; Dickman *et al.* 2010; Huang *et al.* 2010; Mallar *et al.* 2010; Hanekom *et al.* 2013). La existencia de más de una cepa en un paciente puede determinar el curso de la infección y el resultado del tratamiento, pues cada cepa puede presentar características de adaptación distintas que le permiten superar presiones selectivas como la exposición a antibióticos (van Rie *et al.* 2005). Los aislados MYC013 y MYC014, del paciente 12, tienen un espoligotipo idéntico y un perfil alélico muy semejante (Tabla 11 y Fig. 15), por lo que es más probable que éstos sean variantes de una misma cepa. Ésta variación genética también se observa en las regiones utilizadas para la asignación de especie (Tabla 4.4), lo que puede explicar por qué ninguno de los dos pares de aislados se agruparon en el dendrograma basado en RAPD realizado previamente (Guillén-Nepita *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

En conjunto, los datos presentados en este capítulo permiten concluir lo siguiente:

1. Las micobacterias causantes de tuberculosis en el estado de Michoacán presentan una alta diversidad genética, con una población semejante a la de los estados del norte y centro del país y distinta a Guerrero, estado vecino del sur.
2. El genotipo RD^{RIO} se encuentra presente en el estado y probablemente circule en el resto del país donde los clados LAM1 y LAM9 han sido reportados.
3. Las cepas de origen asiático y del clado T1 contribuyen a los casos de tuberculosis meníngea, mientras que en la familia X y LAM predominan en los casos pulmonares.
4. No existe regionalización de cepas en el estado, lo que sugiere una libre dispersión de las mismas.
5. Existen casos de infecciones mixtas en el estado, lo que puede condicionar el éxito del tratamiento. Esto, aunado a la alta diversidad

genética y a la amplia distribución de las cepas más abundantes, sugiere una mayor incidencia que la reportada por los sistemas de salud pública.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados del presente trabajo se pueden proponer nuevos planteamientos para continuar con esta línea de investigación:

1. ¿Qué características genéticas poseen las cepas que son capaces de diseminarse y atravesar la barrera hematoencefálica, independientemente de su linaje?
2. ¿Qué tan frecuentes son las infecciones mixtas en el estado?
3. ¿La estructura de la población de *M. tuberculosis* que sugiere éste trabajo es estable o presenta transformaciones debido a eventos como la migración?
4. ¿Qué perfil de resistencia a antibióticos tienen estas cepas? ¿Dicho perfil está asociado a algún genotipo específico?

Para resolver estas preguntas se pretende determinar si existen variaciones en los genes asociados a la virulencia (como las familias PE y PPE) entre las cepas de la colección, así como evaluar el perfil tanto genotípico como fenotípico de la susceptibilidad a antibióticos de dichas cepas. Por otro lado, se pretende hacer uso de la genómica comparativa que permita encontrar variaciones genómicas propias de las cepas provenientes de casos de tuberculosis meníngea. Se espera generar una relación más estrecha entre las autoridades de vigilancia epidemiológica para delinear zonas de estudio de alta incidencia, para llevar a cabo estudios de mayor amplitud en cuanto al número de muestras y con la inclusión de un perfil epidemiológico completo.

REFERENCIAS

Allix-Béguec C., D. Harmsen, T. Weniger, P. Supply y S. Niemann. 2008. **Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates.** *J Clin Microbiol.* 46(8):2692-2699.

Alonso, M., S. Borrell, M.M. Lirola, TB Molecular Epidemiology Study Group of Madrid; *Mycobacterium* Study Group of Barcelona; INDAL-TB group, E. Bouza, D. García de Viedma. 2008. **A proposal for applying molecular markers as an aid to identifying potential cases of imported tuberculosis in immigrants.** *Tuberculosis.* 88(6):641-647.

Arnold, C. 2007. **Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Clin. Microbiol. Infect.* 13(2): 120-128.

Barbosa C. de B., L.C. Lazzarini, A.R. Elias, J.A. Leung, S.B. Ribeiro, M.G. da Silva, R.S. Duarte, P Suffys, H.M. Gomes, A.L. Kritski, J.R. Lapa e Silva, J.L. Ho y N. Boéchat N. 2012. **Tuberculosis caused by RD^{RIO} *Mycobacterium tuberculosis* is not associated with differential clinical features.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 16(10):1377-1382.

Be, N.A., L.G. Klinkenberg, W.R. Bishai, P.C. Karakousis y S.K. Jain. 2011. **Strain-dependent CNS dissemination in guinea pigs after *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge.** *Tuberculosis (Edinb).* 91(5):386-9.

Borsuk, S., M.M. Dellagostin, S.G. Madeira, C. Lima, M. Boffo, I. Mattos, P.E. Almeida da Silva, O.A. y Dellagostin. 2005. **Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis.** *Microbes Infect.* 7(13):1338-4

Brennan, M.J., G. Delogu, Y. Chen, S. Bardarov, J. Kriakov, M. Alavi, W.R. y Jr. Jacobs. 2001. **Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell**

surface constituents that influence interactions with other cells. *Infection and Immunity*. 69(12):7326.

Brudey, K., J.R. Driscoll, L. Rigouts, W.M. Prodinger, A. Gori, S.A. Al-Hajj, C. Allix, L. Aristimuño, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J.T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. *et al.* 2006. ***Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology.** *BMC Microbiol.* 6:23.

Campbell, P.J., G.P. Morlock, R.D. Sikes, T.L. Dalton, B. Metchock, A.M. Starks, D.P. Hooks, L.S. Cowan, B.B. Plikaytis y J.E. Posey. 2011. **Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 55(5):2032-41.

Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. 30. Barry, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles *et al.* 1998. **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.** *Nature.* 393:537-544.

Caws, M., G. Thwaites, K. Stepniewska, T.N. Nguyen, T.H. Nguyen, N.P. Nguyen, N.T. Mai, M.D. Phan, H.L. Tran, T.H. Tran, D. van Soolingen, K. Kremer, V.V. Nguyen, T.C. Nguyen y J. Farrar. 2006. **Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with human immunodeficiency virus infection and multidrug resistance in cases of tuberculous meningitis.** *J Clin Microbiol.* 44(11):3934-3939.

Dahle, U.R., P. Sandven, E. Heldal y D.A. Caugant. 2003. **Continued low rates of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway.** *J Clin Microbiol.* 41(7):2968-73.

Delogu, G. y M.J. Brennan. 2001. **Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis***. *Infect Immun.* 69(9):5606.

Delogu, G., C. Pusceddu, A. Bua, G. Fadda, M.J. Brennan y S. Zanetti. 2004. **Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure**. *Mol Microbiol.* 52(3):725-33.

Dickman, K.R., L. Nabyonga, D.P. Kateete, F.A. Katabazi, B.B. Asiimwe, H.K. Mayanja, A. Okwera, C. Whalen y M.L. Joloba. 2010. **Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda**. *BMC Infect Dis.* 10:10:349.

Dong, H., Z. Liu, B. Lv, Y. Zhang, J. Liu, X. Zhao, J. Liu y K. Wan. 2010. **Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* from different Provinces of China**. *J Clin Microbiol.* 48(11):4102-6.

Fang, R., X. Li, J. Li, J. Wu, X. Shen, X. Gui, K. DeRiemer, L. Liu, J. Mei y Q. Gao. 2008. **Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China**. *Tuberculosis.* 88(5):469-473.

Farnia, P., M.R. Masjedi, M. Varahram, M. Mirsaeidi, M., M. Ahmadi, M. Khazampour, P. Tabarsi, P. Baghei, M. Marjane, M. Bahadori, A.Z. Zarifi y A.A. Velayati. 2008. **The recent-transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping**. *BMC Infect Dis.* 8:109

Fenner, L., S. Gagneux, P. Helbling, M. Battegay, H.L. Rieder, G.E. Pfyffer, M. Zwahlen, H. Furrer, H.H. Siegrist, J. Fehr, M. Dolina, A. Calmy, D. Stucki, K. Jatón, J.P. Janssens, J.M. Stalder, T. Bodmer, B. Ninet, E.C. Böttger, M. Egger, Swiss HIV Cohort Study Group y Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study Group. ***Mycobacterium tuberculosis* transmission in a country with low**

tuberculosis incidence: role of immigration and HIV infection. *J Clin Microbiol.* 50(2):388-395.

Ferdinand, S., J. Millet, A. Accipe, S. Cassadou, P. Chaud, M. Levy, M. Théodore y N. Rastogi. 2013. **Use of genotyping based clustering to quantify recent tuberculosis transmission in Guadeloupe during a seven years period: analysis of risk factors and access to health care.** *BMC Infect Dis.*13(1):364.

Gehre, F., M. Antonio, F. Faihun, M. Odoun, C. Uwizeye, P. de Rijk, B.C. de Jong y D. Affolabi. 2013. **The First Phylogeographic Population Structure and Analysis of Transmission Dynamics of *M. africanum* West African 1-Combining Molecular Data from Benin, Nigeria and Sierra Leone.** *PLoS One.* 8(10):e77000.

Gibson, A.L., R.C. Huard, N.C. Gey van Pittius, L.C. Lazzarini, J. Driscoll, N. Kurepina, T. Zozio, C. Sola, S.M. Spindola, A.L. Kritski, D. Fitzgerald. K. Kremer, H. Mardassi, P. Chitale, J. Brinkworth, D. Garcia de Viedma, B. Gicquel, J.W. Pape, D. van Soolingen, B.N. Kreiswirth, R.M. Warren, P.D. van Helden, N. Rastogi, P.N. Suffys, J. Lapa e Silva y J.L. Ho. 2008. **Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RD^{RIO} Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family.** *J Clin Microbiol.* 46(4):1259-1267.

Gonzalo-Asensio, J., S. Mostowy, J. Harders-Westerveen, K. Huygen, R. Hernández-Pando, J. Thole, M. Behr, B. Gicquel y C. Martín, C. 2008. **PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence.** *PLoS One.* 3(10):e3496

Glynn, J.R., E. Vynnycky y P.E. Fine. 1999. **Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques.** *Am J Epidemiol.*149(4):366-371

Glynn, J.R., J. Whiteley, P.J. Bifani, K. Kremer, D. van Soolingen. 2002. **Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review.** *Emerg Infect Dis.* 8(8):843-849.

Griffith, D. E., T. Aksamit, B.A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S.M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M.F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C.F. von Reyn, R.J.Jr. Wallace, K. Winthrop, ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. 2007. **An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases.** *Am J Respir Crit Care Med.* 175(4):367-416.

Guillén-Nepita, A. L., M.S. Vázquez-Garcidueñas y G. Vázquez-Marrufo. 2010. ***Mycobacterium tuberculosis*: Evolutionary and epidemiological insights as revealed by molecular genetic analysis.** En: A. Lodeiro (Ed). **Bacterial Populations: Basic and Applied Aspects of Their Structure and Evolution.** Transworld Research Network. pp.79-95.

Gutierrez, M.C., N. Ahmed, E. Willery, S. Narayanan, S.E. Hasnain, D.S. Chauhan, V.M. Katoch, V. Vincent, C. Loch y P. Supply. 2006. **Predominance of ancestral lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in India.** *Emerg Infect Dis.*12(9):1367-1374.

Hernández-Garduño, E. y R.K. Elwood. 2010. **Nontuberculous Mycobacteria in Tap Water.** *Emerg Infect Dis.* 18(2):353–1048.

Hernandez-Pando, R., D. Aguilar, I. Cohen, M. Guerrero, W. Ribon, P. Acosta, H. Orozco, B. Marquina, C. Salinas, D. Rembao y C. Espitia. 2010. **Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model.** *Tuberculosis.* 90(4):268-77.

Hanekom, M., E.M. Streicher, D. Van de Berg, H. Cox, C. McDermid, M. Bosman, N.C. Gey van Pittius, T.C. Victor, M. Kidd, D. van Soolingen, P.D. van

Helden y R.M. Warren. 2013. **Population Structure of Mixed *Mycobacterium tuberculosis* Infection Is Strain Genotype and Culture Medium Dependent.** *PLoS One*. 8(7):e70178.

Huang, H.Y., Y.S. Tsai, J.J. Lee, M.C. Chiang, Y.H. Chen, C.Y. Chiang, N.T. Lin y P.J. Tsai. 2010. **Mixed infection with Beijing and non-Beijing strains and drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Clin Microbiol*. 48(12):4474-80.

Huard, R.C., L.C. Lazzarini, W.R. Butler, D. van Soolingen y J.L. Ho. 2003. **PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions.** *J Clin Microbiol* 41(4):1637-1650.

Ioerger T.R., Y. Feng, X. Chen, K.M. Dobos, T.C. Victor, E.M. Streicher, R.M. Warren, N.C. Gey van Pittius, P.D. Van Helden y J.C. Sacchettini. 2010. **The non-clonality of drug resistance in Beijing-genotype isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the Western Cape of South Africa.** *BMC Genomics*. 11:670

Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal y J. van Embden. 1997. **Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology.** *J Clin Microbiol*. 35(4), 907-914

Kamper-Jørgensen, Z., A.B. Andersen, A. Kok-Jensen, I.C. Bygbjerg, P.H. Andersen, V.O. Thomsen, M. Kamper-Jørgensen y T. Lillebaek. 2012. **Clustered tuberculosis in a low-burden country: nationwide genotyping through 15 years.** *J Clin Microbiol*. 50(8):2660-2667

Katoch, V. M. 2004. **Infections due to non.tuberculous mycobacteria (NTM).** *Indian J Med Resp*. 120:194-304.

Lahlou, O., J. Millet, I. Chaoui, R. Sabouni, A. Filali-Maltouf, M. Akrim, M. El Mzibri, N. Rastogi y R. El Aouad. 2012. **The genotypic population structure of**

***Mycobacterium tuberculosis* complex from Moroccan patients reveals a predominance of Euro-American lineages.** *PLoS One*. 7(10):e47113.

Lai, C.C., C.K. Tan, C.H. Chou, H.L. Hsu, C.H. Liao, Y.T. Huang, P.C. Yang, K.T. Luh y P.R. Hsueh. 2010. **Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2008.** *Emerg Infect Dis*. 16(2):294–296.

Lopez-Alvarez, R., C. Badillo-Lopez, J.F. Cerna-Cortes, I. Castillo-Ramirez, S. Rivera-Gutierrez, A.C. Helguera-Repetto, D. Aguilar, R. Hernandez-Pando, S. Samper y J.A. Gonzalez-y-Merchand. 2010. **First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance.** *BMC Microbiol*. 10:82.

López-Rocha, E., J. Juárez-Álvarez, L. Riego-Ruiz, L. Enciso-Moreno, F. Ortega-Aguilar, J. Hernández-Nieto, J.A. Enciso-Moreno y R. López-Revilla. 2013. **Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México.** *BMC Res Notes*. 6:172.

Mallard, K., R. McNerney, A.C. Crampin, R. Houben, R. Ndlovu, L. Munthali, R.M. Warren, N. French y J.R. Glynn. 2010. **Molecular detection of mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi.** *J Clin Microbiol*. 48(12):4512-4518.

Martín-Casabona, N., A.R. Bahrmand, J. Bennedsen, V.O. Thomsen, M. Curcio, M. Fauville-Dufaux, K. Feldman, M. Havelkova, M.L. Katila, K. Köksalan, M.F. Pereira, F. Rodrigues, G.E. Pfyffer, F. Portaels, J.R. Urgell, S. Rüscher-Gerdes, E. Tortoli, V. Vincent, B. Watt, Spanish Group for Non-Tuberculosis Mycobacteria. 2004. **Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey.** *Int J Tuberc Lung Dis*. 8(10):1186-1193.

Mathema, B., N.E. Kurepina, P.J. Bifani y B.N. Kreiswirth. 2006. **Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights.** *Clin Microbiol Rev*. 19(4):658-85.

Mokrousov, I., V. Valcheva, N. Sovhozova, A. Aldashev, N. Rastogi y J. Isakova. 2009. **Penitentiary population of *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyzstan: exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype.** *Infect Genet Evol.* 9(6):1400-1405.

Molina-Torres, C.A., E. Moreno-Torres, J. Ocampo-Candiani, A. Rendon, K. Blackwood, K. Kremer, N. Rastogi, O. Welsh y L. Vera-Cabrera. 2010. ***Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico.** *J Clin Microbiol.* 48(2), 448-455.

Mostowy, S. y M.A. Behr. 2005. **The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Clin Chest Med.* 26(2):207-216.

Murray, M. 2002. **Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(3):1538-1543.

Nava-Aguilera, E., Y. López-Vidal, E. Harris, A. Morales-Pérez, S. Mitchell, M. Flores-Moreno, A. Villegas-Arrizón, J. Legorreta-Soberanis, R. Ledogar y N. Andersson. 2011. **Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors.** *Clin Dev Immunol.* 2011:408375.

Nicol, M.P. y R.J. Wilkinson. 2008. **The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Trans R Soc of Trop Med Hyg.* 102:955-965.

Peng, Y., C. Yang, X. Li, T. Luo, F. Li y Q. Gao. 2013. **Multiple samples improve the sensitivity for detection of mixed *Mycobacterium* infections.** *Tuberculosis.* 93(5):548-550.

Shamputa, I.C., L. Jugheli, N. Sadradze, E. Willery, F. Portaels, P. Supply y L. Rigouts. 2006. **Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia.** *Respir Res.* 17;7:99.

Smit, I. (2003) ***Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence.** *Clin Microbiol Rev.*16(3):463-96.

Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rüsch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina *et al.* 2006. **Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Clin Microbiol.* 44(12):4498-510.

Talarico, S., M.D. Cave, B. Foxman, C.F. Marrs, L. Zhang, J.H. Bates y Z. Yang. 2007. **Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 Polymorphism with Clinical and Epidemiological Characteristics.** *Tuberculosis.* 87(4):338-346.

Talarico, S., L. Zhang, C.F. Marrs, B. Foxman, M.D. Cave, M.J. Brennan y Z. Yang. 2008. ***Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS16 and PE_PGRS26 genetic polymorphism among clinical isolates.** *Tuberculosis.* 88(4):283–294.

Tang, C., J.F. Reyes, F. Luciani, A.R. Francis, M.M. y Tanaka, M.M. 2008. **SpolTools: online utilities for analyzing spoligotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Bioinformatics.* 15;24(20):2414-2415.

Tsenova, L., A. Bergtold, V.H. Freedman, R.A. Young y G. Kaplan. 1999. **Tumor necrosis factor α is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5657-5662.

Thwaites, G., M. Caws, T.T. Chau, A. D'Sa, N.T. Lan, M.N. Huyen, S. Gagneux, P.T. Anh, D.Q. Tho, E. Torok, N.T. Nhu, N.T. Duyen, P.M. Duy, J. Richenberg, C. Simmons, T.T. Hien y J. Farrar. 2008. **Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis.** *J Clin Microbiol.* 46(4):1363-1368.

Uplekar, S., B. Heym, V. Friocourt, J. Rougemont y S.T. Cole. 2011. **Comparative genomics of Esx genes from clinical isolates of *Mycobacterium***

tuberculosis provides evidence for gene conversion and epitope variation. *Infect Immun.* 79(10):4042-4049

van Rie, A.,T.C. Victor, M. Richardson, R. Johnson, G.D. van der Spuy, E.J. Murray, N. Beyers, N.C. Gey van Pittius, P.D. van Helden y R.M. Warren. 2005. **Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns.** *Am J Respir Crit Care Med.* 172(5):636-642.

van Soolingen, D., L. Qian, P.E. de Haas, J.T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H.Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa y J.D. van Embden. 1995. **Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia.** *J Clin Microbiol.* 33(12):3234-3238.

Van Soolingen, D. 2001. **Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements.** *J Intern Med.* 249(1):1-26.

Varghese, B., P. Supply, M. Shoukri, C. Allix-Beguec, Z. Memish, N. Abuljadayel, R. Al-Hakeem, F. Alrabiah y S. Al-Hajoj. 2013. **Tuberculosis transmission among immigrants and autochthonous populations of the eastern province of Saudi Arabia.** *PLoS ONE* 8(10):e77635

Weisenberg, S.A., A.L. Gibson, R.C. Huard, N. Kurepina, H. Bang, L.C. Lazzarini, Y. Chiu, J. Li, S. Ahuja, J. Driscoll, B.N. Kreiswirth y J.L. Ho. 2012. **Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RD(Rio) *Mycobacterium tuberculosis* sublineage.** *Infect Genet Evol.* 12(4):664-70.

CONCLUSIONES GENERALES

El comportamiento de la enfermedad es complejo y se requiere de agrupar los municipios según sus características epidemiológicas para enfrentar mejor este problema.

A pesar de haberse encontrado un linaje predominante en la colección de aislados analizada, no se obtuvieron grupos con un perfil alélico idéntico. Esto sugiere una gran diversidad genética dentro de la población de *M. tuberculosis* en el estado.

Es necesario enfatizar la importancia de generar perfiles epidemiológicos y moleculares regionales en base a la totalidad de los datos obtenidos por los programas de vigilancia epidemiológica y no de muestras poblacionales. Esto permite la identificación de comportamientos epidemiológicos complejos, de las necesidades regionales y es mucho más informativo que los valores promedio de incidencia y prevalencia

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Este trabajo permite delinear futuros trabajos de investigación en el tema. Las perspectivas que surgen de cada parte de este trabajo pueden resumirse como sigue:

1. ¿Qué factores sociodemográficos delinear el comportamiento de cada región propuesta?
2. ¿Qué tan frecuente es la tuberculosis zoonótica al norte del estado?
3. ¿Existen diferencia en la prevalencia de genotipos foráneos entre las regiones propuestas?
4. ¿Qué efecto tienen los eventos de migración en la diversidad genética de *M. tuberculosis* y su comportamiento epidemiológico en el estado?
5. ¿Qué perfil de resistencia a antibióticos tienen estas cepas? ¿Dicho perfil está asociado a algún genotipo específico?
6. ¿Qué características genéticas poseen las cepas que son capaces de diseminarse y atravesar la barrera hematoencefálica, independientemente de su linaje?