

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



**Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en
Baja California**

TESIS

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

PRESENTA:

PATRICIA RADILLA CHÁVEZ

TIJUANA, B.C., MÉXICO

ENERO, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en
Baja California”**

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

PATRICIA RADILLA CHAVEZ

Aprobada por:

Dra. Raquel Muñiz Salazar

Director de tesis

Dra. Adriana C. Vargas Ojeda

Sinodal

Dra. Ana Ma. Valles Medina

Sinodal

Dr. María del Rosio Barajas Escamilla

Sinodal

Dra. Ma. Evarista Arellano García

Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Directora de tesis la **Dra. Raquel Muñiz Salazar** por compartir el conocimiento de una manera clara y precisa durante mi formación, que me impulsa a continuar investigando siempre con la finalidad de generar conocimiento trascendente y de impacto en el área de la salud, pero sobre todo gracias por ser una gran amiga.

Agradezco también al Director de la **Escuela de Ciencias de la Salud, M.S.P. David S. Salas Vargas**, por todo el apoyo brindado para el desarrollo de este estudio. Así también a todo el personal del Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de la Esc. de Cs. de la Salud, por todo el apoyo en los análisis moleculares.

Agradezco también a todos los maestros que contribuyeron en mi formación y a mis sinodales por aportar tiempo y conocimiento para mejorar el producto de esta investigación en beneficio de la comunidad.

Quiero agradecer a una gran amiga **Ofelia** por escucharme e impulsarme a seguir siempre adelante, a **Alejandra, Amelia, Aurora, Gelos y Griselda** por toda la ayuda que me brindaron durante este tiempo para cumplir con todas las exigencias que esta actividad requería y que sin su ayuda no hubiese sido posible.

Finalmente quiero agradecer a Dios por permitirme cumplir este sueño y a mis padres **Felipe y Felicitas** por darme la vida, amor y consejos, al igual que a mis hermanos y sobrinos por el apoyo que me han brindado siempre, y sobre todo por enseñarme que es satisfactorio tener con quien compartir cada logro y meta cumplida.

Este proyecto se realizó con el apoyo del proyecto de investigación “Estudio genético de cepas farmacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en Baja California”

Financiado por la 14ª Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación de la UABC.

No. Proyecto 4276.

Enero 2010 – Diciembre 2011

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa que en los últimos años se ha agravado con la aparición de cepas farmacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Baja California es el estado con la mayor prevalencia e incidencia de la República Mexicana. La tasa de incidencia de TB en Baja California para 2010 fue de 54.1 por 100 mil habitantes, siendo tres veces más que la tasa nacional (16.8 por 100 mil habitantes).

El objetivo principal de este estudio fue el de caracterizar genéticamente aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes diagnosticados con tuberculosis referidos al Laboratorio Estatal de Tuberculosis en Baja California en el periodo de Octubre 2009 a Octubre del 2010. Las muestras clínicas de los pacientes fueron referidas al Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California, Hospital General de Tijuana (LETBC), en donde se realizó el análisis baciloscópico, el cultivo microbiológico y el análisis de sensibilidad farmacológica. Posteriormente, se tomó una muestra de cada uno de los cultivos microbiológicos que crecieron (aislado clínico), para proceder a su análisis molecular en el Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular (LEEM) de la Escuela de Ciencias de la Salud, UABC Ensenada. De todos los aislados clínicos colectados, se realizó una búsqueda del expediente clínico del paciente correspondiente en la Plataforma Única de Tuberculosis de la Secretaría de Salud para analizar los datos sociodemográficos y clínicos existentes.

Se colectaron un total de 61 muestras de aislados clínicos, de los cuales el 6.6% de los aislados clínicos fue identificado molecularmente como *M. bovis* y el 93.4 % como *M. tuberculosis*. De estos aislados, el 96.7% amplificó el gen de resistencia correspondiente a uno o más de los cinco fármacos de primera línea y dos de segunda línea analizados en este estudio. El 3.3% restante no amplificó ninguno de los genes, por lo que se les clasifica como sensibles a todos los fármacos probados en este estudio. En general, la resistencia más común en los aislados clínicos fue para H, S y R (79.7%, 72.9% y 71.2%,

respectivamente), mientras que la menos común fue para K y O (55.9.8% y 50.8%, respectivamente). El 6.5% de los aislados presentaron un perfil monorresistente a H, R, S y O. La mayor parte de los aislados (72.9%) fueron farmacorresistentes a 3 o más fármacos. Así también, se detectó que el 10.2% son aislados ultrarresistentes (X-DR) de acuerdo al criterio de la OMS (H+Z+R+S+E+K+O).

De los 61 aislados clínicos solo el 83.6% amplificaron los 12 loci de MIRU-VNTR, el resto de los aislados no amplificó tres o más de los loci, por lo que se eliminaron de la base de datos. El análisis de los genotipos MIRU-VNTR incluyendo el perfil de farmacorresistencia molecular identificó 10 linajes diferentes. El menor porcentaje (2%) correspondió a los linajes de Europa-Asia-India (EIA) y X; el linaje Beijing estuvo representado en el 3.9% de los casos, así como Bovis, Camerún, y Ghana. El 7.8% correspondió al Linaje de América Latina (LAM), 9.8% Uganda, 13.7% Sensible (S), 15.7% perteneció al linaje Harlem y el 33% correspondió a un nuevo linaje (N).

La edad de los pacientes presentó una distribución normal, con una media de 37 años, siendo un mínimo de 13 años y un máximo de 70 años. El sexo masculino representó el 67% y el sexo femenino el 33% del total de la muestra. El 47.5% es originario de Baja California, 46.0% proviene de diferentes estados de la República Mexicana y el 6.5% no especifica el lugar de nacimiento. Con respecto a los foráneos, el mayor número de aislados correspondió a pacientes originarios del estado de Durango 6.5%, seguido de Guanajuato, Jalisco y Veracruz con 4.9% cada uno. En cuanto al lugar de residencia actual, el 97% reportó vivir en Baja California, el 1.5% en Baja California Sur y 1.5% reside actualmente en Sonora. En cuanto a los pacientes que residen en Baja California, el 76.3% reside en Tijuana, 16.9% en Ensenada, 3.4% en Mexicali, 1.7% en Rosarito y 1.7% en Tecate.

La ocupación de los participantes de la muestra fue de 42.6% asalariados, 32.8% desempleados, 19.7% amas de casa, y 4.9% no se especificó. En cuanto la escolaridad, 36% tiene nivel primaria, 27.9% secundaria, 16.4% preparatoria, 11.5% profesional, 4.9% sin escolaridad y 3.3% no especificado.

Del total de pacientes (n = 61) que ingresaron al tratamiento el 63.9% fueron nuevos casos, 19.7% recaídas, 11.5% reingresos y 4.9% referidos. Con respecto a los que egresaron del tratamiento, el 49.2% se curaron, 16.4% abandonaron el tratamiento, 9.8% fallecieron, 14.8% fracasaron, 6.6% son de término tratamiento, 1.6% fue traslado y 1.6% aún continúa tratamiento.

En cuanto al análisis combinando egreso del tratamiento y sexo, resulto que los hombres fueron los que presentaron el mayor porcentaje tanto de curación, abandono y defunción (60%, 100% y 83.3%, respectivamente). Mientras que para los de término de tratamiento fue homogénea la distribución, 50% cada uno de los dos sexos.

El análisis de enfermedades asociadas a la TB con respecto al tipo de egreso mostró que de los 32 pacientes que no presentaron ninguna enfermedad asociada, el 56.3% se curaron, el 15.6% fracasaron y el 6.3% abandonaron el tratamiento. En cuanto a los pacientes usuarios de drogas, el 66.7% abandonó el tratamiento y el 33.% fracasó. Los pacientes con diabetes mostraron el mismo comportamiento en cuanto a curación, abandono, fracaso y defunción, mostrando un 25% en cada caso. El análisis de los ocho pacientes con alcoholismo reveló que el 62.5% se curó, pero el 25% murió, mientras el 12.5% abandonó el tratamiento. De los cinco pacientes registrados con VIH/SIDA, el 60% se curó mientras que el 40% (2) abandono el tratamiento.

Palabras claves: Tuberculosis, farmacorresistencia, genes, Baja California, XR.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVOS.....	9
Objetivo General.....	9
HIPÓTESIS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
1. Población de estudio y obtención de muestras.....	11
2. Baciloscopia.....	11
1. Estudio microbiológico (aislamientos).....	12
1. Análisis Molecular.....	13
1.1 Extracción de ADN.....	13
RESULTADOS.....	22
a) Edad y Sexo.....	29
b) Lugar de nacimiento y de residencia.....	30
c) Ocupación y escolaridad.....	31
a) Baciloscopia y cultivo microbiológico.....	31
b) Tipos de caso de ingreso y egreso a tratamiento.....	32
c) Esquema y tiempo de tratamiento.....	34
Enfermedad asociada vs Tipo de egreso.....	36
Tipo de Ingreso, Egreso vs Sexo.....	37
Variables sociodemográficas vs Variables clínicas.....	37
Variables clínicas vs Sexo.....	38
Grupo de genotipo vs Tipo egreso.....	39
Genotipo Linaje vs Variables clínicas y sociodemográficas.....	40
Perfil farmacorresistencia molecular vs fluométrico.....	46
DISCUSION.....	48
Variables sociodemográficas.....	48
Variables clínicas.....	49
Mycobacterium bovis.....	54

CONCLUSIONES.....	56
LITERATURA CITADA.....	58
ANEXO 1. Estudio Epidemiológico de tuberculosis.....	66
Anexo 2. Genes de resistencia a fármacos de primera y segunda línea de Mycobacterium tuberculosis.	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis de la PCR multiplex para la identificación de <i>M. bovis</i> (168 pb) y <i>M. tuberculosis</i> (337 pb). E = escalera, 1 – 3, 5,6,8 y 9 son aislados clínicos identificados como <i>M. tuberculosis</i> ; 4 y 7 aislados clínicos identificados como <i>M. bovis</i>	22
Figura 2. Relación genética entre aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> de acuerdo al genotipo con base en 12 loci de MIRU-VNTR. La construcción del fenograma se obtuvo a partir del algoritmo del vecino más cercano (Neighbour-Joining; NJ) con base en la distancia categórica implementado en la herramienta de (http://www.miru-vnrplus.org/MIRU/index.faces). La longitud de las ramas refleja la distancia genética.	27
Figura 3. Relación genética entre aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> de acuerdo al genotipo con base en 12 loci de MIRU-VNTR y perfil de farmacorresistencia (H, S, E, R, Z). La construcción del dendrograma se obtuvo a partir del algoritmo del vecino más cercano (Neighbour-Joining; NJ) con base con base en la distancia categórica implementado en la herramienta de (http://www.miru-vnrplus.org/MIRU/index.faces). La longitud de las ramas refleja la distancia genética.....	28
Figura 4. Distribución normal de la edad en años de 61 pacientes analizados.....	29
Figura 5. Dendrograma de la relación entre variables sociodemográficas y clínicas.....	37
Figura 6. Asociación de variables clínicas con el sexo	38
Figura 7. Análisis comparativo del linaje vs variables clínicas (tipo de ingreso y egreso) y variables sociodemográficas (lugar de residencia y lugar de origen).	41
Figura 8. Distribución de linajes con respecto al lugar de residencia	42
Figura 9. Relación entre lugar de residencia y tipo de egreso, así también, entre lugar de origen y linaje MIRU- Farmacorresistencia.....	43
Figura 10. Relación entre lugar de residencia y tipo de egreso, así también, entre lugar de origen y linaje MIRU-No Farmacorresistencia	44
Figura 11. Asociación entre farmacorresistencia y variables clínicas y sociodemográficas	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del tipo de ingreso al tratamiento de tuberculosis de acuerdo a la NOM-006 SSA2-1993.....	19
Tabla 2. Clasificación del tipo de egreso al tratamiento de tuberculosis de acuerdo a la NOM-006-SSA2-1993.	20
Tabla 3. Clasificación de esquema de tratamiento de tuberculosis de acuerdo a la NOM-006-SSA2-1993.....	21
Tabla 4. Perfil de farmacorresistencia molecular de aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> . (Isoniazida, H; Pirazinamida, Z; Rifampicina, R; Estreptomina, S; Etambutol, E; Ofloxacina, O y Kanamicina, K).....	24
Tabla 5. Relación del número (n) y porcentaje (%) de aislados clínicos correspondientes a los linajes de genotipo con base en la información de MIRU-VNTR y farmacorresistencia.....	25
Tabla 6. Lugar de nacimiento de pacientes analizados en este estudio.....	30
Tabla 7. Clasificación del tipo de ingreso al tratamiento de acuerdo al sexo.....	32
Tabla 8. Clasificación del tipo de egreso al tratamiento de acuerdo al sexo.....	33
Tabla 9. Relación de enfermedades asociadas que se reportaron en el paciente al momento del ingreso al tratamiento de tuberculosis.....	35
Tabla 10. Relación de enfermedades asociadas con respecto al tipo de egreso al tratamiento de tuberculosis.....	36
Tabla 11. Descripción del tipo de egreso de acuerdo al grupo de genotipo (MIRU-Farma) de los aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> analizados.....	39
Tabla 12. Comparación entre el perfil farmacorresistencia molecular y flurométrico.....	47

INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es un padecimiento infecto-contagioso producida por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*(Wills & Ostler, 2001). La incidencia mundial es de 10 millones, el número de muertes asciende a 3 millones, de tal forma que aproximadamente el 6% de todas las muertes globales son consecuencia de este padecimiento(WHO, 2009). Se estima que aproximadamente una tercera parte de la población mundial, actualmente se encuentra infectada por *M. tuberculosis*.

México se ubica entre los nueve países de alta carga de las Américas(WHO, 2009). De acuerdo a la Secretaria de Salud en 2010 (Secretaría de Salud, 2011) se registraron 18,848 casos nuevos de TB en todas sus formas (81.6% pulmonar, 1.6% meningea, 5.7 ganglionar y 11.1 % otras formas). El 20% de casos nuevos están asociados a diabetes, el 4.9% son de pediatría (< 15 años) y el 5.8% asociados con SIDA.

La tasa de incidencia de TB en Baja California para 2010 fue de 54.1 por 100 mil habitantes, siendo tres veces más que la tasa nacional (16.8 por 100 mil habitantes). Otros estados que reportan altas tasas de incidencia de TB, son Tamaulipas, Guerrero, Nayarit, Sonora, Sinaloa, Veracruz, Chiapas y Nuevo León, los cuales concentran el 70% de los casos identificados en el país (Secretaría de Salud, 2011). Además, la mayor tasa de mortalidad también se presenta en Baja California, 5.94 por 100 mil hab., siendo que la tasa nacional es de 2.0 por 100 mil habitantes. En cuanto a la tasa de prevalencia, Veracruz es el que reporta el valor más alto con 34 casos por 100 mil habitantes, Baja California es el segundo con 28 casos por 100 mil habitantes (Secretaría de Salud, 2011).

Baja California es uno de los estados considerados como zona de atracción de migrantes indígenas, principalmente de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Guerrero (Rubio et al., 2000). En el año 2002, la migración en Baja California fue responsable de cerca de la mitad (44%) de su crecimiento demográfico total. Por cada nacimiento en el estado, llega una persona de otra entidad a residir a Baja California (57 mil inmigrantes y 55 mil nacimientos)(2008; Garfein et al., 2010). Un factor que puede estar contribuyendo a la

dispersión de la TB en México, es la congregación de individuos infectados con TB de forma latente y el alto índice de migración del sur de México hacia la frontera Baja California-California, así como el retorno de los mismos a sus ciudades de origen, después de un periodo de tiempo en la zona (Garfein et al., 2010).

Otro aspecto importante en la problemática de la TB es el incremento a nivel mundial de cepas multirresistentes (TB-MR) y ultrarresistente (TB-XR). De acuerdo a la OMS, la TB-MR, se define como aquellas cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes por lo menos a los dos fármacos antituberculosos de primera línea más potentes, la rifampicina e isoniazida. Mientras que la TB-XR se define como aquella que es resistente a todos los medicamentos de primera línea, a una fluoroquinolona y por lo menos a uno de los tres antibióticos inyectables de segunda línea (amikacina, capreomicina o kanamicina). Actualmente, sólo se diagnostican y se tratan adecuadamente el 2% de los casos mundiales de TB-MR, sobre todo debido a la inexistencia de servicios de laboratorio satisfactorios (WHO, 2008). La OMS calcula que cada año se producen en todo el mundo cerca de medio millón de casos nuevos de TB-MR, lo que representa el 5% de los nueve millones de casos nuevos anuales de TB (WHO, 2008, 2009). Entre 1986 y 1990, la OMS y la OPS reportaron un 19% de resistencia primaria en México (Laszlo & de Kantor, 1994; García-García et al., 1995; WHO, 2006). Estudios para Baja California reportan que las tasas de TB resistente a un solo fármaco (TB-DR) son muy elevadas (41%), y para TB-MR entre 50 – 100 individuos (Peter et al., 1998; California Tuberculosis Controllers Association, 2005).

Los casos con TB-MR difícilmente se curan, particularmente si padecen algún desorden de inmunodeficiencia VIH/ SIDA o desnutrición. Además, su tratamiento es más tóxico y costoso que el tratamiento de pacientes con cepas sensibles (Mitchison & Nunn, 1986; Frieden et al., 1996). Por tal motivo es crítico contar con estudios que permitan identificar y caracterizar genéticamente las cepas de *M. tuberculosis* que presenta cada paciente, y de esta manera aplicar el tratamiento antifímico adecuado dependiendo del perfil de farmacorresistencia. Actualmente, existen marcadores moleculares para determinar la farmacorresistencia tanto en aislados como en muestras clínicas,

amplificando por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los genes relacionados con la resistencia a fármacos de primera y segunda línea.

En el control de la diseminación de la enfermedad a nivel mundial, el análisis de genotipos es una excelente herramienta para el estudio epidemiológico, , permitiendo identificar el origen genético de las cepas circulantes, analizar sus cambios evolutivos y caracterizar genéticamente las cepas farmacorresistentes. Actualmente la técnica de MIRU-VNTR (Supply et al., 2000; Mazars et al., 2001), basada en secuencias de repetición de número variable (VNTRs) en las unidades de repetición interespaciadas micobacterianas (MIRUs), ha demostrado que es un método confiable, reproducible con un alto nivel de discriminación entre las cepas aún cuando se trate de cepas con genotipo de Beijing (Mazars et al., 2001; Supply et al., 2001; Cowan et al., 2002; Sola et al., 2003; Oelemann et al., 2007; Allix-Béguec et al., 2008). Una ventaja más es que puede automatizarse el procedimiento, haciendo que el análisis de datos sea más rápido y más exacto (Supply et al., 2001; Allix et al., 2004). Este marcador se ha utilizado en estudios poblacionales para analizar la transmisión de TB, la identificación del linaje de las cepas e identificar infecciones con cepas mixtas (Allix-Béguec et al., 2008; Dickman et al., 2010).

Es una realidad que la TB requiere de un diagnóstico rápido para iniciar el tratamiento antifímico, el cual tiene que ser adecuado para el tipo de cepa(s) de *M. tuberculosis* que presente el paciente. El empleo y la optimización de la tecnología para el diagnóstico de estos padecimientos en una de las principales áreas endémicas del país acortarán tiempos, mejorando la detección temprana y el tratamiento adecuado basado en evidencia de la población afectada usuaria del sistema nacional de salud. Además, al identificar el genotipo y el perfil de farmacorresistencia de las cepas que presenten los pacientes diagnosticados con TB, se podrá aplicar el tratamiento adecuado a cada uno de los pacientes, asegurando de esta manera la recuperación exitosa del individuo y evitando la dispersión de cepas multirresistentes.

ANTECEDENTES

El complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), el cual comprende a las especies de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, y recientemente reconocida *M. canettii* y *M. caprae*, son los agentes causales de la tuberculosis (TB) tanto en humanos como en animales (Brosch et al., 2002; Mostowy et al., 2002). Es una infección de importancia creciente que afecta sobre todo a las poblaciones más pobres y a las personas con problemas de inmunodeficiencia, incluyendo a las personas con VIH. Es un problema de salud pública el cual se ha visto agravado por el desarrollo reciente de infecciones multi-resistentes, cuyo tratamiento es complicado, largo y costoso (Secretaría de Salud, 2007).

La situación actual de la TB a nivel mundial ocupa uno de los primeros lugares dentro de las prioridades de las agendas pendientes por resolver en cualquier país. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó hasta el año 2009, 14.4 millones de casos prevalentes, de los cuales 9.2 millones son casos nuevos de la enfermedad (Hernández-Hernández & Rodríguez, 2009). Casi la mitad de ellos son bacilíferos, es decir, son capaces de transmitir la enfermedad a sus contactos directos. Aproximadamente el 6% de muertes mundiales son consecuencia de este padecimiento (WHO, 2009). La mortalidad por TB se ha incrementado de 1.3 a 1.7 millones de defunciones en menos de dos años a pesar de los esfuerzos para combatir la enfermedad (Hernández-Hernández & Rodríguez, 2009). Se estima que aproximadamente una tercera parte de la población mundial, actualmente se encuentra infectada por *M. tuberculosis*.

México se ubica entre los nueve países de alta carga de las Américas (WHO, 2009). En México, la TB es un problema de salud pública, considerado como tal en el Plan Nacional de Salud 2007-2012 (Secretaría de Salud, 2007) y actualmente se ha incorporado al Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2006-2015, formulado por el “Comité Alto a la Tuberculosis” y la Organización Mundial de la Salud (Hernández-Hernández & Rodríguez, 2009). De acuerdo a la Secretaría de Salud en 2010 (Secretaría de Salud, 2011) se registraron 18,848 casos nuevos de TB en todas sus formas (81.6% pulmonar, 1.6%

meníngea, 5.7 ganglionar y 11.1 % otras formas). El 20% de casos nuevos están asociados a diabetes, el 4.9% son de pediatría (< 15 años) y el 5.8% asociados con SIDA.

La tasa de incidencia de TB en Baja California para 2010 fue de 54.1 por 100 mil habitantes, tres veces más que la tasa nacional (16.8 por 100 mil hab.). Otros estados que reportan altas tasas de incidencia de TB, son Tamaulipas, Guerrero, Nayarit, Sonora, Sinaloa, Veracruz, Chiapas y Nuevo León, los cuales concentran el 70% de los casos identificados en el país (Secretaría de Salud, 2011). Además, la mayor tasa de mortalidad también se presenta en Baja California, 5.94 por 100 mil hab., por encima de la tasa nacional reportada en 2.0 por 100 mil hab. En cuanto a la tasa de prevalencia, Veracruz es quien reporta el valor más alto con 34 casos por 100 mil hab., siendo Baja California el segundo con 28 casos por 100 mil hab. (Secretaría de Salud, 2011).

Baja California es uno de los estados considerados como zona de atracción de migrantes indígenas, principalmente de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Guerrero (Rubio et al., 2000). En el año 2002, la migración en Baja California fue responsable de cerca de la mitad (44%) de su crecimiento demográfico total. Por cada nacimiento en el estado, llega una persona de otra entidad a residir a Baja California (57 mil inmigrantes y 55 mil nacimientos)(Gobierno de Baja California, 2008; Garfein et al., 2010). En la región agrícola de San Quintín localizada en el municipio de Ensenada, Baja California, residen entre 30,000 y 40,000 personas que trabajan en la actividad agrícola, de los cuales, aproximadamente 15,000 son migrantes principalmente de Oaxaca, Veracruz, Chiapas y Guerrero (Rubio et al., 2000; SEDESOL, 2007; Consejo Nacional de Población, 2009). Un estudio realizado en una comunidad de San Quintín registró una prevalencia del 40% de infección latente de TB (SEDESOL, 2007; Consejo Nacional de Población, 2009). De estos, una tercera parte reportó que había viajado a E.U. o al área de la frontera desde que vivían en San Quintín. Durante 2008, aproximadamente el 75% de los casos de TB en California, eran de personas nacidas fuera de EU, la mayoría de origen mexicano (n = 623).Aproximadamente, el 20% de los casos de TB de personas nacidas en México reportados en San Diego, han sido diagnosticados dentro del año posterior a su arribo a EU (California Tuberculosis Controllers Association, 2005; California Department of Public

Health, 2009a, b). El flujo diario de personas entre Baja California y California cuenta con un registro de aproximadamente 80 millones de cruces al año, lo que se traduce a 219,178 cruces por día. La congregación de individuos infectados de forma latente con TB y el alto índice de población migrante del sur de México hacia la frontera Baja California-California y el retorno de los mismos a sus ciudades de origen, después de un periodo de tiempo en la zona, puede ser un factor que está contribuyendo a la dispersión de la TB en México (Garfein et al., 2010).

Otro aspecto importante en la problemática de la TB es el incremento a nivel mundial de cepas multirresistentes (TB-MR) y ultrarresistente (TB-XR). De acuerdo a la OMS, la TB-MR, se define como aquellas cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes por lo menos a los dos fármacos antituberculosos de primera línea más potentes: la rifampicina e isoniazida. Actualmente, sólo se diagnostican y se tratan adecuadamente el 2% de los casos mundiales de TB-MR, sobre todo debido a la inexistencia de servicios satisfactorios de laboratorio (WHO, 2008). Los casos con TB-MR difícilmente se curan, particularmente si el paciente tiene agregado algún padecimiento o algún desorden de inmunodeficiencia VIH/ SIDA o desnutrición. Además, su tratamiento es más tóxico y costoso que el tratamiento de pacientes con cepas sensibles (Mitchison & Nunn, 1986; Frieden et al., 1996). La OMS calcula que cada año se producen en todo el mundo cerca de medio millón de casos nuevos de TB-MR (WHO, 2008, 2009). Entre 1986 y 1990, la OMS y la OPS reportaron la existencia de un 19% de resistencia primaria en México (Laszlo & de Kantor, 1994; García-García et al., 1995; WHO, 2006). Estudios para Baja California reportan que las tasas de TB resistente a un solo fármaco (TB-DR) son muy elevadas (41%), y para TB-MR entre 50 y 100 individuos (Peter et al., 1998; California Tuberculosis Controllers Association, 2005).

La farmacorresistencia en *M. tuberculosis* se debe principalmente a mutaciones en secuencias que codifican para 1) bloqueo de la actividad de un fármaco, 2) bloqueo en la activación de una pro-fármaco o 3) produce un enlace o destruye a la droga. Actualmente, se han determinado mutaciones en genes que están asociadas a la resistencia de fármacos antituberculosos de primera (Estreptomina, S; Isoniazida, H; Rifampicina, R; Etambutol,

E y Pirazinamida, Z) y segunda línea (Ofloxacina, O y Kanamicina, K). Actualmente, existen marcadores moleculares para determinar la farmacorresistencia tanto en aislados como en muestras clínicas.

La baciloscopia por tinción de Ziehl-Nielsen, es el procedimiento estándar en la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, es sensible solo en pacientes bacilíferos de 5000 – 10000 bacterias por mililitro en la muestra clínica, lo cual es una de sus limitantes (Heifers & Good, 1994). El cultivo microbiológico, es el estándar de oro como diagnóstico confirmatorio en pacientes con cuadro clínico sugestivo de TB y con baciloscopías negativas. Sin embargo, tiene la desventaja de tardar entre seis a ocho semanas para su confirmación y solo se realiza en laboratorios de referencia, alejados de los centros de atención de primer y segundo nivel, lo cual retrasa el inicio del tratamiento y favorece la dispersión de la TB.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares que superan la sensibilidad y la especificidad de las pruebas tradicionales. Estas técnicas facilitan el diagnóstico temprano, permitiendo la instauración del tratamiento lo más rápido posible y disminuyendo los costos que esto implica al sector salud. Con los métodos de extracción de ADN disponibles, actualmente es posible la identificación de micobacterias a partir de cualquier muestra biológica y en un periodo de tiempo corto en comparación con los métodos tradicionales.

La identificación molecular de la especie de *Mycobacterium* en los aislados microbiológicos clínicos es de gran importancia para poder aplicar el tratamiento farmacológico adecuado. Por ejemplo, la infección por *M. tuberculosis* es clínica y radiológicamente indistinguible de la causada por *M. bovis*, y las lesiones no se diferencian morfológica o histológicamente, por lo que para lograr el diagnóstico diferencial se debe recurrir al cultivo, a las pruebas bioquímicas y a las técnicas moleculares. Esto es importante, debido a que el tratamiento por *M. bovis* debe omitir el uso de la pirazinamida, a la cual este organismo es naturalmente resistente. En la región de Baja California-California, se ha incrementado el número de casos de TB por *M. bovis* (Wayne et al., 2000;

Huygens et al., 2004), por lo que existe una alta probabilidad de encontrar cepas de *M. bovis* en humanos.

En el control de la diseminación de la enfermedad a nivel mundial, el análisis de genotipos es una excelente herramienta para el estudio epidemiológico, permitiendo identificar el origen genético de las cepas circulantes, analizar sus cambios evolutivos y caracterizar genéticamente las cepas farmacorresistentes. Los primeros estudios de genotipos para *M. tuberculosis* fueron con la técnica del análisis largo de los fragmentos de restricción (RFLP) usando el elemento de inserción IS6110 (RFLP-IS6110) (Cave et al., 1991), siendo hasta ahora el método comúnmente utilizado. Sin embargo, aún cuando es reproducible presenta un bajo poder de discriminación en cepas con bajas copias de IS6110 (Kremer et al., 1999; Cowan et al., 2002; Lee et al., 2002) y requiere de grandes cantidades de DNA y tiempo para realizarlo y analizarlo. La tipificación de los oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping o Espoligotipado) (Kamerbeek et al., 1997; Molhuizen et al., 1998), se basa en detectar la presencia o ausencia de 43 espaciadores en una región del elemento de inserción IS6110 llamada de repetición directa (DR). Sin embargo, aunque es rápida, tiene un menor poder de discriminación con respecto a RFLP-IS6110. Actualmente, la técnica de MIRU-VNTR (Supply et al., 2000; Mazars et al., 2001) basada en secuencias de repetición de número variable (VNTRs) en las unidades de repetición interespaciadas micobacterianas (MIRUs), ha demostrado que es un método confiable y reproducible con un alto nivel de discriminación entre las cepas aún cuando se trate de cepas con genotipo de Beijing (Mazars et al., 2001; Supply et al., 2001; Cowan et al., 2002; Sola et al., 2003; Oelemann et al., 2007; Allix-Béguec et al., 2008). Una ventaja más es que el procedimiento puede automatizarse, haciendo que el análisis de datos sea más rápido y más exacto (Supply et al., 2001; Allix et al., 2004). Por otro lado, se ha desarrollado una estandarización internacional con base en un conjunto de 24 loci de MIRU-VNTR (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>). Este marcador se ha utilizado en estudios poblacionales para estudiar la transmisión de TB, la identificación del linaje de las cepas e identificar infecciones con cepas mixtas (Allix-Béguec et al., 2008; Dickman et al., 2010).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar para el estado de alta prevalencia de tuberculosis la asociación existente entre el perfil sociodemográfico y clínico de pacientes diagnosticados, a partir de la caracterización genética de aislados clínicos, la identificación de genotipos y el perfil de farmacorresistencia.

Objetivos específicos

1. Identificar molecularmente los aislados clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos de los pacientes analizados.
2. Determinar el genotipo de los aislados clínicos utilizando 12 loci de MIRU-VNTR.
3. Determinar el perfil de farmacorresistencia de los aislados clínicos a fármacos de primera línea mediante análisis de sensibilidad farmacológica utilizando método molecular y fluorométrico.

Pregunta general de investigación

¿Qué factores explican la alta prevalencia de tuberculosis en el estado de Baja California, a pesar del acceso de pacientes diagnosticados a tratamiento en los términos que establece la Norma Oficial Mexicana?

Preguntas específicas

1. ¿En qué medida el perfil sociodemográfico y clínico del paciente con tuberculosis influye en el tratamiento que se prescribe al paciente?
2. ¿En qué medida la exposición previa a medicamentos antituberculosos y la falta de aplicación de pruebas para su detección puede condicionar farmacorresistencia en el paciente?
3. ¿Cuál es el acceso a fármacos de segunda línea en pacientes que muestran farmacoresistencia a medicamentos tradicionales, conocidos como de primera línea?

HIPÓTESIS

Los factores que podrían estar explicando la alta prevalencia de tuberculosis en el estado son la existencia de un diagnóstico insuficiente sobre el tipo de cepa que afecta al paciente, perfil de farmacorresistencia, influido por su perfil sociodemográfico y clínico, así como un limitado acceso a medicamento de segunda línea de aplicación a pacientes que presentan farmacorresistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población de estudio y obtención de muestras

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de tipo descriptivo en muestras de aislados clínicos de pacientes diagnosticados con tuberculosis en clínicas de la Secretaría de Salud en Baja California. Las muestras clínicas de los pacientes que fueron referidas al Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California, ubicado en el Hospital General de Tijuana (LETBC), en donde se realizó el análisis bacilosκόpico, el cultivo microbiológico y el análisis de sensibilidad farmacológica. Posteriormente, se tomó una muestra de cada uno de los cultivos microbiológicos que crecieron (aislado clínico), para su análisis molecular en el Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular (LEEM) de la Escuela de Ciencias de la Salud, UABC Ensenada.

De todos los aislados clínicos colectados, se realizó una búsqueda del expediente clínico del paciente correspondiente en la Plataforma única de tuberculosis de la Secretaría de Salud (Anexo 1) para analizar los datos sociodemográficos y clínicos existentes.

Se obtuvo un oficio de colaboración por parte de la Secretaría de Salud, así como la aprobación del comité de bioética del Hospital General de Tijuana. Se mantuvo la confidencialidad y protección de la información obtenida en todos y cada uno de los casos, en cumplimiento del artículo décimo séptimo de los lineamientos generales de protección de datos personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación el 30 de Septiembre del año 2005.

2. Baciloscopía

El examen microscópico directo para la detección de bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) se realizó en el LETBC y los resultados fueron enviados al LEEM. A cada paciente diagnosticado clínicamente con TB se le tomó una muestra de esputo por la mañana por tres días consecutivos. El análisis de baciloscopía se realizó con la técnica de

tinción de Ziehl-Neelsen. La observación microscópica se realizó con microscopio binocular con oculares de 20X y objetivo de inmersión 100X. Los resultados se clasificaron como: Negativo (-): No se observan BAAR (Bacilos Acido Alcohol Resistentes) en 100 campos observados; Positivo (+): Se observan menos de un BAAR por campo en promedio en 100 campos observados; Positivo (++) : Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en promedio en 50 campos observados; Positivo (+++) : Se observan más de 10 BAAR por campo en promedio en 20 campos observados (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2003). Este análisis fue de rutina para todos los pacientes que acudieron a esta clínica.

1. Estudio microbiológico (aislamientos)

Las muestras positivas en la baciloscopía se cultivaron por duplicado en cultivo Löwenstein-Jensen (LJ), incluyendo la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv como control positivo. Las muestras fueron descontaminadas previamente con el método de Petroff (Koneman et al., 1997). Se tomó de 0.5 – 1.0 mL de esputo adicionando NaOH para lograr una concentración del 1%, posteriormente se centrifugó a 3000 x g por 15 min. El sedimento fue reconstituido hasta llegar a 2.5 mL con buffer de fosfato pH 6.8. Posteriormente se inoculó por duplicado en el medio LW. Un tubo de cada medio se cubrió con papel aluminio, lo que permitió reconocer las colonias pigmentadas que crecen en la oscuridad. Se incubaron a 37°C y se realizaron observaciones una vez por semana por 8 semanas, tomando nota del tiempo en que se desarrollaron en el medio LJ (WHO, 2001). Este análisis fue realizado en el LETBC. Cuando se presentó crecimiento bacteriano, se tomó de 200 - 500 mg de masa bacilar, y se colocó en tubos de 1.5 mL herméticamente cerrados y fueron transportados bajo condiciones de seguridad y en red de frío al LEEM, el cual cuenta con las instalaciones de Bioseguridad Nivel III (BSL3).

1. Análisis Molecular

El análisis molecular de los aislados clínicos consistió en cuatro partes: 1) Extracción de DNA, 2) Identificación molecular mediante la amplificación del operón *mce-3* para diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. 3) Determinación del perfil molecular de farmacorresistencia y 4) Determinación de genotipos utilizando 12 loci de MIRUs.

1.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó directamente de cepas aisladas de cultivos microbiológicos, bajo condiciones de BSL3. La extracción de ADN se realizó utilizando 500 mg de la masa bacilar homogenizados con 100 µL sol. de lisis (10mM Tris-HCl [pH 8.3], 2mM MgCl₂, 50 mM KCl). Se incubó 15 min a 95° C, fue centrifugado 10 min a 6000 rpm y transferido el sobrenadante a tubo limpio y etiquetado. Almacenado a -20 °C hasta su análisis (Yugueros Marcos et al., 1999; Yugueros et al., 1999). La calidad y cantidad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 20 min teñidos con *Gelstar*.

1.1 Identificación molecular de especie infectante

Todas las muestras obtenidas de ADN se identificaron mediante la amplificación de una región del operón *mce-3*, el cual permitió diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esto debido a que *M. bovis* presenta una delección que remueve la mayor parte del operón *mce-3*. Cuando la cepa fue *M. tuberculosis* amplificó un producto de 337 pb, mientras que *M. bovis* amplificó un producto de 168 pb (Bakshi et al., 2005). Para lo cual se realizó una PCR multiplex con tres cebadores en un volumen total de 25 µL, consistiendo de 2.5 µl de ADN, 25 pmol de cada primer, 200 mM de cada dNTPs, 1.5 U de *Taq* ADN polimerasa, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ y 0.01% (w/v) gelatina. El perfil de temperatura fue de un ciclo de 94 °C x 5 min, seguido de 30 ciclos, de 94 °C x 1 min, 52.3 °C x 1.5 min, y 72 °C x 1 min y un ciclo final de 72 °C x 5 min. La calidad y cantidad de los productos amplificados se evaluó en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 20 min teñidos con *Gelstar*. Se incluyó en todas las PCRs la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG como controles positivos y como control negativo agua

nanopura grado molecular. Los datos de identificación molecular se compararon con los resultados obtenidos del cultivo microbiológico.

1.2 Perfil molecular de farmacorresistencia

Con el objetivo de determinar el perfil de farmacorresistencia de las cepas aisladas e identificadas molecularmente como *M. tuberculosis* se amplificaron genes de resistencia a fármacos de primera (S, H, R, Z, E) y segunda (O, K) línea (Anexo 2). En el análisis se incluyeron cepas de referencia de *M. tuberculosis*: H37Rv (American Type Culture Collection 27294) y CIBIN/UMF:15:99. La cepa H37Rv es sensible a los cinco fármacos antituberculosos de primera línea, mientras que la CIBIN/UMF:15:99 es resistente a todos estos fármacos.

1.3 Amplificación de genes asociados con resistencia a fármacos

La estandarización de la reacción de PCR de punto final de los nueve genes asociados a la resistencia en a fármacos de primera línea, se realizó bajo las siguientes condiciones: KCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8.0 (4µl), MgCl₂ 25mM (1µ), dNTPs 10 mM (0.6µl), 10µM de cada oligonucleótido (5'-3' y 3'-5'), 1U de enzima *Taq* polimerasa (0.2µl) (Fermentas), 5% de glicerol, 100 ng de ADN cromosomal de cada cepa y agua libre de nucleasas para llevar a volumen final de 20 µl. Para los genes de resistencia a fármacos de segunda línea se realizó un ensayo alelo-específico multiplex (MAS)-PCR diseñado para detectar mutaciones de resistencia en el gen *GyrA* D94G y *rrsA*1401G para ofloxacina y kanamicina, respectivamente. Para el gen *GyrA* la PCR multiplex consistió en 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (5 U/µL), 50–200 ng de ADN genómico, 0.15 mM de cada dNTP, 10 pmol, 30 pmol y 20 pmol de cada oligonucleótido respectivamente (GYRAF, GYRAR1 y GYRAR2) y 3 mM Mg₂Cl. El perfil de temperatura consistió en 1 ciclo a 95 °C por 5 min, 5 ciclos de 95 °C por 15 s, 68 °C por 5 s y 72 °C por 20 s, 5 ciclos of 95 °C por 15 s, 64 °C por 5 s y 72 °C por 20 s, y 25 ciclos de 94°C por 15 s, 62 °C por 5 s y 72 °C por 20 s, seguido de un paso final de elongación a 72 °C por 5 min. Para la amplificación del gen *rrs*, fueron utilizados 0.2 mM de cada dNTPs, 20 pmol, 5pmol y 40 pmol de cada oligonucleótido respectivamente (RRSF, RRSR1, RRSR) y 1.5 mM Mg₂Cl. El perfil de temperatura fue similar al *GyrA* con excepción que el oligonucleótido de acoplamiento se

realizó a 66 °C para los primeros 5 ciclos, a 64 °C para los próximos 5 ciclos y a 62°C para los restantes 25 ciclos. La amplificación de ambos productos de 427 y 260 pb para *GyrAy* 481 and 353 bp para *rrs* indicaron la presencia de secuencias de tipo silvestre. La amplificación de solo un fragmento indica la mutación que le da resistencia, de 427 pb para *GyrAy* 481 pb para *rrs* (Evans & Segal, 2010). Los oligonucleótidos utilizados para todos los genes se muestran en el (Anexo 2).

1.4 Secuenciación genes de resistencia

Los productos amplificados de cada gen se purificaron utilizando ExoSap de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para comprobar la presencia de los productos purificados y conocer su concentración se realizó una nueva electroforesis con un marcador de peso molecular para cuantificación (MassRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use, 80-1031 bp, Fermentas). Estas reacciones se enviaron a SeqXcel Inc. en San Diego, California, EUA, para ser amplificadas utilizando nucleótidos terminadores de secuencia (BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencingKit, AppliedBiosystems) y secuenciadas en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (AutomatedCapillary DNA sequencer, AppliedBiosystems). Se correlacionó con las secuencia de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv de acuerdo al gen analizado con los siguientes números de identificación del Gen Bank: *rpoB* Gene ID: 888164, *katG* Gene ID: 885638, *inhA* Gene ID: 886523, *pncA* Gene ID: 888260, *rpsL* Gene ID: 888259, Gene ID: 2700429, *embB* Gene ID: 886126.

5. Análisis de sensibilidad farmacológica por cultivo microbiológico

Este análisis se realizó por personal capacitado del LETBC dentro de las mismas instalaciones. La sensibilidad a la S, H, R, Z y E se estimó con el método fluométrico BACTEC MGIT 960 SIRE Kit® (Becton-Dickinson, Sparks, USA). Así, para cada muestra se utilizaron cinco tubos MGIT 960: un control de crecimiento y un tubo por antibiótico. Los tubos fueron suplementados con 0,8 ml del preparado OADC. A continuación se añadieron 100 µL de cada antibiótico en su correspondiente tubo para conseguir unas concentraciones finales de 1 mg/L de S, 0,1 mg/L de H, 1 mg/L de R y 5 mg/L de E. Por último se inoculó la cepa: 0.5 mL de un tubo de MGIT960 48 horas después de haber dado

un resultado positivo en cada uno de los tubos con antibiótico y una dilución 1:100 de ese mismo inóculo en el control de crecimiento. En el caso de la Z se utilizaron dos tubos por muestra: un control de crecimiento y un tubo con antibiótico. Ambos se suplementaron con 0.8 mL de medio enriquecido y al segundo se le añadieron 100 μ L de antibiótico para obtener una concentración final de 100 mg/l de Z. El inóculo de la cepa fue el mismo que en los otros cuatro antibióticos en el tubo con Z y una dilución 1:10 en el control de crecimiento. La lectura se realizó en los siguientes 4 a 14 días (Ardito et al., 2001).

6. Genotipado con MIRU-VNTR

Con el objetivo de caracterizar y relacionar genéticamente los aislados clínicos, estas fueron genotipadas utilizando un set de 12 loci de microsatélites (MIRU-VNTR) polimórficos (Miru4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40) diseñados por Supply et. al.(2000; 2001; 2006). Los oligonucleótidos de inicio fueron marcados con un compuesto fluorescente y se amplificaron mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en reacciones de 50 μ L preparadas de la siguiente manera: 5 ng de ADN, 0.2 μ l de ADN polimerasa (1 U/ μ L), 0.2 mM de cada dNTPs, 5 μ L de Buffer 10X PCR, 0.4 M de oligonucleótido, 3.0, 2.0, 2.5, y 1.5 mM MgCl₂ para las mezclas A a la C, respectivamente Supply et. al.(2000; 2001; 2006). Los oligonucleótidos utilizados en la PCR correspondieron a las regiones flanqueantes de los loci polimórficos MIRU-VNTR identificados en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv(Supply et al., 2000).

El perfil de temperatura para las cuatro reacciones multiplex serán idénticas, con un paso de desnaturalización de 15 min a 95°C, seguido por 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C y 1 min 30 s a 72°C y una extensión de 10 min a 72°C(Supply et al., 2006). Se incluyó como control positivo a *M. tuberculosis* H37Rv y como control negativo se utilizó agua nanopura grado molecular. Para probar la reproducibilidad del método se seleccionó al azar un 5% de las muestras y se amplificaron en un experimento por separado. La concentración de los fragmentos amplificados fueron evaluados en un gel de agarosa 2%, teñidos con Gelstar[®] (CambrexBioScienceRockland, Inc.) y visualizados con luz UV con un marcador de peso molecular para cuantificación (MassRuler[™] Low Range ADN Ladder, ready-to-use, 80-1031 bp, Fermentas). Se prepararon diluciones a una

concentración de 2 ng/ μ L y se enviaron al laboratorio comercial SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com>), en la ciudad de San Diego, California, E.U. donde fueron genotipadas mediante un secuenciador automático de ADN ABI PRISM[®] 3130xl GeneticAnalyzer.

6.1 Análisis de datos de genotipos

Este análisis se realizó con el objetivo de determinar las características genéticas, la estructura poblacional, el flujo genético y la similitud entre las cepas de *M. tuberculosis* colectadas. Estos resultados se analizaron en conjunto con los datos epidemiológicos de los pacientes, para evaluar la epidemiología molecular de *M. tuberculosis*. Los cromatogramas obtenidos para cada locus amplificado de MIRU-VNTR fueron visualizados utilizando el programa el Peak ScannerTM Software 1.0 (AppliedBiosystems[®]) y el GeneMarker Software 1.71 (Softgenetics[®]). El tamaño de los fragmentos de PCR y asignación de los diversos alelos de MIRU-VNTR se llevó a cabo usando GeneScan y los paquetes informáticos personalizados de genotipado (PE AppliedBiosystem). Se utilizaron tablas para asignar el tamaño de los alelos de MIRU-VNTR disponibles en <http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>. Los resultados fueron expresados en un código numérico representando el número de MIRU-VNTRs en cada uno de los 12 loci genómicos (Supply et al., 2000; Supply et al., 2001; Allix et al., 2004). Se utilizó el algoritmo BURST (<http://eburst.mlst.net/>) para describir la relación entre los genotipos de MIRU-VNTR (Evans et al., 2009; Jafarian et al., 2010).

7. Estudio epidemiológico

Para cada uno de los pacientes se obtuvo información de variables sociodemográficas y clínicas contenidas en la Plataforma única de Tuberculosis de la Secretaria de Salud, la cual se alimenta del estudio epidemiológico de tuberculosis (Anexo 1). Las variables moleculares se obtuvieron a partir del análisis genético donde se determinó el genotipo y la sensibilidad a fármacos antituberculosos de primera y segunda línea. Se construyó una base de datos en Excel de Microsoft ©, la cual constó de 61 casos y 16 variables. Posteriormente se exportó al programa estadístico Stat-Soft ©, y Stata -v12 ©, para su análisis.

a) Variables sociodemográficas

- Edad
- Sexo
- Lugar de nacimiento
- Lugar de residencia
- Ocupación
- Escolaridad

b) Variables clínicas

- Baciloscopia y cultivo microbiológico
- Tipos de caso de ingreso y egreso al tratamiento de tuberculosis (Tabla 7 y 8)
- Esquema y tiempo de tratamiento de tuberculosis (Tabla 3)
- Enfermedades asociadas
- Perfil farmacorresistencia (análisis de sensibilidad farmacológica)

c) Variables moleculares

- Genotipo (12 loci de MIRU-VNTR)
- Perfil farmacorresistencia molecular

Tabla 1. Clasificación del tipo de ingreso al tratamiento de tuberculosis de acuerdo a la NOM-006 SSA2-1993.

Tipo de Ingreso	Descripción
Casos nuevos	Pacientes que nunca han recibido tratamiento antituberculoso
Recaídas	Paciente con presencia de signos o síntomas con reaparición de bacilos en la expectoración, o en otros especímenes, después de haber egresado del tratamiento por curación.
Reingresos	Es el enfermo de tuberculosis que reinicia el tratamiento después de haberlo abandonado.
Referidos	Es el paciente que por causa justificada se recibe para continuar su tratamiento.

Tabla 2. Clasificación del tipo de egreso al tratamiento de tuberculosis de acuerdo a la NOM-006-SSA2-1993.

Tipo de Egreso	Descripción
Curados	Caso de tuberculosis en el que desaparecen los signos clínicos y tiene baciloscopía negativa en los dos últimos meses o cultivo negativo al final del tratamiento.
Abandono	Interrupción del tratamiento durante 30 días o más.
Defunción	Cesación de las funciones vitales iniciadas directamente por esta enfermedad.
Fracaso de tratamiento	Persistencia de bacilos en la expectoración, o en otros especímenes al término de tratamiento confirmada por cultivo, o a quien después de un periodo de negativización, tiene baciloscopía positiva confirmada por cultivo.
Término tratamiento	Aquel que ha completado el esquema de tratamiento, han desaparecido los signos clínicos y no se realizó baciloscopía o cultivo al finalizar el tratamiento.
Traslado	Es aquel que notifica a la unidad de salud cambio de residencia durante el periodo en que recibe tratamiento y solicita hoja de referencia para continuar manejo en otro municipio, estado o país.
Continua tratamiento	El que continúa recibiendo tratamiento después de seis meses de haberlo iniciado.

Tabla 3. Clasificación de esquema de tratamiento de tuberculosis de acuerdo a la NOM-006-SSA2-1993.

Esquema de tratamiento	Descripción
Primario acortado	Tratamiento que comprende la administración de cuatro fármacos de primera línea en 60 dosis durante la fase intensiva y dos fármacos en 45 dosis durante la fase de sostén (seis meses) 2HRZE/4H3R3
Retratamiento primario	Recaída, fracaso o abandono al tratamiento primario acortado, (ocho meses) 2HRZES/1HRZE/5H3R3E3
Retratamiento estandarizado	Fracaso al retratamiento primario, (18 meses) 3Km ó AmPtoEZCfx /15PtoEZCfx ó 3CmEtoEZOfx/15EtoEZOfx
Tratamiento individualizado	Si fracasa al retratamiento estandarizado el personal especializado del Comité Estatal de Farmacorresistencia (COEFAR) indicará el tratamiento ideal para el paciente con base en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a drogas de primera y segunda línea. (24 meses después de negatividad del cultivo).

RESULTADOS

1. Población de estudio y aislados clínicos

Se colectaron un total de 61 muestras de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El mayor número de muestras (47.5%, 29) corresponden a pacientes originarios de Baja California, el 46.0% (28) proviene de diferentes estados de la República Mexicana y el 6.5% (4) no especifica el lugar de nacimiento.

2. Baciloscopia

A las 61 muestras clínicas se les realizó la prueba de baciloscopia de los cuales el 49.2% (30) presentó baciloscopia positiva +++, 9.8% (6) baciloscopia positiva ++, 24.6% (15) baciloscopia + y 16.4 % (10) baciloscopia negativa.

3. Identificación molecular de especie infectante

De los 61 extractos de DNA obtenidos a partir de los aislados clínicos, el 6.6% (4) fue identificado molecularmente como *M. bovis* y el 93.4 % (57) como *M. tuberculosis* (Fig. 1).

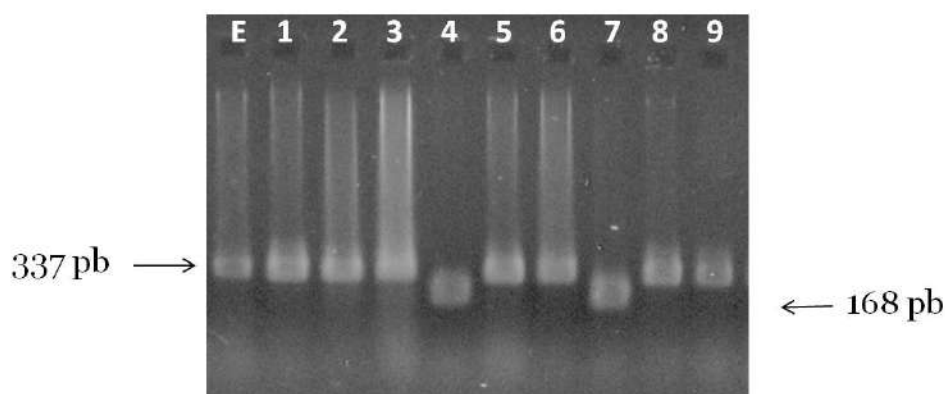


Figura 1. Electroforesis de la PCR multiplex para la identificación de *M. bovis* (168 pb) y *M. tuberculosis* (337 pb). E = escalera, 1 – 3, 5,6,8 y 9 son aislados clínicos identificados como *M. tuberculosis*; 4 y 7 aislados clínicos identificados como *M. bovis*.

4. Perfil de farmacorresistencia molecular

De los 61 aislados clínicos solo el 96.7% (59) amplificó el gen de resistencia correspondiente a uno o más de los cinco fármacos de primera línea y dos de segunda línea analizados en este estudio. El 3.3% (2) restante no amplificó ninguno de los genes, por lo que se les clasifica como sensibles a todos los fármacos probados en este estudio.

De los 59 aislados clínicos que amplificaron algún gen de resistencia, se distribuyeron en 28 tipos de perfiles de farmacorresistencia con base en la combinación de los diferentes fármacos a los que resultaron ser resistentes (Isoniazida, H; Pirazinamida, Z, Rifampicina, R; Estreptomicina, S, Etambutol, E; Ofloxacina, O y Kanamicina, K; Tabla 4). El perfil que agrupó el mayor número de aislados fue el FRM26 (20.3%, 12), seguido del FRM22 (11.9%, 7) y el FRM27 (10.2%, 6). El resto de los perfiles estuvieron representados en porcentajes muy bajos (4.9%, 3.3% y 1.6%) de los aislados clínicos.

Seis aislados clínicos presentaron un perfil monorresistente (FMR1 – FMR4) a H, R y S en un 1.6% cada uno, mientras que el 4.9% fue para O. Mientras que la resistencia a dos fármacos (FMR5 – FMR11) fue detectada en 10 aislados clínicos, en donde se observó una resistencia a H+R (1.7%), H+Z (1.7%), H+O (3.4%), H+O (3.4%), H+K (1.7%), S+O (3.4%) y O+K (1.76%). La mayor parte de los aislados (72.9%, 43) presentaron perfiles de farmacorresistencia (FRM12 – FRM28) correspondientes a la combinación de 3 o más fármacos.

El perfil FRM25, con el mayor número de aislados, presentó resistencia a los cinco fármacos de primera línea y a uno de segunda línea (H+Z+R+S+ E+K). El segundo perfil, FRM22, más representativo presentó resistencia a los cinco fármacos de primera línea (H+Z+R+S+ E). El tercer perfil, FRM26, con mayor porcentaje de aislados, fue resistente a los cinco y a los dos fármacos de primera y segunda línea (H+Z+R+S+E+K+O), clasificándose como Ultrarresistentes (XDR) de acuerdo a la OMS. La MDR (H+R) solo se registró en el 1.7% (1) de los aislados.

En general, la resistencia más común en los aislados clínicos fue para H, S y R (79.7%, 72.9 y 71.2, respectivamente), mientras que la menos común fue para K y O (55.9.8% y 50.8%, respectivamente; Tabla 4)

Tabla 4. Perfil de farmacorresistencia molecular de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. (Isoniazida, H; Pirazinamida, Z; Rifampicina, R; Estreptomicina, S; Etambutol, E; Ofloxacina, O y Kanamicina, K)

TIPO	PERFIL	n	%
<i>Mono resistencia</i>		6	10.2
FRM1	H	1	1.7
FRM2	R	1	1.7
FRM3	S	1	1.7
FRM4	O	3	5.1
<i>Resistencia a 2 fármacos</i>		10	16.9
FRM5	HR	1	1.7
FRM6	HZ	1	1.7
FRM7	HO	4	6.8
FRM8	HK	1	1.7
FRM9	SO	2	3.4
FRM10	OK	1	1.7
<i>Resistencia a 3 ó más fármacos</i>		43	72.9
FRM11	HOK	2	3.4
FRM12	RSO	1	1.7
FRM13	SOK	1	1.7
FRM14	ZOK	1	1.7
FRM15	HZSEK	1	1.7
FRM16	RSEK	1	1.7
FRM17	HSEK	1	1.7
FRM18	HZRS	1	1.7
FRM19	ZRSO	1	1.7
FRM20	HZSOK	1	1.7
FRM21	HESOK	1	1.7
FRM22	HZRSE	7	11.9
FRM23	HZRSK	2	3.4
FRM24	HZREK	1	1.7
FRM25	HRSEK	1	1.7
FRM26	HZRSEK	12	20.3
*FRM27	HZRSEOK	6	10.2
FRM28	HRSEOK	2	3.4
Total		59	100.0

*XDR, de acuerdo a la OMS.

5. Análisis de genotipo MIRU-VNTR

De los 61 aislados clínicos solo el 83.6% (51) amplificaron los 12 loci de MIRU-VNTR, el resto de los aislados no amplificó tres o más de los loci, por lo que se eliminaron de la base de datos.

El análisis de los genotipos MIRU-VNTR mas el perfil de farmacorresistencia de cada uno de los aislados, utilizando la base de datos de referencia *MIRU-VNTRplus* (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>), identificó 10 linajes diferentes. El menor porcentaje (2%) correspondió a los linajes de Europa-Asia-India (EIA) y X; el linaje Beijing estuvo representado en el 3.9%, así como Bovis, Camerún, y Ghana. El 7.8% correspondió al Linaje de América Latina (LAM), 9.8% Uganda, 13.7% Sensible (S), 15.7% perteneció al linaje Harlem y el 33% correspondió a un nuevo linaje (N) (Tabla 5).

Tabla 5. Relación del número (n) y porcentaje (%) de aislados clínicos correspondientes a los linajes de genotipo con base en la información de MIRU-VNTR y farmacorresistencia.

Linaje	n	%
EAI	1	2.0
X	1	2.0
Beijing	2	3.9
Bovis	2	3.9
Camerún	2	3.9
Ghana	2	3.9
LAM	4	7.8
Uganda	5	9.8
Sensible	7	13.7
Haarlem	8	15.7
Nuevo	17	33.3
Total	51	100.0

Utilizando la misma información anterior, se construyó un dendrograma (Fig. 2 y 3) a partir del algoritmo del vecino más cercano (Neighbour-Joining; NJ) con base en la distancia categórica utilizando la herramienta de (<http://www.miru-vnrplus.org/MIRU/index.faces>). En ambos dendrogramas, se observan que los 59 aislados forman cuatro grandes grupos, sin embargo, la composición es diferente.

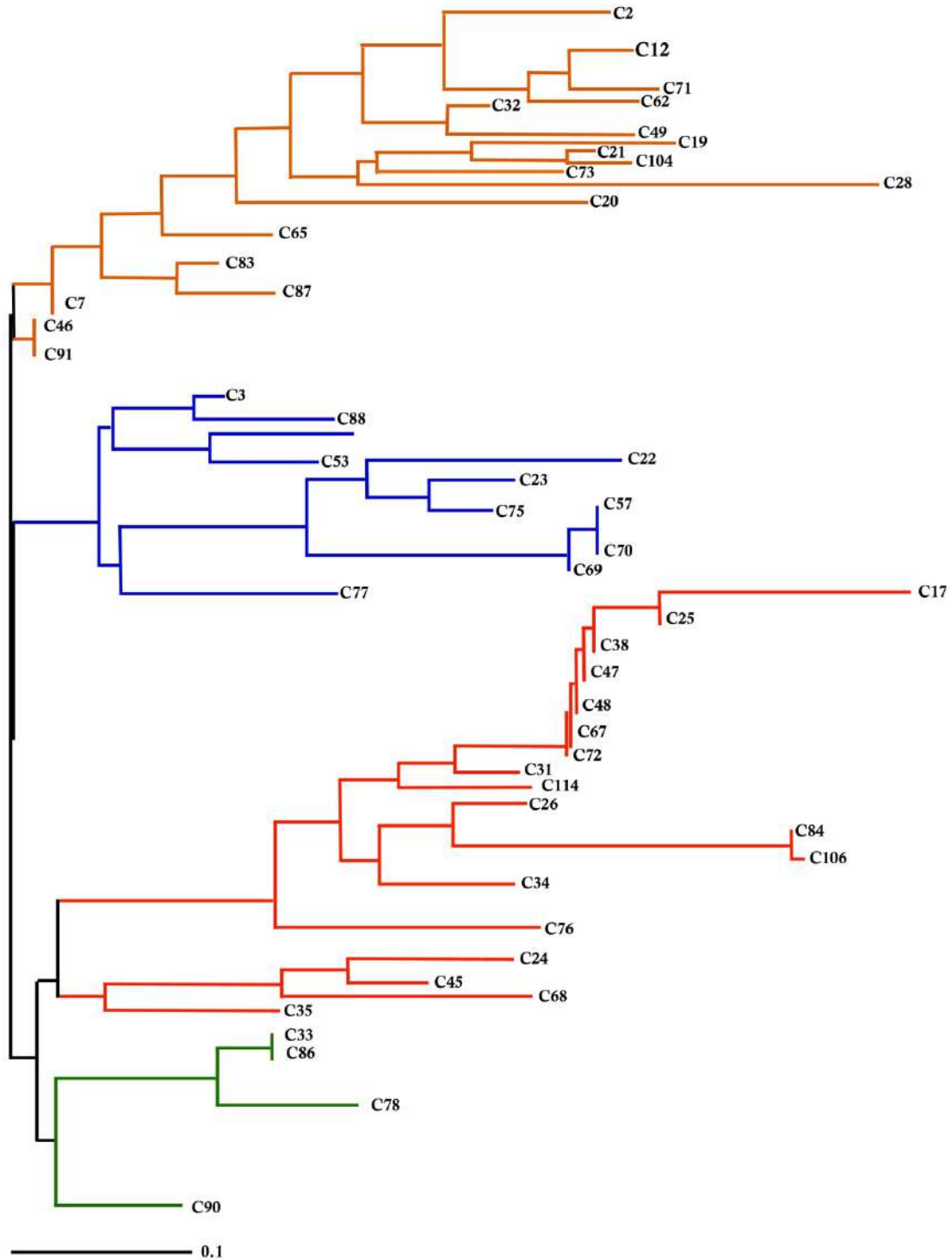


Figura 2. Relación genética entre aislados clínicos de *M. tuberculosis* de acuerdo al genotipo con base en 12 loci de MIRU-VNTR. La construcción del fenograma se obtuvo a partir del algoritmo del vecino más cercano (Neighbour-Joining; NJ) con base en la distancia categórica implementado en la herramienta de (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>). La longitud de las ramas refleja la distancia genética.

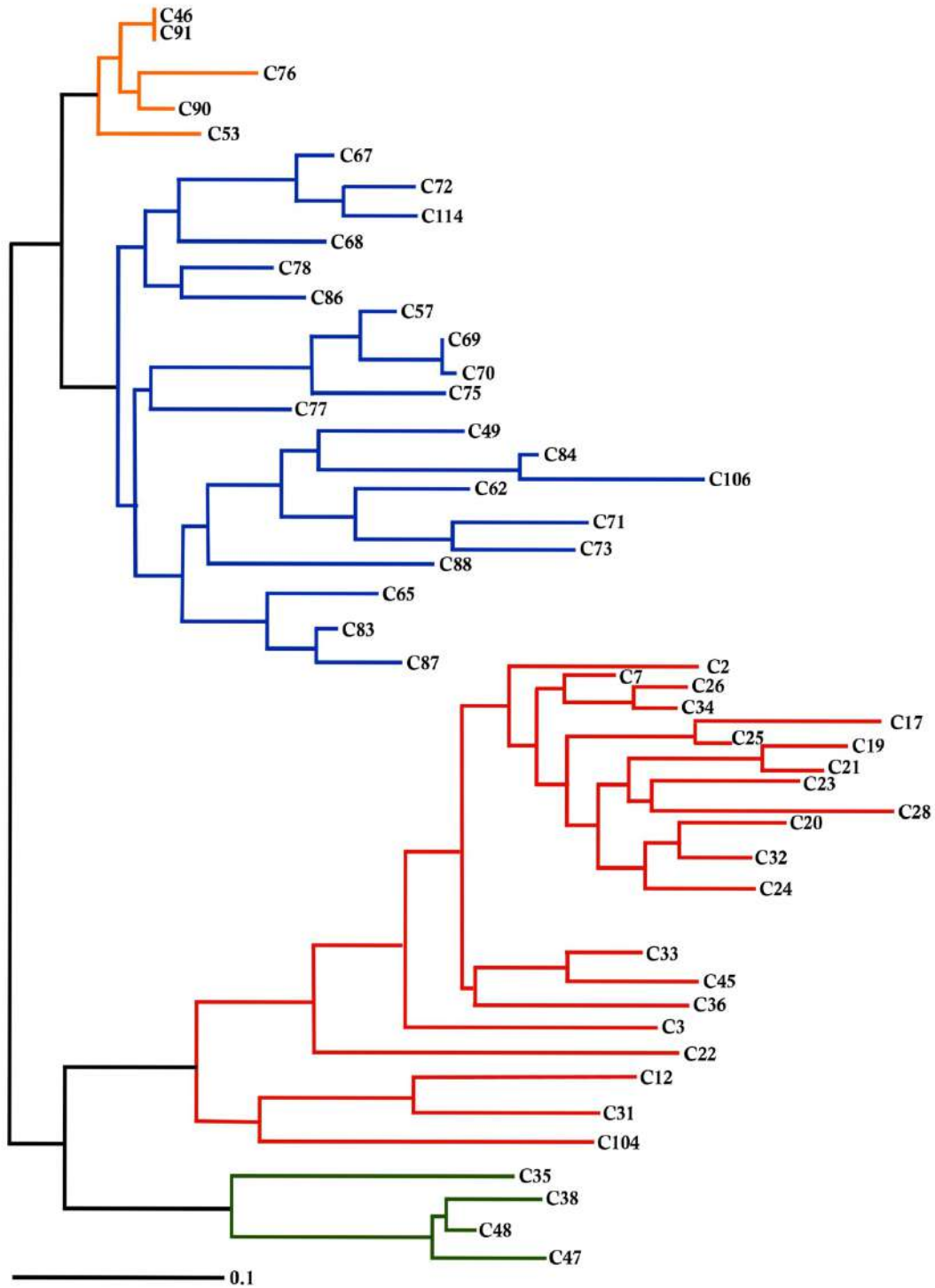


Figura 3. Relación genética entre aislados clínicos de *M. tuberculosis* de acuerdo al genotipo con base en 12 loci de MIRU-VNTR y perfil de farmacorresistencia (H, S, E, R, Z). La construcción del dendrograma se obtuvo a partir del algoritmo del vecino más cercano (Neighbour-Joining; NJ) con base en la distancia categórica implementado en la herramienta de (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>). La longitud de las ramas refleja la distancia genética.

6. Análisis epidemiológico

El análisis de las variables sociodemográficas, clínicas y moleculares generó los siguientes resultados.

6.1 Variables sociodemográficas

a) Edad y Sexo

La edad de los 61 pacientes analizados presentó una distribución normal, con una media de 37 años, un mínimo de 13 años y un máximo de 70 años (Fig.4). El sexo masculino representó el 67% y el sexo femenino el 33% del total de la muestra.

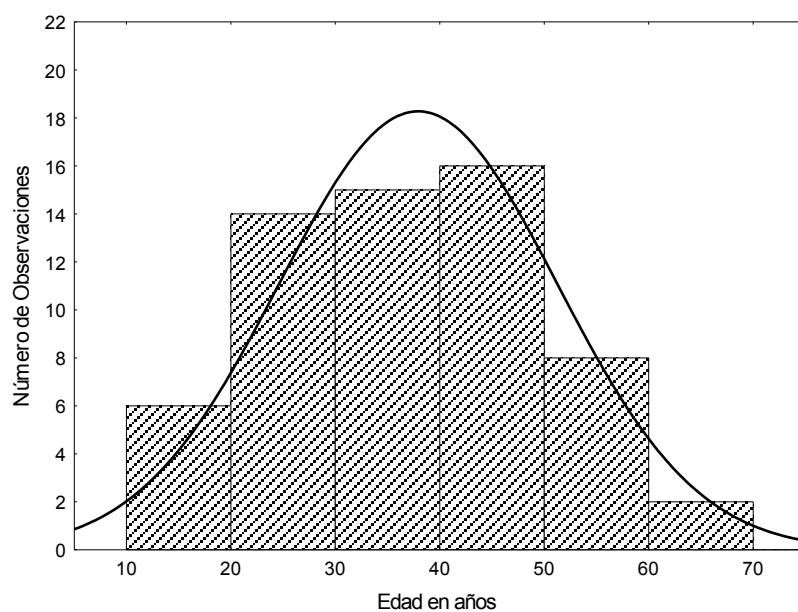


Figura 4. Distribución normal de la edad en años de 61 pacientes analizados.

b) Lugar de nacimiento y de residencia

De los 61 pacientes analizados, solo el 47.5% (29) es originario de Baja California, 46.0% (28) proviene de diferentes estados de la República Mexicana y el 6.5% (4) no especifica el lugar de nacimiento (Tabla 6). Con respecto a los foráneos, el mayor número de aislados correspondió a pacientes originarios del estado de Durango 6.5 % (4), seguido de Guanajuato, Jalisco y Veracruz con 4.9% (3) cada uno.

Tabla 6. Lugar de nacimiento de pacientes analizados en este estudio.

Lugar de nacimiento	Número de pacientes
Baja California	29
Baja California Sur	1
Chiapas	2
Chihuahua	1
Distrito federal	2
Durango	4
Guanajuato	3
Guerrero	1
Jalisco	3
México	2
Michoacán	1
Nayarit	1
Nuevo León	1
Puebla	1
Sinaloa	2
Veracruz	3
No especificado	4
Total	61

En cuanto al lugar de residencia actual, el 97% (59) reportó vivir en Baja California, el 1.5% (1) en Baja California Sur y 1.5% (1) reside actualmente en Sonora. En cuanto a los que residen en Baja California, la distribución por municipio es la siguiente, el 76.3% (45) reside en Tijuana, 16.9% (10) en Ensenada, 3.4% (2) en Mexicali, 1.7% (1) en Rosarito y 1.7% (1) en Tecate. La persona de Baja California Sur es del municipio Loreto y el de Sonora del municipio Álamos.

El tiempo de residencia en Baja California (n = 59) se registró de la siguiente manera: menos de 1 año (23.7%, 14), entre uno y cinco años (20.3%, 12), más de 5 años (50.8%, 30) y sin especificar (5.1%, 3). La persona de Baja California Sur reporta que toda su vida ha residido en Loreto, y solo se trasladó a Baja California para recibir el tratamiento de tuberculosis. La persona de Sonora no reportó tiempo residencia en dicho lugar.

c) Ocupación y escolaridad

La ocupación en los 61 pacientes analizados se reportó de la siguiente manera: 42.6% (26) asalariados, 19.7% (12) amas de casa, 32.8% (20) desempleados y 4.9% (3) no se especificó. En cuanto la escolaridad, 36% (22) tiene nivel de escolaridad primaria, 27.9% (17) secundaria, 16.4% (10) preparatoria, 11.5% (7) profesional, 4.9% (3) sin escolaridad y 3.3% (2) no especificado.

6.2 Variables clínicas

a) Baciloscopía y cultivo microbiológico

El análisis baciloscópicode cada una de las muestras clínicas de 61 pacientes varió de la siguiente manera: 49.2% (30) baciloscopía positiva +++, 9.8% (6) baciloscopía positiva ++ y 24.6% (15) baciloscopía +, 16.4 % mostraron baciloscopía negativa. A los que presentaron baciloscopía negativa (n = 10), a cinco de ellos se les realizó el cultivo microbiológico (Lowensten-Jensen), resultando el 100% con cultivo positivo. Los 5 restantes fueron ingresados al tratamiento de acuerdo al diagnóstico histopatológico (2), radiológico (2) y clínico (1).

b) Tipos de caso de ingreso y egreso a tratamiento

Una vez diagnosticado al paciente se le clasificó de acuerdo al tipo de caso al momento de ingreso al tratamiento, ello con objeto de poder administrarle el tratamiento más adecuado para su curación. Al finalizar el tratamiento, el paciente se clasificó de acuerdo al tipo de egreso. Para ambos casos, ingreso y egreso, la clasificación es de acuerdo al criterio establecido en la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud (Tabla 1 y Tabla 2)

Del total de pacientes (n = 61) que ingresaron al tratamiento, el 63.9% (39) fueron nuevos casos, 19.7% (12) recaídas, 11.5% (7) reingresos y 4.9% (3) referidos. Tomando en cuanto el sexo, el mayor porcentaje fueron hombres tanto para casos nuevos, recaídas y reingresos (66.7%, 83.3% y 71.4%, respectivamente). Mientras que de los referidos el 100% fueron mujeres (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación del tipo de ingreso al tratamiento de acuerdo al sexo

Tipo Ingreso	Total		Sexo			
			Mujer		Hombre	
	n	%	n	%	n	%
Casos nuevos	39	63.9	13	33.3	26	66.7
Recaídas	12	19.7	2	16.7	10	83.3
Reingresos	7	11.5	2	28.6	5	71.4
Referidos	3	4.9	3	100.0	0	0.0
Total	61	100	20		41	

Con respecto a los que egresaron del tratamiento, el 49.2% (30) se curaron, 16.4% (10) abandono, 9.8% (6) defunciones, 14.8% (9) fracaso, 6.6% (4) término tratamiento, 1.6% (1) traslado y 1.6% (1) continua tratamiento. En cuanto al análisis combinando egreso del tratamiento y sexo, resultó que los que presentaron el mayor porcentaje tanto de curación, abandono y defunción (60%, 100% y 83.3%, respectivamente) fueron hombres. Mientras que para los de término de tratamiento fue homogénea la distribución, 50% cada uno de los dos sexos. En cuanto al traslado, el 100% fue mujer y continua el tratamiento el 100% es hombre (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación del tipo de egreso al tratamiento de acuerdo al sexo.

Tipo Egreso	Total		Sexo			
			Mujer		Hombre	
	n	%	n	%	n	%
Curado	30	49.2	12	40.0	18	60.0
Abandono	10	16.4	0	0.0	10	100.0
Fracaso	9	14.8	4	44.4	5	55.6
Defunción	6	9.8	1	16.7	5	83.3
Término	4	6.6	2	50.0	2	50.0
Traslado	1	1.6	1	100.0	0	0.0
Continua tratamiento	1	1.6	0	0.0	1	100.0
Total	61	100.0	20		41	

El resultado del análisis del cruce de frecuencias de los tipos de caso de ingreso, egreso al tratamiento y sexo (Tabla 8), mostró los siguientes valores. Del total de personas que se curaron (n = 30), el 73.3% (22) ingresaron como casos nuevos, siendo ocho mujeres y 14 hombres, el 13.3% (4) ingresaron como recaída, de los cuales fueron dos mujeres y dos hombres; 10% (3) fueron reingreso, siendo una mujer y dos hombres y el 3.3% (1) fue clasificado como referido al momento del ingreso al tratamiento, siendo mujer.

En cuanto al abandono, 30% (3) ingresaron como recaída, 50% (5) casos nuevos y 20% (2) reingresos, todos estos eran hombres. De los que fracasaron 77.8% (siete) eran caso nuevos y 22.2% (dos) eran referidos. De las defunciones cuatro hombres (66.7%) eran de recaída, un hombre (16.6%) de reingreso y una mujer (16.6%) como caso nuevo.

c) Esquema y tiempo de tratamiento

De los 61 pacientes estudiados el 77% (47) inició tratamiento primario acertado, el 14.8% (9) fueron tratados con retratamiento primario y el 6.6% (4) se les instauró tratamiento individualizado, solo un caso (1.6%) no se ingreso a tratamiento; reportándose egreso por defunción.

En lo que se refiere a tiempo de tratamiento, los 61 pacientes estudiados iniciaron tratamiento, de los cuales el 70.5% (43) reportó 6 meses de tratamiento, el 23% (14) fueron tratados por más de 7 meses, el 4.9% (3) fueron tratados por menos de seis meses, y el 1.6% (1) no especifica duración del tratamiento. La mínima duración de tratamiento fue de cero meses y la máxima duración de tratamiento registrada fue de 24 meses.

De los 43 pacientes que reportaron recibir seis meses de tratamiento se observó que el 53.5% (23) egresó como curado, 18.6% (8) abandonaron el tratamiento, 14% (6) fueron clasificados como fracaso, 11.6% (5) egresaron por defunción y el 2.3% (1) restante fue clasificado como término de tratamiento.

De los 30 pacientes que se reportaron como curados durante este estudio se observó que el 76.7% recibieron tratamiento al menos durante seis meses, el 16.7% recibió tratamiento durante un periodo comprendido de 7 a 12 meses, y el 6.6% recibió tratamiento durante un periodo mayor a un año.

d) Enfermedades asociadas

La mitad de los pacientes (52.5%) no reportaron algún tipo de enfermedad asociada, mientras que para diabetes y alcoholismo reportaron el mismo porcentaje (13.1%). Respecto al VIH/SIDA se reportó en el 8.2% de los pacientes, 4.9% usuarios de drogas, y el 8.2% no se reporto el dato.

Tabla 9. Relación de enfermedades asociados que se reportaron en el paciente al momento del ingreso al tratamiento de tuberculosis.

Enfermedad asociada	n	%
Ninguna	32	52.5
Diabetes	8	13.1
Alcoholismo	8	13.1
VIH/SIDA	5	8.2
Drogas	3	4.9
Otras	5	8.2
Total	61	100.0

Enfermedad asociada vs Tipo de egreso

El análisis de enfermedades asociadas a la TB con respecto al tipo de egreso mostró que de los 32 pacientes que no presentaron ninguna enfermedad asociada, el 56.3% (18) se curó, el 15.6% (5) fracaso y el 6.3% (2) abandonaron el tratamiento. En contraste, en los usuarios de drogas, el 66.7% (3) abandonaron el tratamiento y el 33.% (1) fracasaron.

Los pacientes con diabetes mostraron el mismo comportamiento en cuanto a curación, abandono, fracaso y defunción, mostrando un 25% (2) en cada caso. En contraste, el 62.5% de los pacientes con alcoholismo se curó, el 25% murió y el 12.5% abandonó el tratamiento. De los cinco pacientes registrados con VIH/SIDA, el 60% (3) se curó mientras que el 40% (2) abandonó el tratamiento. En cuanto a los pacientes registrados como Otras enfermedades, el 40% (2) se curó, correspondiendo a tabaquismo y esquizofrenia; mientras que abandono, fracaso y defunción presentó el mismo porcentaje (20%, 2) cada uno, correspondiendo a desnutrición, lupus, y hepatitis C, respectivamente.

Tabla 10. Relación de enfermedades asociadas con respecto al tipo de egreso al tratamiento de tuberculosis.

Tipo de Egreso	Enfermedades asociadas												Total	
	Ninguna		Drogas		Diabetes		Alcoholismo		VIH/SIDA		Otras			
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Curado	18	56.3	0	0.0	2	25.0	5	62.5	3	60.0	2	40.0	30	49.2
Abandono	2	6.3	2	66.7	2	25.0	1	12.5	2	40.0	1	20.0	10	16.4
Fracaso	5	15.6	1	33.3	2	25.0	0	0.0	0	0.0	1	20.0	9	14.8
Defunción	1	3.1	0	0.0	2	25.0	2	25.0	0	0.0	1	20.0	6	9.8
Término	4	12.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	6.6
Continua	1	3.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.6
Traslado	1	3.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.6
Total	32	100.0	3	100.0	8	100.0	8	100.0	5	100.0	5	100.0	61	100.0

Tipo de Ingreso, Egreso vs Sexo

El análisis de regresión logística detectó diferencias significativas entre el tipo de egreso vs sexo ($P = 0.009$), mientras que tipo de egreso vs tipo de ingreso, no fue significativa ($P > 0.05$).

Variables sociodemográficas vs Variables clínicas

Se realizó un análisis de agrupamiento para detectar asociación entre las variables sociodemográficas y clínicas. Se identificaron dos grupos: el primero se asocia a una distancia de 0.8 unidades con respecto de 1-r de Pearson con las variables edad, sexo y ocupación; el segundo grupo, se une a 0.45 unidades de distancia con las variables resultado de baciloscopía, y egreso del tratamiento antituberculoso (Fig. 5).

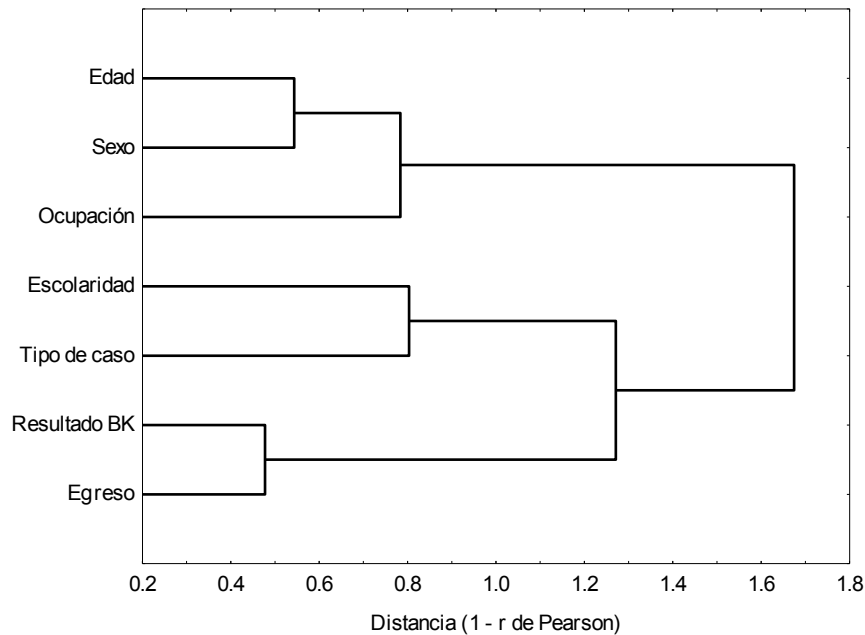


Figura 5. Dendrograma de la relación entre variables sociodemográficas y clínicas.

Variables clínicas vs Sexo

La asociación entre las variables clínicas con el sexo, reveló que el tipo de caso y esquema de tratamiento se relacionan a una distancia de 0.62; el tiempo de tratamiento y el egreso se relacionan a una distancia de 0.72 y estas cuatro variables se asocian a una distancia de 0.88 con el primer grupo descrito; en cuanto a las variables sexo y enfermedades asociadas se observó que se relacionaron a una distancia de 0.75. Todas las variables consideradas en este dendrograma se unen a una distancia de 1.49, pero se distinguen dos grupos, el primario donde se relaciona sexo y enfermedades asociadas y el segundo grupo relaciona tiempo de tratamiento/egreso y tipo de caso y esquema de tratamiento (Figura 6).

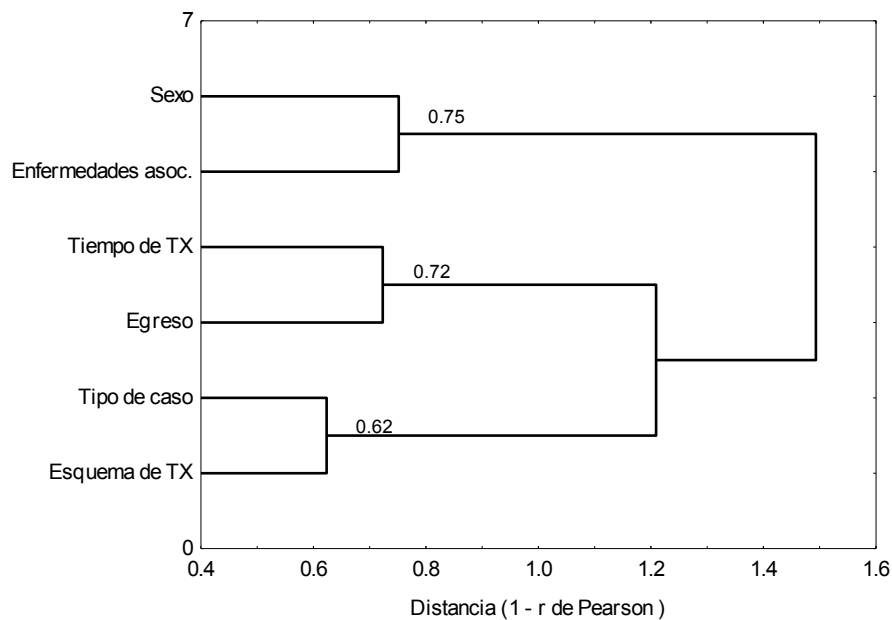


Figura 6. Asociación de variables clínicas con el sexo

6.3 Variables moleculares vs variables clínicas y sociodemográficas

Con respecto a las variables moleculares se utilizaron los 11 genotipos (linajes) obtenidos con la combinación de MIRU-Farmacorresistencia y seis genotipos obtenidos solo con la información de MIRU (Tabla 5, Fig. 2 y 3).

Grupo de genotipo vs Tipo egreso

Para este análisis solo se consideraron aislados clínicos que reportaron tipo de egreso curado, fracaso y defunción (40). El resto de los aislados (11) se eliminaron debido a que las características moleculares del aislado de *M. tuberculosis* no tiene ninguna relación con el tipo de egreso de abandono, término de tratamiento, continua en tratamiento y traslado.

En los Grupos 1, 2 y 3 el mayor porcentaje de los aislados clínicos corresponden a pacientes que se curaron. En el Grupo 4, los únicos dos aislados (100%) corresponden a curación. El Grupo 1 registro el menor porcentaje (7.7%, 1) de aislados de pacientes que fallecieron con respecto al Grupo3 (23.5%,4; respectivamente).

Tabla 11. Descripción del tipo de egreso de acuerdo al grupo de genotipo (MIRU-Farma) de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* analizados.

Tipo Egreso	Genotipo (MIRU-Farma)							
	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Curado	10	76.9	6	75.0	8	47.1	2	100.0
Fracaso	2	15.4	1	12.5	5	29.4	0	0.0
Defunción	1	7.7	1	12.5	4	23.5	0	0.0
Total	13	100.0	8	100.0	17	100.0	2	100.0

Genotipo Linaje vs Variables clínicas y sociodemográficas

Se realizó un análisis comparativo de los genotipos vs dos variables clínicas que incluyeron tipo de ingreso y egreso al tratamiento y dos variables sociodemográficas que incluyeron lugar de origen y de residencia. El resultado mostró que existe mayor asociación entre linaje, lugar de residencia y egreso del paciente; pero no existe asociación con lugar de origen e ingreso a tratamiento. El análisis de factores revela una asociación de un grupo de variables mediante la generación de dos nuevas variables denominadas factores principales o componentes principales, los cuales son perpendiculares y recogen la variación del conjunto de variables analizadas sobre estas dos variables perpendiculares; se plasman las variables analizadas cuya carga superior a 0.7 lo que se considera significativa la asociación.

Al efectuar el análisis de factores con base en el análisis de componentes principales, se puede inferir que las variables que se asociaron de manera significativa con una carga superior a 0.7 son linaje, egreso y lugar de residencia. Lo cual coincide con el coeficiente de correlación de Spearman con $P < 0.05$.

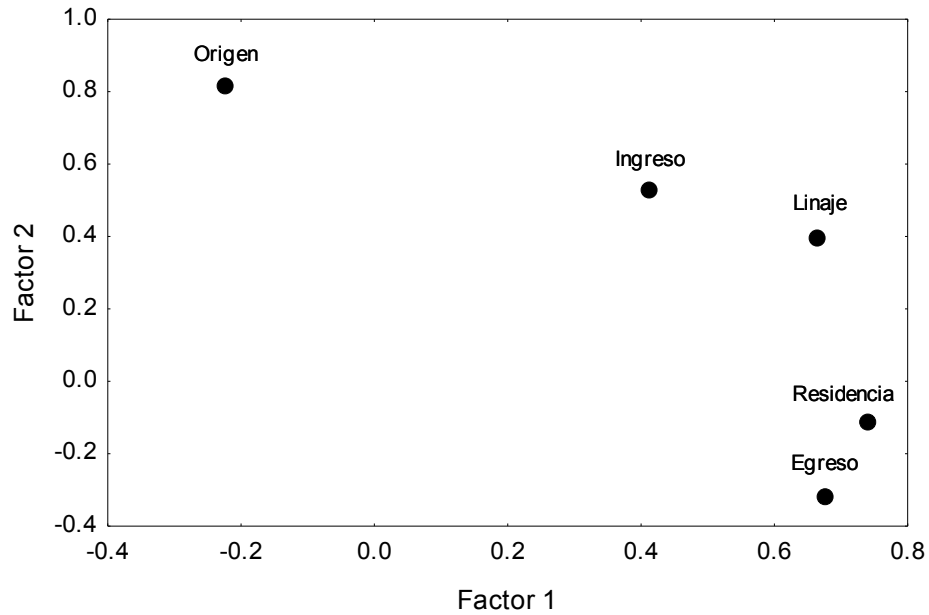


Figura 7. Análisis comparativo del linaje vs variables clínicas (tipo de ingreso y egreso) y variables sociodemográficas (lugar de residencia y lugar de origen).

El análisis de distribución de linajes de acuerdo al lugar de residencia, mostró que Tijuana, es el lugar donde se ubican todos los tipos de linajes, con excepción del linaje Bovis, lo cual puede asociarse a la característica de población fluctuante en la región. Uno de los dos aislados del linaje Beijing se ubicó en Mexicali. El linaje correspondiente a Bovis se identificó en el paciente de Tecate. En contraste, la mayor parte de los aislados de linaje nuevo se ubicaron en Ensenada (Fig. 8).

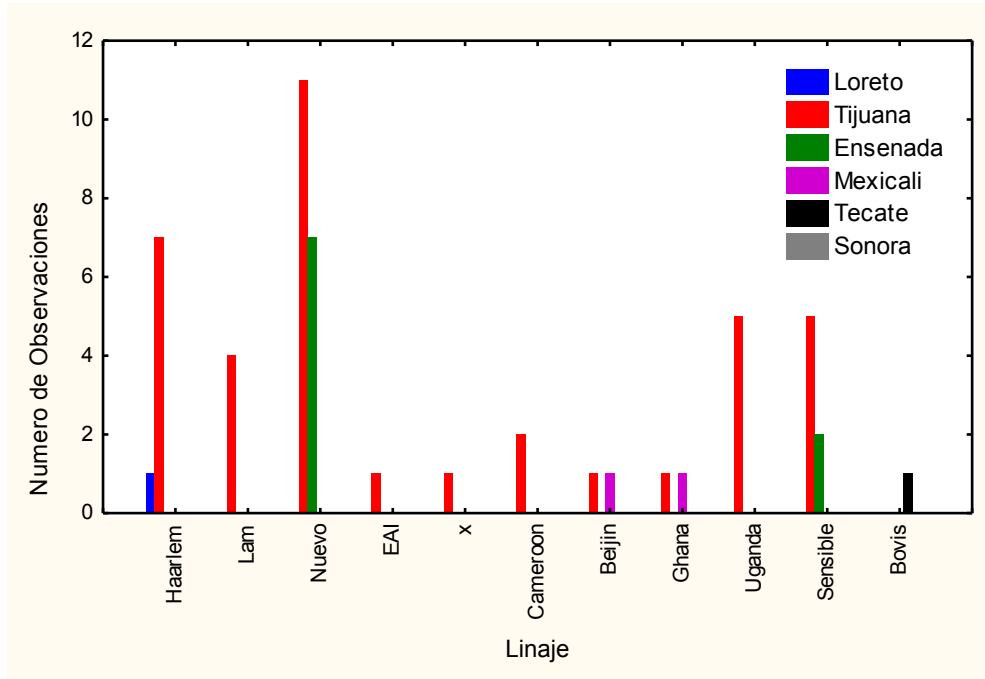


Figura 8. Distribución de linajes con respecto al lugar de residencia

A partir del análisis de correlación con rango de Spearman, se detectó correlación significativa entre lugar de residencia y tipo de egreso, así como también, entre lugar de origen y linaje MIRU-Farmacorresistencia (Fig. 9), esto como resultado del análisis de linaje MIRU- Farmacorresistencia vs lugar de residencia, lugar de origen, tipo de ingreso y egreso.

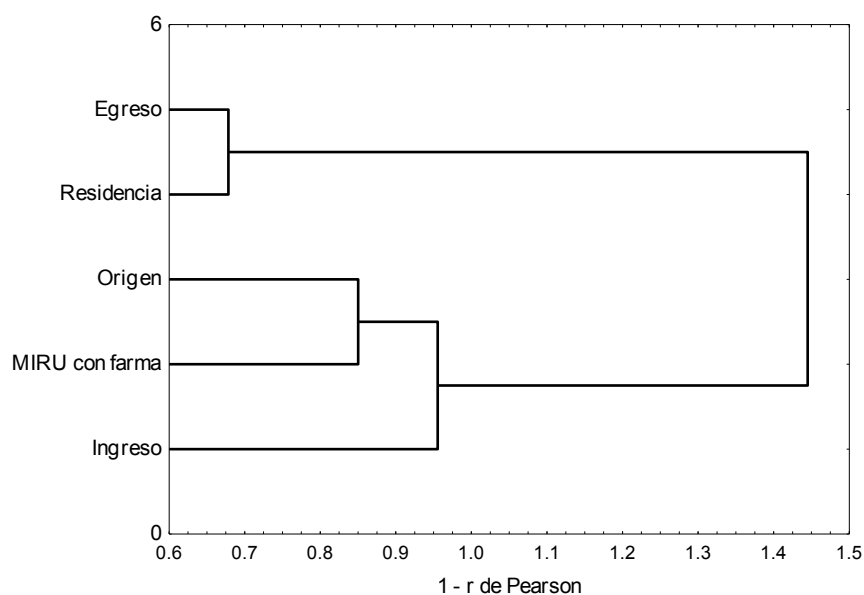


Figura 9. Relación entre lugar de residencia y tipo de egreso, así también, entre lugar de origen y linaje MIRU- Farmacorresistencia.

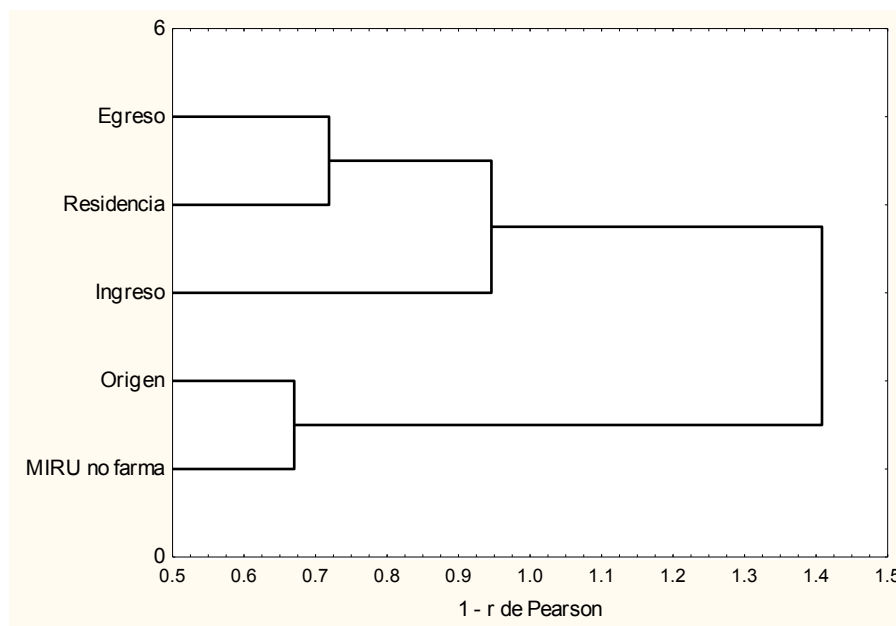


Figura 10. Relación entre lugar de residencia y tipo de egreso, así también, entre lugar de origen y linaje MIRU-No Farmacorresistencia

También se encontró que la farmacorresistencia se asocia con lugar de nacimiento e ingreso del tratamiento, y por otro lado, egreso con esquema de tratamiento. Sin embargo, ninguna de estas asociaciones son estadísticamente significativas ($P > 0.05$; Fig. 12).

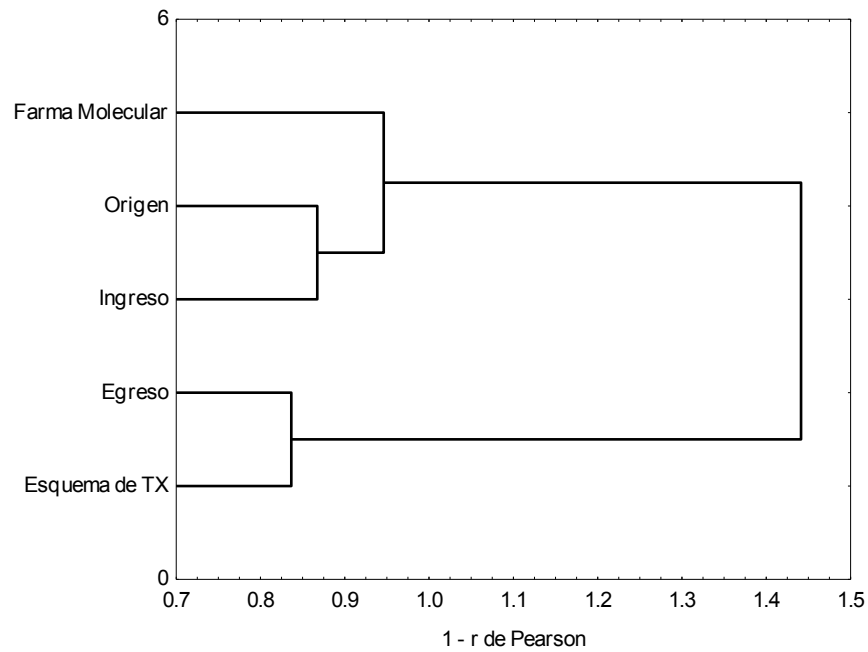


Figura 11. Asociación entre farmacorresistencia y variables clínicas y sociodemográficas

Perfil farmacorresistencia molecular vs fluométrico.

El análisis de comparación entre el perfil de farmacorresistencia molecular y fluométrico, reveló que existen diferencias en cuanto al fármaco analizado (Tabla 12). Una vez efectuados los diagnósticos de farmacorresistencia en muestras de cultivos provenientes de esputo de los 61 pacientes, tanto de manera tradicional directa en cultivo como de forma molecular, se encontró que: para el gen H_KatG1, el diagnóstico en cultivo reportó 54 pacientes sensibles y 7 resistentes, en cambio para el diagnóstico molecular arrojó 16 sensibles y 45 resistentes; para el gen H_InhA, el cultivo detectó 50 sensibles y 11 resistentes, el molecular 28 sensibles y 33 resistentes; el gen Z_pncA, mostró para el diagnóstico de cultivo 49 sensibles y 12 resistentes, en tanto que el diagnóstico molecular se tuvieron 28 sensibles y 33 resistentes. En lo que respecta al gen R_rpoB, el cultivo presentó 47 sensibles y 14 resistentes, el molecular 24 sensibles y 37 resistentes; para el gen S_rpsL, en el cultivo se tuvo 53 sensibles y 8 resistentes, en cambio para el diagnóstico molecular se reportaron 23 sensibles y 38 resistentes; en el caso del gen S_rrS, el cultivo dio 54 sensibles y 7 resistentes, en contraste con el molecular que presentó 27 sensibles y 34 resistentes. El gen E_embB, arrojó en el diagnóstico por cultivo 49 sensibles y 11 resistentes, en cambio el diagnóstico molecular reporta 27 sensibles y 33 resistentes. Los dos últimos genes Oxaf_gyrA y kana_rrs solo se les practicó diagnóstico molecular los cuales arrojaron 33 sensibles y 27 resistentes para el primero y 28 sensibles con 31 resistentes para el último gen. Aunque no se encuentra sumamente probado, debe señalarse que el resultado anterior pudiera estar condicionado por la falta de reactivos para realizar de manera continua las pruebas de sensibilidad antimicrobiana a las muestras clínicas.

Tabla 12. Comparación entre el perfil farmacorresistencia molecular y fluométrico.

Fármaco	Perfil de farmacorresistencia			
	Fluométrico		Molecular	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
H_KatG1	89%	11%	26%	74%
H_InhA	82%	18%	46%	54%
Z_pncA	80%	20%	46%	54%
R_rpoB	77%	23%	39%	61%
S_rpsL	87%	13%	38%	62%
S_rrS	89%	11%	44%	56%
E_embB	80%	18%	44%	54%
Oxaf_GyrA	Sd	Sd	54%	44%
Kana_rrs	Sd	Sd	46%	51%

DISCUSION

Variables sociodemográficas

Como se señaló anteriormente, la edad de los 61 pacientes analizados presentó una distribución normal, con una media de 37 años, un mínimo de 13 años y un máximo de 70 años. El sexo masculino representó el 67% y el sexo femenino el 33% del total de la muestra. A partir del año 2001, los grupos de la mediana edad, a partir de 20 a 24 años y hasta el grupo 45 a 49 años, incrementaron notablemente su incidencia por arriba de los grupos más longevos (Secretaria de Salud, 2004).

El 68.8% de los pacientes reportó escolaridad baja (primaria y secundaria), lo cual concuerda con otros estudios realizados en México (Pérez-Navarro et al., 2011). De acuerdo al censo de INEGI de 2010, en México el grado promedio de escolaridad en población mayor de 15 años es de 8.6. Mientras, que en Baja California, reportó 9.3 grados cursados en promedio, cifra que resulta superior a la media nacional. El nivel escolar constituye una premisa que condiciona de modo regular la ocupación laboral y es un componente determinante de la cultura y la educación, además de que permite comprender y enfrentar mejor los fenómenos sociales (Lozano-Salazar et al., 2009). Este resultado indica que es crítico establecer estrategias que permitan incrementar la frecuencia y la calidad de la información que se hace llegar a este grupo de población para prevenir o bien disminuir la transmisión de la enfermedad.

En cuanto a ocupación el mayor porcentaje de casos se observó entre asalariados, lo cual coincide con la literatura, que establece que es un grupo vulnerable, debido a que las principales actividades que realizan este grupo de personas se caracteriza por estar en contacto estrecho en ambientes durante jornadas laborales extendidas, lo que incrementa el riesgo de contacto con personas enfermas sin tratamiento, capaces de infectar entre 10 a 15 personas por año por lo que la cadena de trasmisión de este patógeno continúa. Se ha reportado ampliamente en la literatura que el hacinamiento en viviendas, reclusorios, internados y orfanatos, son áreas de riesgo para infectarse de *M. tuberculosis*. En Baja

California, la industria maquiladora representa un foco de riesgo, al cumplirse las condiciones antes mencionadas, ya que es una de las principales actividades económicas del sector industrial en el estado, empleando a un gran número de habitantes de la región (Caminero-Luna, 2003)

El 47.5% (29) es originario de Baja California, 46.0% (28) proviene de diferentes estados de la República Mexicana y el 6.5% no especifica el lugar de nacimiento. Con respecto a los foráneos, el mayor número de aislados correspondió a pacientes originarios del estado de Durango 6.5 %, seguido de Guanajuato, Jalisco y Veracruz con 4.9% cada uno. Estos resultados coinciden con registros del Gobierno de Baja California (Gobierno de Baja California, 2008), donde se reporta que por cada nacimiento en el estado, llega una persona de otra entidad a residir a Baja California, principalmente de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Guerrero (Rubio et al., 2000). Los estados que reportan altas tasas de incidencia de TB, son Tamaulipas, Guerrero, Nayarit, Sonora, Sinaloa, Veracruz, Chiapas y Nuevo León, los cuales concentran el 70% de los casos identificados en el país (Secretaría de Salud, 2011). La congregación de individuos infectados con TB de forma latente y el alto índice de migración del sur de México hacia la frontera Baja California y el retorno de los mismos a sus ciudades de origen, después de un periodo de tiempo en la zona, puede ser un factor que está contribuyendo a la dispersión de la TB en la región (Garfein et al., 2010).

Variables clínicas

Este estudio reveló que la TB pulmonar se presentó en el 93.4% de los casos estudiados y el 83.6% se diagnosticó con baciloscopia positiva y más de la mitad de los casos francamente bacilíferos (58.9%), es decir baciloscopia positiva +++. De acuerdo a datos disponibles en la Plataforma única de Tuberculosis se detectaron pacientes que se les indicó tratamiento por más de seis meses, con el mismo esquema de tratamiento a pesar de que los resultados de control baciloscópico continuaban positivos.

Entre 1995 y 2010, 55 millones de pacientes con tuberculosis fueron tratados en programas de tuberculosis que adoptaron estrategias TAES (Tratamiento Acortado

Estrictamente Supervisado), 46 millones de estas personas fueron tratadas satisfactoriamente. Este tratamiento se estima salvó 6.8 millones de vidas comparado con la etapa pre-TAES como manejo estándar de la tuberculosis (WHO, 2011).

Actualmente, el esquema de tratamiento en Baja California es establecido con base en los lineamientos del COEFAR, todo paciente que inicia tratamiento por primera vez ingresa a tratamiento primario acertado con una duración de 6 meses, sin embargo si el paciente abandona, fracasa o recae, se le realiza primeramente cultivo y prueba de sensibilidad antimicrobiana, para establecer tratamiento individualizado y con esto lograr mayor porcentaje de curación. El esquema de tratamiento primario acertado se indicó con mayor frecuencia de la que correspondía a los casos nuevos reportados al inicio del tratamiento, lo cual se traduce en que el 13.1% de los pacientes no iniciaron el tratamiento según lo establecido por el COEFAR, retrasando con ello el manejo adecuado para el paciente e incrementando las posibilidades de farmacorresistencia secundaria, ya que a estos pacientes les correspondía por clasificación al momento del ingreso un esquema de tratamiento individualizado (Secretaría de Salud, 2010). El análisis de asociación entre tipo y esquema de tratamiento, así como tiempo y egreso de tratamiento fue significativo, lo cual está de acuerdo con los estándares internacionales referentes a cumplir como mínimo seis meses de tratamiento antes de egresar al paciente, y de iniciar con tratamiento acertado primario a todo caso nuevo diagnosticado con tuberculosis. En este estudio se determinó que el porcentaje de curación al recibir seis meses de tratamiento, como lo indica la Norma Oficial Mexicana para la prevención, diagnóstico y control de la TB es menor (76.9%), que lo reportado a nivel internacional, considerando que se exige una curación mínima del 85% para considerar que el país está invirtiendo los recursos necesarios para lograr el control de este padecimiento (WHO, 2011). La diferencia entre los porcentajes de curación mencionados anteriormente, puede deberse a la diferencia entre el esquema de tratamiento farmacológico que le fue suministrado a cada paciente y el perfil de farmacorresistencia molecular que reveló el aislado clínico correspondiente al paciente. En este estudio, en más del 50% de los pacientes se identificó una diferencia en el esquema farmacológico administrado y el perfil molecular. Esto quiere decir, que en muchos de los casos al paciente se le administró un fármaco al cual de acuerdo al análisis molecular era resistente.

En gran medida, la farmacoresistencia está producida por los errores cometidos por el personal a cargo de prescribir esquemas de tratamiento (ejemplo: bajas dosis, tiempo insuficiente e ingesta de dosis fraccionadas del medicamento) y por el abandono temprano del tratamiento por parte de los pacientes, que en muchos casos ha llevado a incrementar la aparición de cepas MDR. Una vez que se adquiere resistencia a un solo medicamento, existe mayor vulnerabilidad para adquirir mayor resistencia, ya que las cepas se vuelven secuencialmente resistentes a diversos agentes y transmiten estas cepas a otros, quienes luego presentan una resistencia en pacientes sin tratamiento previo, anteriormente llamada resistencia primaria (Farmer et al., 2001). En el 2008, en México se registraron 479 casos de cepas MDR y en nuestro estado, Baja California 23 casos, actualmente bajo tratamiento de segunda línea y en estrecho seguimiento. Los esfuerzos locales a nivel regional han redituado en avances respecto a la curación de algunos de estos casos, sin embargo, se continúan reportando elevadas tasas prevalencia para TB en Baja California, colocándolo como el estado de la República con mayor reporte de casos nuevos y la mayor mortalidad (SSA, 2010).

Actualmente, sólo se diagnostican y se tratan adecuadamente el 2% de los casos mundiales de TB-MR, sobre todo debido a la inexistencia de servicios de laboratorio satisfactorios (WHO, 2008). Entre 1986 y 1990, la OMS y la OPS reportó un 19% de resistencia primaria en México (Laszlo & de Kantor, 1994; García-García et al., 1995; WHO, 2006). En el año 2001, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) reportó para México, una tendencia ascendente en la resistencia secundaria entre los periodos 1994-1997 y 1997-2000 de 13 y 16%, respectivamente (Olvera, 2001). Estudios para Baja California reportan que las tasas de TB resistente a un solo fármaco (TB-DR) son muy elevadas (41%), y para TB-MR, se estima que existen entre 50 y 100 individuos. (Peter et al., 1998; California Tuberculosis Controllers Association, 2005) Estos resultados se contraponen con lo detectado en el análisis molecular de este estudio, en donde, la monoresistencia se presentó en un bajo porcentaje (6.5%). Sin embargo, en el caso de la farmacoresistentes a 3 o más fármacos fue la más alta (72.9%) y con ello se confirma el resultado histórico arriba mencionado. Así también, se detectó un 10.2% de aislados ultrarresistentes (TB-XR) de acuerdo a la OMS (H+Z+R+S+E+K+O). Hasta el

momento, no existen registros oficiales por parte de la Secretaria de Salud el Estado de Baja California que indiquen la presencia de cepas X-DR. Sin embargo, y como ya se menciono antes, desde 1993 hasta 2008 se han reportado 23 casos de TB-XR en California(California Department of Public Health, 2009a, b). Aproximadamente 11 millones de personas (30%) que residen en California, son de origen mexicano. Existe un alto flujo diario de cruce en la frontera entre Baja California-California, ya sea por motivos de trabajo, educación, compras, turismo, visitas sociales, etc. Desde 2001 – 2006, se han registrado 80 millones de cruces al año de México hacia California, incluyendo personas, que pasan caminando, por autobús y tren, lo que se traduce en 219, 178 cruces por día. Los dos condados fronterizos de California, son Valle Imperial y San Diego, los cuales para el año 2006 registraron una población de 168, 979 y 3,077, 877 respectivamente. Para el caso de Valle Imperial, el 77% es de origen hispano, y para San Diego es del 28%, ambos condados son lo que presentan el mayor número de población hispana, y coincidentemente el mayor número de casos reportados de TB con respecto al resto de los condados de California. Entre 2003 y 2006, el 39% del número total de casos de TB en California fueron hispanos. De estos el 70% y el 34% eran de origen mexicano, para Valle Imperial y San Diego, respectivamente. Aproximadamente, el 20% de los casos de TB de personas nacidas en México reportados en San Diego, habían sido diagnosticados dentro del año posterior a su arribo a EU, mientras que los reportados en imperial, habían residido en EU por más de 10 años(California Tuberculosis Controllers Association, 2005; California Department of Public Health, 2009a, b). Desafortunadamente la Plataforma única de Tuberculosis no incluye información sobre el número de cruces y tiempo de permanencia en EUA-México, por lo que no se puede afirmar que esta sea uno de los factores en la presencia de aislados TB-XR en la región de Baja California.

Los casos con TB-MR difícilmente se curan, particularmente si padecen VIH/ SIDA o desnutrición. Además, su tratamiento es más tóxico y caro que el tratamiento de pacientes enfermos con cepas sensibles(Mitchison & Nunn, 1986; Frieden et al., 1996). Desde 1993, la TB se ha asociado con VIH/SIDA, diabetes mellitus, desnutrición y adicciones principalmente el alcoholismo y drogadicción, lo cual ha venido a agravar el perfil de la TB. Lo anterior coincide con lo que se detectó en el presente estudio, en donde los

pacientes estudiados presentaron comorbilidad con diabetes mellitus y alcoholismo en un mismo porcentaje (13%), VIH/SIDA se reportó en el 8.2% de los pacientes, 4.9% usuarios de drogas, y el 8.2% no se reportó el dato. Sin embargo, la mitad de los pacientes (52.5%) no reportaron algún tipo de enfermedad asociada. En los últimos años la DM se ha venido posicionando como un nuevo factor a considerar en la actual y futura dinámica epidemiológica de esta enfermedad. Sin embargo, el incremento en la prevalencia de DM observado en los últimos años ha repercutido de manera importante en la dinámica de la TB, de tal manera que estudios recientes muestran que el 10-30% de los pacientes con TB también padecen DM2 (Pérez-Navarro, 2011). El alcoholismo ha sido señalado como una condición predisponente para el padecimiento de la infección tuberculosa. Su asociación con el deterioro inmunológico o la desnutrición, o con ambos, interviene en la predisposición de estos pacientes a contraer la enfermedad. Las medidas preventivas del consumo de alcohol exceden, evidentemente, las del control de la TB, pero sí deben ser objeto de atención en los servicios de asistencia social por la mayor tendencia al incumplimiento terapéutico en estos pacientes (Bustamante ML, 2003). La TB se asocia de manera importante a la infección por VIH, sin embargo la prevalencia varía ampliamente de un país a otro, y dentro de un mismo país, variando del 1% en países con baja prevalencia, hasta el 50 a 70% en países con alta prevalencia de la infección por VIH. En estos pacientes se aumenta la probabilidad de la progresión de la infección por *M. tuberculosis* a tuberculosis activa. En nuestro estudio los casos de VIH/SIDA el 60% se curó y el 40% abandonó el tratamiento (NIAA, 2006).

Los pacientes que no presentaron ninguna enfermedad asociada a la TB fueron los que reportaron el mayor porcentaje de curación (60%) y el menor porcentaje de defunción (3.1%). En contraste, los usuarios de drogas el 66.7% abandonó el tratamiento y el 33% fracasó. Sin embargo, debido a que se abandonó el tratamiento no se sabe si hubo defunción o si aún sigue con vida.

Mycobacterium bovis

Antes de concluir este análisis, es importante destacar algunas reflexiones sobre los aislados clínicos identificados molecularmente como *M. bovis*, los cuales representaron el 6.6% (4) de la muestra, en contraste con el 93.4 % (57) como *M. tuberculosis*. En cuanto a la TB humana, *M. bovis* es el agente causal más frecuente, aportando el 5% de los casos de TB a nivel mundial (Cosivi et al., 1998). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el número de casos de TB por *M. bovis* en humanos. En países desarrollados, la incidencia de TB por *M. bovis* se ha reportado del 10 al 15% (de la Rúa-Domenech, 2006; Hlavsa et al., 2008; Olabisi et al., 2008). La TB bovina es una zoonosis que se caracteriza por producir granulomas en diferentes órganos, especialmente pulmones y nódulos linfáticos en animales y humanos. La TB bovina puede ser adquirida por la ingestión de leche sin pasteurizar o derivados de ésta. La vía de infección más frecuente es la respiratoria, por exposición a microaerosoles cargados con bacilos, pero también puede ser entérica, por lo que trabajadores de establos, de rastros y veterinarios son considerados poblaciones de alto riesgo (Biet et al., 2005; de Kantor & Ritacco, 2006; Thoen et al., 2006). Este tipo de TB bovina constituye un problema de salud pública por generar grandes pérdidas a la economía de muchos países (Cosivi et al., 1998; Hlavsa et al., 2008; Michel et al., 2010; Rocha et al., 2011). La importancia de identificar la especie de *Mycobacterium* que ocasiona la TB es debido a que *M. bovis* es naturalmente resistente a la pirazinamida, por lo que se debe omitir su uso en el esquema farmacológico. En México, los reportes oficiales indican que cerca del 30% de la leche que se produce en el país se vende en la forma de leche cruda, una parte de la cual se destina a la producción de queso fresco, el cual se distribuye en mercados populares. La incidencia de TB en algunas comunidades binacionales (EUA y México) se ha incrementado significativamente por *M. bovis*. Un estudio retrospectivo realizado en San Diego, California de 1994 a 2005 mostró un incremento en los casos registrados de TB por *M. bovis*, en donde 45% de los casos eran niños menores de 15 años y 6% de los casos eran adultos. Un aspecto importante es que casi todos los casos de *M. bovis* de 2001 a 2005 fueron personas hispanas (Rodwell & Moore, 2008). De manera similar, un estudio realizado en población pediátrica en hospitales de San Diego en el periodo de 1980 a 1997 reveló que la incidencia de TB por *M. bovis* se incrementó a partir de 1989 alcanzando su mayor pico a mediados de los 90's.

De 180 pacientes con cultivo positivo, el 33.9 % fueron *M. bovis* y 66.1% *M. tuberculosis*. De igual manera, el 78.9 % de los pacientes fueron de raza hispana(Dankner & Davis, 2000). Recientemente se realizó un estudio de tipificación genética de número variable de repeticiones en secuencia (VNTR) a 11 aislados provenientes de ganado sacrificado en un rastro de Mexicali BC, y a 10 aislados de ganado sacrificado en un rastro de Tijuana, los cuales presentaron diferentes genotipos de *M. bovis*, lo que indica que existe más de una cepa circulando en la región de Baja California (Martínez-Vidal et al., 2011). Estos datos demuestran que existe una subestimación de TB zoonótica en la región fronteriza de EUA – México. Por lo que es importante investigar los factores que están ocasionando el incremento de *M. bovis* en los humanos en la región de Baja California.

CONCLUSIONES

Después de haber presentado los principales hallazgos de la investigación se puede afirmar que la hipótesis de trabajo planteada se comprobó en tres de cuatro de los factores que podrían estar explicando la alta prevalencia de tuberculosis en el estado de Baja California (diagnostico insuficiente para la detección de la cepa que afecta al paciente, así como el alto perfil de farmacorresistencia y el limitado acceso a medicamentos de segunda línea). En cuanto al perfil sociodemográfico y clínico de los pacientes, su influencia en la prevalencia de la enfermedad no pudo ser categórica. Por lo anterior, el reforzamiento de las estrategias implementadas hasta el momento, así como la optimización del diagnóstico y el estudio de la dinámica epidemiológica mediante el fortalecimiento de la infraestructura del programa de micobacteriosis ayudará a incrementar las tasas de curación y coadyuvará en la reducción de la tasa de abandono y recaída de los pacientes con tuberculosis.

Los datos generados en este estudio son los primeros para Baja California, sin embargo es de gran relevancia incrementar el número de muestras y obtener mayor información epidemiológica de los pacientes para generar información que apoyen en el desarrollo de estrategias para una detección temprana y diagnóstico individualizado que permita asegurar un mejor tratamiento y la curación del paciente.

Existen múltiples problemáticas que interactúan para dificultar el control de la TB en nuestra región, ya que se tienen altas incidencias de infección por VIH SIDA, adicciones, desnutrición en grupos de riesgo altamente vulnerables como migrantes y grupos indígenas.

En cuanto a la pregunta de investigación relativa a la forma en que el perfil sociodemográfico y clínico del paciente con tuberculosis influye en el tratamiento que se prescribe, se puede afirmar que no se encontró una asociación directa entre la prescripción del tratamiento con las características socio-demográficas del paciente, sin embargo llama la atención en hecho de que el 100% de los abandonos de tratamiento ocurrieron en el sexo masculino, que a la vez parece estar influido por su estructura familiar. En tanto que para

las variables clínicas si se encontró una cierta asociación con tipo de ingreso y prescripción del tratamiento. También se asocio el tipo de egreso (por ejemplo, abandono) con enfermedades concomitantes principales como adicción a drogas, VIH/SIDA y en menor medida diabetes y alcoholismo.

En relación con la exposición previa a medicamento antituberculoso como condicionante para generar farmacorresistencia se encontró que un porcentaje de pacientes (13.1%) no recibió el tratamiento indicado de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana y por el COEFAR. Así mismo, se encontró que tres de cada 10 pacientes estudiados recibieron tratamientos previos al momento del ingreso, lo cual de acuerdo a la literatura reconocida se considera el principal factor de riesgo para el desarrollo de la farmacorresistencia (FR). Los resultados de investigación también confirman que a pesar de que el paciente presentaba una evolución clínica desfavorable (basiloscopía positiva), se continuo otorgando tratamientos mayores a seis meses, lo cual favorece la FR, que además presento un porcentaje de curación menor a la establecida en el ámbito internacional.

Finalmente en cuanto al acceso del paciente a fármacos de segunda línea, se encontró que solo cuatro pacientes recibieron tratamiento individualizado, siendo que el resultado molecular arrojó que el 72% de los aislados fueron resistentes a tres o más fármacos y el 10.2% presentó ultrarresistencia (TB-XR). Una de las debilidades del sistema de salud en Baja California es la falta de los recursos materiales necesarios para llevar a cabo todas las pruebas de sensibilidad a fármacos al momento del ingreso a tratamiento. La solución a la problemática anterior, podría mejorar sensiblemente la respuesta del paciente a tratamientos prescritos.

LITERATURA CITADA

- Allix, C., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2004, Utility of Fast Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit—Variable Number Tandem Repeat Genotyping in Clinical Mycobacteriological Analysis. *Clin. Infect. Dis.* 39, 783-789.
- Allix-Béguet, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., Niemann, S., 2008, Evaluation and Strategy for Use of MIRU-VNTRplus, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping Data and Phylogenetic Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *Journal Clinical Microbiology* 46, 2692-2699.
- Ardito, F., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Zanetti, S., Fadda, G., 2001, Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 39, 4440-4444.
- Bakshi, C.S., Shah, D.H., Verma, R., Singh, R.K., Malik, M., 2005, Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Veterinary Microbiology* 109, 211-216.
- Biet, F., Boschioli, M., Thorel, M., Guilloteau, L., 2005, Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* intracellulare complex (MAC). *Veterinary Research* 363, 411-436.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., 2002, A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 99, 3684-3689.
- California Department of Public Health 2009a. Border health status report to the legislature 2006-2008 (San Diego, California, California Department of Public Health).
- California Department of Public Health 2009b. Report on Tuberculosis In California, 2008 (Richmond, California Department of Public Health).
- California Tuberculosis Controllers Association, 2005. Report on USAID San Diego Border Project. In: CTCA Fall Meeting.
- Caminero-Luna, J., 2003, Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. . París: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER).

- Cave, M.D., Eisenach, K.D., McDermott, P.F., Bates, J.H., Crawford, J.T., 1991, IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting *Molecular Cell Probes* 5, 73-80.
- Consejo Nacional de Población 2009. Cifras XII Censo General de Poblacion y Vivienda, .
- Cosivi, O., Grange, J., Daborn, C., Raviglione, M., Fujikura, T., Cousins, D., 1998, Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases* 4, 59e70.
- Cowan, L.S., Mosher, L., Diem, L., Massey, P., Crawford, J.T., 2002, Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1592-1602.
- Dankner, W.M., Davis, C.E., 2000, *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico Border in the Baja California region. *Pediatrics* 105, 1-5.
- de Kantor, I., Ritacco, V., 2006, An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries, *Veterinary Microbiology*. *Veterinary Microbiology* 112, 111-118.
- de la Rúa-Domenech, R., 2006, Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 86, 77-109.
- Dickman, K., Nabyonga, L., Kateete, D.P., Katabazi, F., Asimwe, B.B., Mayanja, H.K., Okwera, A., Whalen, C., Joloba, M.L., 2010, Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BioMed Central Infectious Diseases* 10, 1-8.
- Evans, J., Segal, H., 2010, Novel multiplex allele-specific PCR assays for the detection of resistance to second-line drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 897-900.
- Evans, J., Stead, M.C., Nicol, M.P., Segal, H., 2009, Rapid genotypic assays to identify drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 11-16.

- Farmer, P., Walton, D., Becerra, M., 2001, International Tuberculosis Control in the 21 st Century, In: Friedman, L. (Ed.) Tuberculosis: Current Concepts and Treatment. CRC Press, New York, pp. 475-496.
- Frieden, T.R., Sherman, L.F., Maw, K.L., 1996, A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. Journal of the American Medical Association 276, 1229-1235.
- García-García, M., Valdespino-Gómez, J., Palacios-Martínez, M., Mayar-Maya, C, G.-S., Sepúlveda-Amor, J., 1995, Tuberculosis y SIDA en México. Salud Pública Méx 37, 539-548.
- Garfein, R.S., Burgos, J.L., Rodríguez-Lainz, A., Brodine, S., Pietrucha, A., Rondinelli, A., Laniado-Laborin, R., Ibarra, E., Cañez, A., Fraga, M., 2010, Latent Tuberculosis Infection in a Migrant Agricultural Community in Baja California, Mexico. Journal of Immigrant Minority Health.
- Gobierno de Baja California 2008. Plan Estatal de Desarrollo 2008-2013 (Mexicali, B.C.).
- Heifers, L., Good, R., 1994, Current laboratory methods for the diagnosis of TB, In: Bloom, B. (Ed.) TB pathogenesis, protection and control. American Society for Microbiology, Washington, pp. 85-110.
- Hernández-Hernández, F.d.I.C., Rodríguez, M.H., 2009, Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Salud Pública de México 51, 424-438.
- Hlavsa, M.C., Moonan, P.K., Cowan, L.S., Navin, T.R., Kammerer, J.S., Morlock, G.P., Crawford, J.T., LoBue, P.A., 2008, Human Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995–2005. Clin. Infect. Dis. 47, 168-175.
- Huygens, F., Stephens, A.J., Nimmo, G.R., Giffard, P.M., 2004, *mecA* Locus Diversity in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Brisbane, Australia, and the Development of a Novel Diagnostic Procedure for the Western Samoan Phage Pattern Clone. Journal of Clinical Microbiology 42, 1947–1955.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2003, Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico México, D.F.
- Jafarian, M., Aghali-Merza, M., Farnia, P., Ahmadi, M., Reza Masjedi, M., Akbar Velayati, A., 2010, Synchronous Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiology

- Strains by "MIRU-VNTR" and "MIRU-VNTR and Spoligotyping" Technique. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 2, 145-152.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997, Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 907-914.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenber, P.C., Winn, W.C., 1997, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakus, M.A., Musser, J.M., Embden, v., 1999, Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2607-2618.
- Laszlo, A., de Kantor, I.N., 1994, A random sample survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin America. *Bulletin of the World Health Organization* 72, 603-610.
- Lee, A.S., Tang, L.L., Lim, I.H., Bellamy, R., Wong, S.Y., 2002, Discrimination of Single-Copy IS6110 DNA Fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by High-Resolution Minisatellite-Based Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 657-659.
- Lozano-Salazar, J., Plasencia-Asorey, C., Ramos-Arias, D., García-Díaz, R., Mahíquez-Machado, L., 2009, Factores de riesgo socioeconómicos de la tuberculosis pulmonar en el municipio de Santiago de Cuba. *MEDISAN* 13.
- Martínez-Vidal, C., Hori-Oshima, S., de la Mora-Valle, A., Bermúdez-Hurtado, R., Rentería-Evangelista, T., López-Valencia, G., Galván-Lara, L., Medina-Basulto, A., 2011, Genotipificación por VNTR de aislados de *Mycobacterium bovis* de ganado sacrificado en Baja California, México *Revista Mexicana Ciencia Pecuaria* 2, 393-401
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A.L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C., Supply, P., 2001, High-resolution minisatellite-based typing as a portable


- approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America 98, 1901-1906.
- Michel, A.L., Müller, B., van Helden, P.D., 2010, *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? Veterinary Microbiology 140, 371-381.
- Mitchison, D.A., Nunn, A.J., 1986, Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases 133, 423-430.
- Molhuizen, H.O., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Embden, J.D.A., 1998, Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. Methods Mol. Biol. 101, 381-394.
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz A, Behr, M., 2002, Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Journal of Infectious Disease 186, 74-80.
- Oelemann, M.C., Diel, R., Vatin, V., Haas, W., Rußsch-Gerdes, S., Locht, C., Niemann, S., Supply, P., 2007, Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit–variable-number tandem repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology 45, 691-697.
- Olabisi, O., Sheehan, S., Corcoran, G.D., Okker, M., Gover, K., Nikolayevsky, V., Brown, T., Dale, J., Gordon, S., Drobniowski, F., Prentice, M.B., 2008, *Mycobacterium bovis* Strains Causing Smear-Positive Human Tuberculosis, Southwest Ireland. Emerging Infectious Diseases 14, 1931-1934.
- Olvera, C., 2001, Farmacorresistencia secundaria en tuberculosis. Tendencia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 14, 151-159.
- Pérez-Navarro, L., Fuentes-Domínguez, F., Morales-Romero, J., Zenteno-Cuevas, R., 2011, Factores asociados a tuberculosis pulmonar en pacientes con diabetes mellitus de Veracruz, México. Gaceta Médica de México 147, 219-225.
- Peter, C.R., Schultz, E., Moser, K., 1998, Drug-resistant pulmonary tuberculosis in the Baja California-San Diego County border population. The Western Journal of Medicine 169, 208-213.

- Rocha, A., Elias, A.R., Sobral, L.F., Soares, D.F., Santos, A.C., Marsico, A.-G., Hacker, M.A., Caldas, P.C., Parente, L.C., Silva, M.R., Fonseca, L., Suffys, P., Boéchat, N., 2011, Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis* 91, 14-21.
- Rodwell, T.C., Moore, M., 2008, Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. *Emerging Infectious Disease* 14, 909-916.
- Rubio, M., Millan, S., Gutierrez, J., 2000, La migración indígena en México, Estado del Desarrollo Económico y Social de los pueblos indígenas de México. Instituto Nacional Indigenista, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, México.
- Secretaría de Salud 2004. Guía para la atención de pacientes con tuberculosis multifarmacorresistente (México, DF.).
- Secretaría de Salud 2007. Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud (México, D.F., Secretaría de Salud), p. 188.
- Secretaría de Salud, 2010, Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos.
- Secretaría de Salud 2011. Situación actual de la Tuberculosis en México...Avances y desafíos. In Plataforma única de información/SUIVE.
- SEDESOL 2007. Programa de Desarrollo Urbano de los Centros de Población: San Quintín-Vicente Guerrero. Ensenada; 2007.
- Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Loch, C., Supply, P., Rastogi, N., 2003, Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect. Gen. Evol.* 3, 125-133.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Loch, C., van Soolingen, D., 2006, Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4498-4510.

- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Van Soolingen, D., Locht, C., 2001, Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal Clinical Microbiology* 39, 3563-3571.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C., 2000, Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology* 36, 762-771.
- Thoen, C., LoBue, P., de Kantor, I.N., 2006, The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology* 112, 339-345.
- Wayne, M., Dankner, M., Davis, C.E., 2000, *Mycobacterium bovis* as a Significant Cause of Tuberculosis in Children Residing Along the United States-Mexico Border in the Baja California Region. *Pediatrics* 105 1-5.
- WHO, 2001, Revised international definitions in tuberculosis control. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5, 213-215.
- WHO 2006. Global tuberculosis control (Geneve, World Health Organization.).
- WHO 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the World. Fourth Global Report. In Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002–2007, The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (WHO/UNION), ed. (Geneva, World Health Organization).
- WHO 2009. Global tuberculosis control: Epidemiology, strategy and financing (Geneve, World Health Organization), p. 303.
- Wills, C.A., Ostler, W.K. 2001. Ecology of the Nevada Test Site: An Annotated Bibliography (Bechtel, Nevada), p. 386.
- Yugueros Marcos, J., Cascón Soriano, A., Sánchez Salazar, M., Hernanz Moral, C., Suárez Ramos, S., Smeltzer, M.S., Naharro Carrasco, G., 1999, Rapid Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *aroA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology.* 37, 570-574.
- Yugueros, M.J., Cascón-Soriano, A., Sanchez-Salazar, M., 1999, Rapid identification and tipping of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37, 570-574.

ANEXOS

Anexo 1. Estudio Epidemiológico de tuberculosis


TB 04-I

ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE TUBERCULOSIS

I

DATOS DE IDENTIFICACION DEL PACIENTE

Afiliación Folio

NOMBRE: _____ CURP:

Apellido Paterno Apellido materno Nombre (s)

FECHA DE NACIMIENTO: ESTADO: _____ JURISDICCION: _____

(de nacimiento) (de nacimiento) (de nacimiento)

MUNICIPIO: _____ EOAD: SEXO: M F

(de nacimiento) Años Meses Días

OCCUPACION: _____

ESCOLARIDAD: _____

(Actual o ultimo año aprobado)

RESIDENCIA ACTUAL

Calle y Número _____ Colonia _____ Estado _____ Jurisdicción Sanitaria _____

Municipio _____ Localidad _____

TIPO DE MUNICIPIO: Municipio prioritario TB Municipio población indígena Municipio muy alta migración

Municipio de alta marginación Municipio migración Municipio arranque parejo en la vida

TIEMPO DE RADICAR EN DOMICILIO ACTUAL: Menos de 1 año De 1 a 5 años Más de 5 años

II

DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE

Clave de la Unidad _____ Estado _____ Jurisdicción Sanitaria _____ Municipio _____ Localidad _____

Institución _____ Nombre (Hospital, Clínica, Centro de Salud, Otros) _____

Nombre del Médico Notificante _____ Unidad de Adscripción _____

III

DATOS CLINICOS

Fecha de inicio de signos y síntomas

Signos y síntomas: _____

Método de diagnóstico: 1 = Baciloscopia, 2 = Cultivo, 3 = Histopatología, 4 = Clínico, 5 = Radiológico, 6 = Epidemiológico, 7 = Clínico Epidemiológico, 8 = Otros, 9 = Ignorado

LABORATORIO Y GABINETEZ

ESTUDIO	RESULTADOS	Fecha de solicitud Día/ Mes / Año	Fecha de resultado Día/ Mes / Año
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

1 = Baciloscopia, 2 = Cultivo, 3 = Histopatología, 4 = Rx de tórax, 5 = TAC de cráneo, 6 = PCR, 7 = Citoquímico de LCR, 8 = Otros.

Especifique: _____

Resultado de baciloscopia: 1 = BK + (una cruz), 2 = BK ++ (dos cruces), 3 = BK +++ (tres cruces), 4 = BK - (Negativo), 5 = Positivo, 6 = No se realizó, 7 = Muestra inadecuada, 8 = De 1 a 9 bacilos, 9 = Ignorado.

Resultado de cultivo y PCR: 1 = Positivo, 2 = Negativo, 9 = Ignorado.

Resultado para Rx de Tórax, TAC de cráneo, Histopatología y Citoquímico de LCR: 1 = Con datos sugestivos de TB, 2 = Sin datos sugestivos de TB, 9 = Ignorado.

Resultado de otro: 1 = Positivo, 2 = Sugestivo, 3 = Negativo.

Anexo 2. Genes de resistencia a fármacos de primera y segunda línea de Mycobacterium tuberculosis.

<i>Antibiótico</i>	<i>Gen</i>	<i>Iniciadores</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño del producto</i>
Rifampicina	<i>rpoB 1</i>	<i>rpoB F</i>	5_AGCGGATGACCACCCAGGAC_3	266pb
		<i>rpoB R</i>	3_TCAGGGGTTTCGATCGGGCA_5	
Isoniacida	<i>katG 1</i>	<i>katG F</i>	5_GCAGATGGGGCTGATCTACG_3	555pb
		<i>katG R</i>	3_AACTCGTCGGCCAATTCCTC_5	
	<i>InhA</i>	<i>inhA F</i>	5_AGGTCGCCGGGTGGTCAGC_3	517pb
		<i>inhA R</i>	3_AGCGCCTTGGCCATCGAAGCA_5	
Pirazinamida	<i>pncA</i>	PR9 F	5_GGCGTCATGGACCCTATATC_3	670pb
		PR10 R	3_CAACAGTTCATCCCGGTTTC_5	
Estreptomicina	<i>rpsL</i>	<i>rpsL F</i>	5_GTCAAGACCGCGGCTCTGAA_3	272pb
		<i>rpsL R</i>	3_TTCTTGACACCCTGCGTATC_5	
	<i>rrS</i>	PR13 F	5_AAACCTCTTTCACCATCGAC_3	552pb
		PR30 R	3_CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG_5	
Etambutol	<i>embB</i>	<i>embB F</i>	5_CGGCATGCGCCGGCTGATTC_3	259pb
		<i>embB R</i>	3_TCCACAGACTGGCGTCGCTG_5	
Oxaflaxina	<i>GyrA</i>	GYRAF	5'-CCGGATCGAACC GGTTGAC-3'	427 pb
		GYRAR1	5'-CCATGCGCACCAGGCTGT-3'	
		GYRAR2	5'-GTTAGGGATGAAATCGACTG-3'	
Kanamicina	<i>rrs</i>	RRSF	50-GTGAGATGTTGGGTTAAGTCC-30	481 pb
		RRSR1	50-GTTACCGACTTTCATGACGT-30	
		RRSR	50-TGGTGCTCCTTAGAAAGGAG-30	