

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS EN**  
**BAJA CALIFORNIA**

**T E S I S**

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

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**ROSA ALEJANDRA GARCÍA ORTIZ**

ENSENADA, B.C., MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

MAESTRIA EN CIENCIAS DE ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS EN  
BAJA CALIFORNIA”**

TESIS

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

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

**ROSA ALEJANDRA GARCÍA ORTIZ**

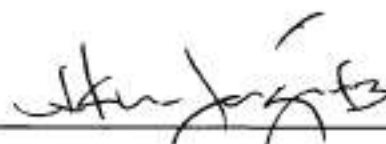
Aprobada por:



DRA. RAQUEL MUÑIZ SALAZAR  
DIRECTORA DE TESIS



DRA. PATRICIA RADILLA CHÁVEZ  
SINODAL



DR. LUIS M. ENRIQUEZ PAREDES  
SINODAL

## RESUMEN

---

La tuberculosis es uno de los principales problemas de salud pública en México, siendo Baja California el estado con la mayor tasa de prevalencia (57 casos/100,000) en todo el país. En los últimos años se han utilizado marcadores moleculares para identificar la especie infectante, determinar la diversidad y el origen genético del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El objetivo de esta investigación fue determinar las características genéticas de aislados microbiológicos del complejo *M. tuberculosis* de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con tuberculosis en Baja California, en el periodo de Octubre 2009 a Abril del 2011. En total se colectaron 323 aislados clínicos, sin embargo, solo se obtuvo información epidemiológica de 210 pacientes. El promedio de edad de los pacientes fue de 36 años ( $\pm 13.7$ ), siendo el sexo masculino el predominante (67%). El 2% de las muestras clínicas fueron identificadas como *M. bovis* y el resto como *M. tuberculosis*. En total se identificaron 11 linajes, siendo el linaje de América Latina y Mediterráneo (LAM, 22.5%) el predominante, seguido del linaje S (15.0%) y Haarlem (14.6%). El 14.6% de los aislados, fueron clasificados como únicos o huérfanos, lo que sugiere que son genotipos endémicos de la región. El linaje LAM fue el que agrupó el mayor número de casos nuevos y mayor número de pacientes con alcoholismo. La tasa de transmisión en total indicó que el 55.3% de los casos con TB se contagiaron recientemente, mientras que el resto fue por reactivación. Sin embargo, los linajes con la mayor tasa de transmisión fue Cameroon (78.9%) y Ghana (75.0%). El 12.5% de los genotipos identificados y el 71.4% de los linajes fueron iguales a los reportados en San Diego, California. La variedad de linajes y la identificación de cepas únicas sugieren una alta diversidad genética entre los aislados de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en la región de Baja California.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the main problems of public health in Mexico, and Baja California the state with the highest prevalence rate in all of Mexico. In recent years have used molecular markers to identify the infecting species, determine the diversity and the genetic origin of the *M. tuberculosis* complex. The objective of this research was to determine the genetic characteristics of microbiological isolates of the *M. tuberculosis* complex of clinical samples of patients diagnosed with tuberculosis in Baja California in the period from October 2009 to April 2011. In total we collected 323 clinical isolates of patients diagnosed with TB in Baja California. However, only epidemiological information was obtained from 210 patients. The average age of the patients was 36 years ( $\pm 13.7$ ), being the male predominant (67 %). The 2% of the clinical samples were identified as *M. bovis* and the rest as *M. tuberculosis*. In total 11 lineages were identified, being the lineage LAM the predominant (22.5 %), followed by the lineage S (15.0 %) and Haarlem (14.6%). We identified 14.6 % of isolates as unique or orphans, suggesting that genotypes are endemic in the region. LAM lineage showed the largest number of new cases and a greater number of patients with alcoholism. The rate of transmission in total indicated that 55.3 % of the cases were infected with TB recently, while the rest was for reactivation. However, the lineages with the highest rate of transmission was Cameroon (78.9%) and Ghana (75.0%). The 12.5% of the genotypes and 71.4% of the lineages identified were equal to those reported in San Diego, California. The variety of lineages and the identification of strains suggest a high genetic diversity among isolates of *M. tuberculosis* and *M. bovis* in the region of Baja California.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A mis padres por su apoyo incondicional y por ser los promotores que me impulsan a seguir superándome, tanto personal como profesionalmente.

A la Dra. Raquel Muñoz Salazar, mi directora de tesis, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y por su apoyo académico durante la realización de la tesis.

A mis sinodales la Dra. Patricia Radilla y el Dr. Luis Enríquez por todo su apoyo y guiarme en el análisis de datos.

Agradezco al Dr. Rafael Laniado Laborin por facilitarnos las muestras y a las personas que contribuyeron en la toma de muestras, Francisco Casillas y Aurora Arreola.

A mis compañeros del Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular, Norma Martínez, Jorge Luna, Sandra Moreno y Eduardo Sandoval por su apoyo en el procesamiento de muestras, por las sugerencias y consejos que contribuyeron en el desarrollo de la tesis, pero sobre todo gracias por hacer más placentero el trabajo de laboratorio.

A Nelva Victoria por su apoyo en la estandarización de la metodología, por sus cuestionamientos y consejos irónicos que casi siempre eran acertados, pero sobre todo agradezco su amistad.

A Gonzalo Robles por su apoyo, paciencia y por los momentos de convivencia que hicieron mi tiempo más agradable.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría otorgada número 305203.

Esta investigación fue realizada con financiamiento de los proyectos:

Estudio genético de cepas farmacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*  
en Baja California.

14<sup>a</sup> Convocatoria Interna UABC (2010-2011) Programa No. 4276.

Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en la frontera  
Noroeste México-Estados Unidos.

CONACyT-Ciencia Básica 2011, No. 166624.

## INDICE

---

01. INTRODUCCIÓN .....	1
02. ANTECEDENTES .....	6
03. HIPÓTESIS .....	26
04. OBJETIVOS .....	27
4.1 Objetivo general .....	27
4.2 Objetivos específicos .....	27
05. METODOLOGÍA .....	28
5.1 Diseño y tamaño de muestra .....	28
5.2 Población de estudio y obtención de muestras .....	28
5.3 Estudio epidemiológico .....	37
5.5 Estudio microbiológico (aislamientos) .....	29
5.6 Análisis Molecular .....	30
5.6.1 Extracción de ADN .....	30
5.6.2 Identificación molecular de especie .....	31
5.6.3 Genotipado con MIRU-VNTR .....	32
5.6.4 Análisis de genotipos .....	34
06. RESULTADOS .....	39
6.1 Análisis molecular .....	39
6.1.1 <i>Identificación molecular de especie infectante</i> .....	39
6.1.2 <i>Análisis de genotipo (MIRU-VNTR)</i> .....	40
6.1.4 <i>Genotipos</i> .....	41
6.1.5 <i>Complejos clonales</i> .....	49
6.1.6 <i>Comparación entre genotipos de Baja California y San Diego, EE.UU.</i> .....	52
6.1.7 <i>MIRU-VNTR plus vs SITVIT</i> .....	57
6.2 Estudio epidemiológico .....	63
6.2.2 Variables sociodemográficas .....	63
6.2.2.1 <i>Edad y Sexo</i> .....	63
6.2.2.2 <i>Lugar de nacimiento y de residencia</i> .....	64



6.2.2.3 Ocupación y escolaridad.....	68
6.2.3 Variables clínicas .....	70
6.2.3.1 Baciloscopía.....	70
6.2.3.2 Tipos de caso de ingreso y egreso de tratamiento .....	70
6.2.3.3 Esquema y tiempo de tratamiento .....	73
6.2.3.4 Enfermedades asociadas .....	77
6.2.3.4.1 Enfermedad asociada vs tipo de egreso.....	78
6.2.3.5 Localización de la tuberculosis .....	79
6.3.1 Relación de los linajes identificados con variables clínicas .....	79
6.3.2.2 Relación entre linajes y variables sociodemográficas .....	80
07. DISCUSIÓN .....	86
8. CONCLUSIONES .....	111
9. RECOMENDACIONES.....	114
10. REFERENCIAS.....	115
11. ANEXOS .....	133

## INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Condiciones de temperatura de las reacciones de PCR para cada uno de los 12 loci de MIRU-VNTR amplificados. ....	33
Tabla 2. Número de alelos y diversidad alélica determinados en este estudio y comparación con otros estudios.....	40
Tabla 3. Genotipos idénticos (clúster) en las muestras clínicas de las micobacterias analizadas. ....	43
Tabla 4. Genotipos únicos de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> . ....	45
Tabla 5. Genotipos únicos y agrupados identificados por linaje. ....	48
Tabla 6. Caracterización de aislados de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> dentro de complejos clonales (CC).....	50
Tabla 7. Comparación de genotipos y linajes de aislados de <i>M. tuberculosis</i> agrupados en cluster de Baja California y San Diego. ....	53
Tabla 8. Aislados de <i>M. tuberculosis</i> con genotipos únicos identificados en Baja California y San Diego. *Linajes determinados con 12 loci de MIRU-VNTR. ** Linajes determinados con 12 loci de MIRU-VNTR y espoligotipado. Los valores en negritas, son aquellos genotipos en los que hubo diferencia en la asignación de linaje. ....	55
Tabla 9. Genotipos a los que se les asignó MIT's y linajes generados en la base de datos SITVIT comparados con los linajes reportados en la base de datos MIRU-VNTR plus.....	58
Tabla 10. Tipo de ingreso al tratamiento de acuerdo al sexo. ....	71

Tabla 11. Tipo de egreso al tratamiento de acuerdo al sexo.....	72
Tabla 12. Esquema de tratamiento de los 210 pacientes.....	73
Tabla 13. Relación entre esquema de tratamiento y tipo de egreso. ....	74
Tabla 14. Tiempo de tratamiento reportado en meses de los 210 pacientes estudiados.....	75
Tabla 15. Tipo de egreso de los 153 pacientes que recibieron tratamiento por seis meses o más meses.....	76
Tabla 16. Enfermedades asociadas que se reportaron en el momento de ingresar al tratamiento de tuberculosis.....	77
Tabla 17. Relación entre linajes y variables clínicas (n = 176).....	81
Tabla 18. Clústeres identificados dentro de los linajes y variables sociodemográficas por clúster.....	83

## INDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Electroforesis de la PCR multiplex del operon <i>mce-3</i> para la identificación de <i>M. bovis</i> (168 pb) y <i>M. tuberculosis</i> (337 pb). .....	39
Figura 2. Linajes distribuidos en Baja California, San Diego y México. ....	42
Figura 3. Edad en años de 210 pacientes analizados .....	64
Figura 4. Lugar de nacimiento de los pacientes a los que se les tomó muestra clínica comparado con los datos de INEGI .....	67
Figura 5. Ocupación de los pacientes estudiados (n = 210 pacientes). ....	68
Figura 6. Escolaridad de los pacientes a los que se les tomó muestra clínica (n = 210 aislados) .....	69
Figura 7. Enfermedades asociadas con respecto al tipo de egreso a tratamiento de tuberculosis .....	78
Figura 8. Distribución de linajes con respecto al tipo de ingreso, egreso y esquema de tratamiento.....	82
Figura 9. Distribución de linajes con respecto al lugar de residencia en Baja California .....	85

## LISTA DE ANEXOS

---

Anexo 1. Encuesta realizada para el estudio epidemiológico de tuberculosis	133
Anexo 2. Secuencias de los cebadores de los 12 loci MIRU.....	135
Anexo 3. Índice discriminatorio de Hunter-Gaston .....	136
Anexo 4. Glosario.....	137

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa producida por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que puede afectar cualquier tejido del organismo, tanto a seres humanos como a otros mamíferos (Lozano, 2002). La TB es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial después del VIH/SIDA; las últimas estimaciones indican que cerca de nueve millones de personas se encuentran infectadas y casi dos millones de muertes se generan al año en todo el mundo (OMS, 2012).

En México, la TB es un problema de salud pública que afecta principalmente a la población económicamente activa, tanto a hombres y mujeres, sin distinción de edades, pero se manifiesta principalmente en jóvenes y en edades medias de entre 15 a 44 años de edad. Se considera que una persona infectada que no recibe tratamiento puede infectar de 10 a 15 personas por año (Secretaría de Salud, 2001). Baja California es el estado que presenta la mayor tasa de incidencia de TB en México (42.7 por 100 mil hab.), la cual es tres veces mayor que la tasa promedio nacional (14.2 por 100 mil hab.) (Secretaría de Salud, 2012).

Los marcadores moleculares, en particular los denominados MIRU-VNTR (Mazars, et al., 2001, Supply, et al., 2000) o número variable de unidades interespaciadas de repetición en tándem micobacterianas, se ha utilizado en los últimos años para estudiar la dinámica de la transmisión de TB, así como las fuentes de infección y diseminación. Los MIRU-VNTRs son marcadores confiables, reproducibles y con un poder de discriminación entre las cepas muy alto (Allix-Béguet, et al., 2008a, Cowan, et al., 2002, Dickman, et al., 2010). Otro marcador molecular ampliamente utilizado es el espoligotipado, basado en la tipificación (presencia o ausencia) de 43 oligonucleótidos espaciadores dentro de un locus específico del cromosoma denominado región de “repeticiones directas” (DR) (Kamerbeek, et al., 1997). Sin embargo, este último tienen un bajo poder de resolución cuando se utiliza solo, pero su poder se incrementa al combinarlo con MIRU-VNTR (Demay, et al., 2012).

Estudios moleculares en los que se han empleado los marcadores antes mencionados indican que el complejo de *M. tuberculosis* presenta una clara estructura poblacional, con una amplia variedad de linajes, grandes diferencias en su distribución geográfica y también en sus características patobiológicas (p.e. desarrollo y dispersión de la farmacorresistencia). Los 10 principales linajes identificados por espoligotipado son: Africanum, Beijing, Bovis, CAS, EAI, Haarlem, LAM, S, T, and X (Demay, et al., 2012). Sin embargo, recientemente se reportó una nueva clasificación con base en 12 loci de MIRU-

VNTRs donde se establece que existen 7 principales linajes y 41 sublinajes (Hill, et al., 2012).

En México, las investigaciones para identificar los linajes predominantes y determinar la diversidad genética del complejo de *M. tuberculosis* solo se han realizado en el centro y sur del país, en los estados de Guerrero, Ciudad de México, Monterrey, San Luis Potosí y Veracruz (López, et al., 2013, Martínez, et al., 2013, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013), utilizando espologotipos y MIRU-VNTR. Los resultados de estas investigaciones reportan una gran variedad de linajes, donde LAM, Haarlem, T, X y EAI son los predominantes. Por otro lado, en San Diego, California, utilizando también espologotipado y MIRU-VNTR, se han identificado 13 linajes siendo EAI, LAM y Haarlem los linajes predominantes (Rodwell, et al., 2012). Todas estas investigaciones son de gran relevancia para el actual estudio, debido a que Baja California, es un estado fronterizo con un alto flujo migratorio, tanto del sur de a la frontera Norte de México y viceversa (Instituto Nacional de Migración, 2013).

Hasta el 2011, se tiene reportado que el 62% de los migrantes que provienen del sur de México llegan a residir a Baja California, principalmente a Tijuana y Mexicali, mientras que el 38% logra cruzar a EE.UU. Entre Baja California-California se registra aproximadamente 80 millones de cruces al año, lo que se traduce a 219,178 cruces por día. Diversos estudios en países como Inglaterra, Suecia, Noruega, España, Australia, Arabia y E.E.U.U. han



determinado que la inmigración de personas provenientes de países con alta incidencia de TB es un factor que contribuye a la propagación de la TB y el incremento de la diversidad genética de cepas de *M. tuberculosis* (Borrell, et al., 2010, Garfein, et al., 2010, Gilbert, et al., 2009, Massey, et al., 2013, Pareek, et al., 2011, Svensson, et al., 2011, Varghese, et al., 2013). Debido a lo anterior, se espera que en el estado de Baja California se registre una alta diversidad de linajes, los cuales correspondan a los que se han registrado en la región de San Diego, California y de los estados del centro y sur del país, de donde provienen la mayor cantidad de migrantes.

Otro aspecto importante relacionado con la problemática de la TB en el mundo, es el incremento en el número de casos de TB por *M. bovis* en humanos, bacteria que es la causa principal de la TB en bovinos. La infección por *M. bovis* es principalmente a través de la ingestión de leche sin pasteurizar o derivados de ésta (NOM-EM-017-ZOO-2005, 2005, Secretaría de Agricultura, 2005). En México, el 28% de la leche se comercializa sin pasteurizar para la preparación de quesos y derivados (NOM-EM-017-ZOO-2005, 2005, Secretaría de Agricultura, 2005). Otra vía de infección es la respiratoria, por exposición a microaerosoles cargados con bacilos, por lo que trabajadores de establos, rastros y veterinarios son considerados poblaciones de alto riesgo (Biet, et al., 2005, de Kantor, et al., 2010, Thoen, et al., 2006). En países desarrollados, la incidencia de TB por *M. bovis* en los humanos se ha reportado del 10 al 15%. Así también, se ha observado un aumento significativo en la incidencia de TB

causada por *M. bovis* en comunidades fronterizas de EE.UU. y México (Dankner, et al., 2000, de Kantor, et al., 2010, De la Rúa, 2006, Hlavsa, et al., 2008, Lari, et al., 2006, Mignard, et al., 2006, Olabisi, et al., 2008, Padilla, et al., 2011, Rodwell, et al., 2008, Wilkins, et al., 2008). La identificación molecular de la especie de *Mycobacterium* en los aislados microbiológicos clínicos es de gran importancia, debido a que permite aplicar el tratamiento farmacológico adecuado al paciente. La infección por *M. tuberculosis* es indistinguible de la causada por *M. bovis*, por lo que se deben de recurrir al cultivo, a las pruebas bioquímicas y a las técnicas moleculares para lograr el diagnóstico diferencial (Martínez, et al., 2011, Wayne, et al., 2000). Esto es importante debido a que en el tratamiento para *M. bovis* debe omitirse el uso de la pirazinamida, medicamento ante el que este organismo presenta resistencia de forma natural (Toledo, et al., 1999).

El presente estudio describe las características moleculares de las micobacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con TB en Baja California entre 2009 y 2011. La información generada aporta nuevo conocimiento en la problemática de la TB, tanto a nivel regional, nacional e internacional. Dicha información puede ser utilizada por los tomadores de decisiones para establecer políticas y estrategias para la detección, tratamiento y seguimiento oportuno de la TB de manera eficiente.

## 2. ANTECEDENTES

---

### Etiología

La TB es ocasionada por un grupo de micobacterias del orden Actinomicetales de la familia Mycobacteriaceae. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* está compuesto por las especies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG* y *M. microti*, así como de las recientemente reconocidas *M. canettii* y *M. caprae* (Secretaría de Salud, 2007). El género *Mycobacterium* comprende microorganismos estrictamente aerobios, bacilares, inmóviles, no capsulados y de lento crecimiento, siendo su principal reservorio los mamíferos (Kumate, et al., 2008).

La TB puede afectar a cualquier órgano o tejido, pero se le clasifica clínicamente en TB pulmonar (TB-P) y TB extrapulmonar, esta última incluye a la TB ganglionar, pleural, urogenital, osteoarticular, meníngea y miliar; siendo las dos últimas las de mayor gravedad. La TB-P es la forma más frecuente de infección y representa el 80-85% de los casos a nivel mundial y en México y (Lozano, 2002,Secretaría de Salud, 2007).

La TB se transmite principalmente por vía aérea, a través de la inhalación de las micobacterias expulsadas al toser, hablar o estornudar de personas

infectadas. Por otra parte, la vía de transmisión menos frecuente es por la ingestión de leche contaminada con micobacterias, o por contacto con animales infectados (Lozano, 2002, Secretaría de Salud, 2007).

## **Patogenia**

El contagio con TB inicia con la inhalación de los bacilos, los cuales se depositan en los alvéolos y son fagocitados por los macrófagos, desencadenando una respuesta inmunológica liberada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias. Los macrófagos reconocen y procesan dichos antígenos, mostrando esta información a los linfocitos T para que liberen linfocinas que ayudan a la transformación morfológica de los macrófagos en células especializadas llamadas células epiteliales y gigantes de Langhans, mismas que rodean a los bacilos dando lugar al granuloma tuberculoso. Después de un tiempo el granuloma se reblandece en su centro y deja un núcleo de necrosis caseosa, lo que finaliza el crecimiento bacteriano y después de un tiempo este termina por calcificarse. Esta respuesta del organismo es asintomática y no deja secuelas detectables, pero si queda memoria inmunológica desarrollada por los linfocitos B (Lozano, 2002). Si la lesión pulmonar continua creciendo, el centro caseoso del granuloma puede licuarse y vaciarse hacia el bronquio formando una caverna, así como diseminarse a órganos y tejidos (Kumate, et al., 2008). Las manifestaciones

clínicas que pueden presentarse son: tos seca, dolor torácico, fiebre, pérdida del apetito y de peso, debilidad, sudoración nocturna y anemia (Kumate, et al., 2008).

## **Enfermedades asociadas**

### **Binomio TB-VIH**

La coinfección TB-VIH, es un problema significativo de salud pública a nivel mundial, ya que las personas coinfectadas con TB-VIH tienen de 21 a 34 veces más probabilidades de desarrollar TB activa que las personas sin VIH (OMS, 2012). En el año 2011, se estimaron 1.1 millones de nuevos casos de coinfección TB-VIH en el mundo, de los cuales 430,000 personas murieron de VIH asociada a TB, equivalente a una de cada tres personas con VIH muere a causa de la TB (OMS, 2012). En México, hasta el 2012 se tienen registrados 14,062 casos con el binomio TB-VIH, siendo Jalisco el estado que presenta el mayor número de casos (1,958, 13.9%), seguido del Distrito Federal (1,699, 12.1%), Veracruz (1,468, 10.4%) y Baja California con 1,273 (9.1%) (Secretaría de Salud, 2013). La Organización Panamericana de la Salud (OPS) informó que la infección por VIH, al conducir a la declinación de linfocitos CD4, importantes para iniciar y mantener la respuesta inmune, afecta la presentación clínica y evolución de la TB, ya que promueve la progresión a enfermedad de

personas infectadas con TB, aumenta la mortalidad y la tasa de recurrencia por TB incrementando la demanda al sistema de salud (OPS, 2010).

### **Binomio TB-Diabetes Mellitus**

Cerca del 10% de los casos de TB a nivel mundial están relacionados con la Diabetes Mellitus (DM). En México, hasta el 2011 se reportó que el 20.9% (4,319) de los casos prevalentes con TB presentaban la coinfección TB-DM (Secretaría de Salud, 2012). El estado de Veracruz es el que presenta el mayor número de casos con el binomio TB-DM (567, 14.3%), seguido de Guerrero (341, 8.6%), Tamaulipas (339, 8.6%), Nuevo León (287, 7.2%), Oaxaca (213, 5.4%) y Baja California (184, 4.6%) (Secretaría de Salud, 2012). La coinfección TB-DM tiene importantes implicaciones en la salud, ya que las personas con diabetes tienen 2-3 veces más riesgo de presentar TB activa y tienen un mayor riesgo de muerte durante el tratamiento de la TB y de recaída después del tratamiento (OMS, 2011).

### **Epidemiología**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que la prevalencia a nivel mundial de TB es de 12 millones de casos, equivalente a 170 casos por cada 100 mil habitantes, 8.7 millones de casos

incidentes (125 casos por cada 100 mil hab.) y 1.4 millón de personas fallecieron (14 personas por cada 100 mil hab.) (OMS, 2012). Los cinco países que presentaron el mayor número de casos nuevos fueron India (2.2 millones), China (1 millón), Sur África (0.5 millones), Indonesia (0.45 millones) y Pakistán (0.41 millones). India y China son los países que presentaron la mayor prevalencia de 3.1 millones y 1.4 millones de casos, respectivamente, seguido de Indonesia (0.7 millones), pakistání (0.6 millones) y Sur África (0.4 millones). Respecto a la mortalidad, India presentó el mayor número de muertes con 0.3 millones de casos, seguido de Indonesia (65,000), Pakistán (59,000), China (47,000) y Sur África (25,000) (OMS, 2012). En EE.UU. hasta el 2012, se reportaron un total de 9,951 nuevos casos de TB, lo que representa una incidencia de 3.2 casos por cada 100,000 habitantes. De estos casos, el 63% (6,274) corresponden a personas nacidas en el extranjero; de estos últimos, el 20.8% (1,308) de los casos eran pacientes mexicanos distribuidos principalmente en los estados de California (37.5%, 490) y Texas (24.8%, 325) (CDC, 2012).

Baja California es el estado que presenta la mayor tasa de incidencia (42.7 por 100 mil hab.) y mortalidad (5.99 por 100 mil hab.) de TB en todo México, para ambos casos, la tasa es tres veces más que la tasa nacional (14.2 y 1.6 por 100 mil hab., respectivamente) (Secretaría de Salud, 2012). Los estados de Guerrero, Tamaulipas, Sonora, Nayarit, Sinaloa, Baja California Sur,

Veracruz y Tabasco son estados que también presentan altas tasas de incidencia y mortalidad.

En México, hasta el 2011 se han registrado 18,986 casos nuevos de TB en todas sus formas, en donde el 81.4% de los casos son de TB-P, de los cuales el 10.8% son menores de 20 años, 1.5% TB meníngea, 5.6% ganglionar y 11.4% otras formas. El 20.9% de los casos nuevos en todas sus formas están asociados a DM, 12.1% a desnutrición, 4.7% alcoholismo y el 7.4% a VIH/SIDA. El género masculino es el más afectado por esta infección en una razón 1.5:1, a una edad entre 15 a 54 años (Secretaría de Salud, 2012).

## **Migración**

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). De acuerdo al INEGI (INEGI, 2011), Baja California presenta una población total de 3,155,070 habitantes, de los cuales el 53.4% (1,685,113) nacieron en la entidad y el 41.2% (1,299,733) nacieron en otra entidad, principalmente de los estados de Sinaloa (7.6%), Jalisco (4.5%), Sonora (3.9%), Distrito Federal (2.8%), Veracruz (2%), Chiapas (1.7%) y Guerrero (1.6%), mientras que el 3.6% (114,009) nacieron en EE.UU. Hasta el 2012 se tiene registrado que 11.9 millones de mexicanos residen en



EE.UU., siendo California el estado que alberga el mayor número de migrantes mexicanos con 4.4 millones, seguido de Texas con 2.6 millones.

## **Diagnóstico**

El método de diagnóstico para TB aplicado en México es la baciloscopía por tinción de Ziehl-Nielsen (OPS, 2008a). Esta técnica tiene la ventaja de ser simple, rápida y económica; no obstante, solo es eficiente en pacientes que presentan como mínimo 5 mil a 10 mil bacilos por mililitro de muestra clínica (OPS, 2008a). El cultivo microbiológico es el estándar de oro como diagnóstico de TB, siendo más sensible que la baciloscopía, ya que puede mostrar un mínimo de 10 a 100 bacilos presentes en una muestra, y además, permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. Sin embargo, tiene la desventaja de tardar entre seis a ocho semanas para su confirmación, lo que retrasa el inicio del tratamiento y ayuda a la propagación de la enfermedad (OPS, 2008b).

En los últimos años se han utilizado marcadores moleculares para el diagnóstico e identificación de especie de *Mycobacterium* spp., siendo más específicas, sensibles y rápidas que los métodos tradicionales. El gen *mtp-40* específico para *M. tuberculosis* y el fragmento de ADN de 500 pb específico para *M. bovis*, fueron utilizados para identificar entre estos dos patógenos (Del

portillo, et al., 1991, Rodríguez, et al., 1995). Sin embargo, la especificidad de estos métodos fue invalidada debido a que el gen *mtp-40* está presente en algunas cepas de *M. bovis* y el fragmento de ADN de 500 pb se localiza en algunas cepas de *M. tuberculosis* (Shah, et al., 2002, Weil, et al., 1996).

Recientemente, se determinó que *M. bovis* carece de un fragmento de 12.7 kb, el cual si se encuentra en *M. tuberculosis*. Este bloque de delección, involucra a la mayor parte del operon *mce-3*, lo cual puede estar relacionado con la virulencia en estas dos especies (Bakshi, et al., 2005, Zumarraga, et al., 1999). Esta sección, ha sido utilizada exitosamente como marcador molecular para identificar y diferenciar rápidamente ambas especies.

## **Caracterización molecular**

### **RFLP-IS6110**

Los primeros estudios para identificar los genotipos en *M. tuberculosis* se realizaron mediante la técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del elemento de inserción IS6110 (RFLP-IS6110) (Cave, et al., 1991). Dicho elemento se caracteriza por estar presente en múltiples copias y en distintas regiones del genoma del complejo *Mycobacterium*. Sin embargo, se requiere grandes cantidades de ADN, es difícil de comparar entre laboratorios (Van embden, et al., 1993) y tiene la desventaja de tener un bajo

poder de discriminación entre cepas con bajas copias de *IS6110* (Cowan, et al., 2002, Kremer, et al., 1999, Lee, et al., 2002).

### **Espoligotipado**

La tipificación por oligonucleótidos espaciadores (Espoligotipado o Spoligotyping) (Kamerbeek, et al., 1997, Molhuizen, et al., 1998) se basa en detectar la presencia o ausencia de 43 espaciadores que flanquean una región del elemento de inserción *IS6110* llamada de repetición directa (DR). Tiene la ventaja de ser un método de bajo costo, los resultados se pueden representar como datos digitales y pueden correlacionarse con otros marcadores genéticos, además es altamente reproducible y tiene un buen nivel de sensibilidad para diferenciar entre cepas. Sin embargo, tiene bajo poder de discriminación para diferenciar dentro de las grandes familias, tales como la familia Beijing (Driscoll, 2009).

### **MIRU-VNTR**

Los marcadores MIRU-VNTR (Mazars, et al., 2001, Supply, et al., 2000) representan una estrategia de genotipado 100% reproducible, sensible y específica, con un alto poder de discriminación entre las cepas del complejo *M. tuberculosis*, aun tratándose de cepas del genotipo de Beijing (Allix-Béguec, et

al., 2008a, Cowan, et al., 2002, Mazars, et al., 2001, Oelemann, et al., 2007, Supply, et al., 2001, Supply, et al., 2000). Se encuentran dispersos en 41 regiones del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv, de los cuales 12, 15 y 24 son altamente polimórficos (Supply, et al., 2006). Se caracterizan por tener un tamaño 51 a 77 pb de longitud, son polimórficos en el número de repeticiones en tándem y a nivel de secuencia entre las unidades de repetición. Los genes que flanquean los MIRU están involucrados en diversas vías metabólicas que incluyen lípidos, ácidos nucleicos, biosíntesis o degradación de proteínas, producción de energía y la transducción de señales (Supply, et al., 2000). El método de MIRU-VNTR es el más utilizado en la actualidad para la caracterización genética en aislados del complejo *M. tuberculosis*; incluso para aquellas cepas con un número reducido de copias del elemento IS6110. Tiene la gran ventaja de ser un procedimiento automatizado y para el que se cuenta con bases de datos de acceso público que permiten el análisis y la comparación de resultados en forma rápida y precisa (Allix-Béguet, et al., 2004, Mazars, et al., 2001, Supply, et al., 2001). Diversas investigaciones han utilizado los MIRU-VNTR para estudios genéticos y epidemiológicos, así como para analizar cambios evolutivos en las poblaciones de patógenos y para darle seguimiento a los brotes infecciosos de *M. tuberculosis* (Allix-Béguet, et al., 2004, Supply, et al., 2001). Asimismo, se han empleado para detectar infecciones de TB por múltiples cepas, para identificar contaminación cruzada en laboratorios, determinar el origen y dispersión de las cepas (Allix-Béguet, et al., 2004, Dickman, et al., 2010, Wirth, et al., 2008).

## Bases de Datos

Con el objetivo de comparar resultados entre laboratorios se han creado bases de datos internacionales, como MIRU-VNTR plus® (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) y SITVIT2® ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE)), esta última es administrada por el Instituto Pasteur de Guadalupe e incluye 7,105 patrones de espigotipado que corresponden a 58,180 aislados clínicos provenientes de 153 países. Se describen 2,740 espigotipos internacionales (SIT), que incluyen 58,816 aislados agrupados y 4,365 aislados huérfanos, es decir genotipos que solo han sido reportados una vez en el mundo. Por otro lado, contiene 2,379 patrones de 12 MIRU-VNTR de 8,161 aislados clínicos provenientes de 87 países, los cuales se encuentran agrupados en 847 tipos internacionales de MIRU (MIT) que incluyen 6,626 aislados agrupados y 1,533 huérfanos (Demay, et al., 2012).

La distribución mundial de los SIT y MIT se determinó considerando ocho regiones. Europa y América del Norte que representan el 65.5% de los aislados analizados. África, Asia de extremo Oriente, Oriente Medio, Asia central y América Sur representa del 6.5% a 8.3%, mientras que América Central y Oceanía están insuficientemente representadas, con 3.6% y 1.1% (Brudey, et al., 2006). Los espigotipos huérfanos representan el 34.5% en Europa, 30% en América (14.9% del Norte y 13.5% del Sur), 23% en Asia y 11.7% en África.

De los patrones de MIRU huérfanos el 54.1% se encuentran en Europa, 22.9% en América (17% del Norte), 15.3% en Asia y <4% en África y Oceanía (Demay, et al., 2012).

La base de datos MIRU-VNTR *plus*® incluye 186 aislados que representan a los linajes predominantes del complejo *M. tuberculosis*. Permite analizar y comparar genotipos basados en 12 MIRU-VNTR así como sets de 15 y 24 loci, espoligotipos, SNP´s, IS6110 entre otros, de forma individual o combinados. Las herramientas para la exploración de los datos incluye búsqueda de similitud, creación de árboles filogenéticos y de mínima expansión, y mapeo de información geográfica (Allix-Béguet, et al., 2008b, Weniger, et al., 2010).

### **Distribución mundial de los principales linajes**

Se ha reportado una alta diversidad de linajes por espoligotipado y MIRU-VNTR, siendo los linajes LAM, Beijing, EAI, Haarlem, S, X, Dehli/CAS y Bovis los reportados por ambos marcadores; los linajes T, AFRI y MANU son determinados exclusivamente por espoligotipado, mientras que los linajes Ghana, Cameroon, NEW-1, Uganda I, Uganda II, TUR y URAL son determinados por MIRU-VNTR.

En América del Norte se han reportado todos los linajes, mientras que en Europa los linajes predominantes son T y Haarlem. África, América Central, Europa y América del Sur, coinciden en la presencia de Haarlem, LAM y T como los principales linajes. En Asia los linajes predominantes son Beijing, EAI y CAS (Demay, et al., 2012). El linaje Latinoamericano y del mediterráneo (LAM) representa cerca del 50% de los casos con TB en América del Sur (Demay, et al., 2012), mientras que en Venezuela (65%), en el Mediterráneo y en la región del Caribe es el linaje predominante (Brudey, et al., 2006). El linaje T se ha determinado en todos los países, pero es predominante en Europa y Asia Occidental con 35% de los casos de TB, en América del Norte y del Sur representa el 20% y 27% de los casos, respectivamente (Demay, et al., 2012). El linaje Haarlem es el segundo linaje más representativo de Europa, identificado en 24% de los casos con TB. En América del Norte y del Sur representa alrededor del 20% y 16% de los casos, respectivamente (Demay, et al., 2012). El linaje S es más frecuente en el Norte de África en 8% de los casos, mientras que en Sur de África y Sur de Europa representa el 6% de los casos, respectivamente (Demay, et al., 2012). El linaje X es altamente prevalente en América del Norte y América Central (22% y 12%) (Brudey, et al., 2006); particularmente en Estados Unidos y el Caribe (8.2%). En África del Sur representa el 17% de los casos (Demay, et al., 2012).

El linaje Beijing es predominante en el Centro, Este y Sureste de Asia representando el 50% de los casos con TB. En América del Norte representa

alrededor del 20% de los casos (Demay, et al., 2012). El linaje del Este de África y la India (EAI) es prevalente en el Norte de Europa, Sur y Sureste de Asia, identificado en 25%, 37% y 33% de los casos, respectivamente (Demay, et al., 2012); particularmente es predominante en Filipinas, Malasia, Myanmar, Vietnam y Tailandia (Brudey, et al., 2006). El linaje CAS se localiza en el Medio Oriente y Asia Central, específicamente en el Sur de Asia, causante del 21% de los casos con TB y preferentemente reportado en la India en el 75% de los casos. También ha sido reportado en regiones como Pakistán e Irán, África, América y Oceanía (Brudey, et al., 2006). El linaje MANU es uno de los linajes recientemente descritos y es originario de la India (Brudey, et al., 2006).

Los linajes Cameroon y Uganda I, II, han sido reportados en América del Norte (Canada, EE.UU.), África y en Uganda (Christianson, et al., 2010, Nabyonga, et al., 2011, Rodwell, et al., 2012). El linaje de Ghana es predominante en África, pero se ha identificado tanto en Europa como en América (Wirth, et al., 2008). Los linajes NEW-1, TUR y URAL, también han sido reportados en Canadá y Estados Unidos así como en Alemania (Christianson, et al., 2010, Nabyonga, et al., 2011, Rodwell, et al., 2012).

## **Epidemiología molecular**

La epidemiología molecular se ha desarrollado a partir de la integración de la biología molecular en la investigación epidemiológica. Dicha ciencia tiene



como objetivo el estudio de los factores de riesgos genéticos y ambientales de nivel molecular en la etiología, la distribución y la prevención de las enfermedades. Puede abarcar estudios descriptivos y analíticos para evaluar las interacciones huésped-ambiente en la enfermedad; investigaciones sobre estrategias de control de las enfermedades de origen bacteriano a través del diagnóstico molecular y localización de individuos susceptibles mediante programas genéticos de detección aplicados a la prevención de enfermedades (OPS, 1994). Las técnicas moleculares como el espoligotipado y MIRU-VNTR permiten identificar el linaje y genotipo de las cepas de *M. tuberculosis*. Por otra parte permiten identificar infecciones de TB por reactivación o infección exógena; aspecto importante para el control y prevención de la enfermedad (Cardoso, et al., 2011).

Diversas investigaciones han identificado los linajes y la diversidad genética para determinar el origen de las cepas circulantes. Por ejemplo, Nabyonga et. al. (2011), analizaron 113 aislados de *M. tuberculosis* en Kampala, Uganda por medio de 15 MIRU-VNTR. Se identificaron 94 genotipos agrupados en diez linajes, siendo Uganda I y Uganda II los predominantes. El 26% (29) de los aislados fueron únicos de la región, al no estar reportados en la base de datos de referencia (MIRU-VNTR *plus*). Se reportó una tasa de transmisión recientes de 17% y un índice de discriminación de 0.996 (Nabyonga, et al., 2011).

En República de Georgia, se analizó con el set de 24 MIRU-VNTR y espoligotipado la propagación de la TB multirresistente asociada al linaje Beijing. Entre los 182 aislados de *M. tuberculosis* analizados el linaje predominante fue Beijing, seguido de LAM, Ural y Haarlem. Un total de 62 genotipos fueron únicos de la región denominados "Georgia-H37RV-like". Todos los linajes presentaron resistencia tanto a isoniacida, como a estreptomycin. Para los linajes Beijing, Ural y "Georgia-H37RV-like" se reportó resistencia a rifampicina. Solo los linajes Ural y Beijing resultaron multirresistencia, siendo este último el que presentó el mayor número de aislados. En total se obtuvieron 22 genotipos en cluster y 97 únicos (Niemann, et al., 2010b).

En un estudio realizado en Corea del Sur, se determinó la diversidad genética con 24 MIRU-VNTR y espoligotipado de 208 aislados donde el 97.1% fueron genotipos del linaje Beijing, de estos, el 30.3% (63) presentaban multirresistencia (MDR) y el 9.6% (20) TB extremadamente resistente (XDR), corroborando la asociación del linaje Beijing y la farmacoresistencia. El análisis con MIRU-VNTR, generó 25 genotipos en cluster con una tasa de agrupamientos de 22.3% y 35 genotipos únicos. El 60% (12) fueron aislados XDR y 34.9% (22) MDR (Chola, et al., 2010).

En San Diego, California se determinó la diversidad genética en 832 aislados de *M. tuberculosis* utilizando espigotipado y MIRU-VNTR, se identificaron 446 genotipos y una tasa de transmisión de 46%. En total se identificaron 13 linajes, siendo EAI, LAM y Haarlem los predominantes (Rodwell, et al., 2012). Otro estudio en Canadá, evaluó 650 aislados clínicos con TB, el poder de discriminación de los diferentes set de locus MIRU-VNTR (12, 15 y 24), donde el set de 12 locus identificó 150 genotipos únicos con un índice de discriminación de 0.895 y una tasa de agrupamiento de 75.7%, con el set de 15 locus se identificaron 232 genotipos únicos, un índice de discriminación de 0.917 y una tasa de agrupamiento de 64.3%, a diferencia de 247 genotipos únicos identificados con el set de 24 locus, un índice de discriminación de 0.920 y una tasa de agrupamiento de 62%. Respecto a los linajes identificados, el set de 12 loci reportó el mayor número de linajes múltiples 282 vs 1 con el set de 24 loci mientras que con ambos sets el linaje S fue el predominante. Por lo tanto, se consideró que la metodología de 15 locus es un método altamente discriminatorio de primera línea para el genotipado de *M. tuberculosis* y se debe considerar como un reemplazo para el set de 12 locus (Christianson, et al., 2010).

Un estudio realizado en tres sitios del Caribe ( Guadalupe, Martinica y la Guayana Francesa) por un periodo de dos años, se identificaron molecularmente 176 casos positivos de TB. Utilizando la técnica de

espoligotipado se detectaron 76 genotipos, 30 en clúster y 46 únicos, mientras que por MIRU-VNTR se reportaron 97 genotipos, 24 en clúster y 73 únicos. Combinando ambos marcadores un total de 116 genotipos fueron identificados, 20 en clúster y 96 únicos. Los linajes LAM, Haarlem y T representaron el 73.3% de los aislados (Millet, et al., 2011).

Países como Honduras, Venezuela y Paraguay también han determinado la diversidad genética utilizando espoligotipado y MIRU-VNTR, donde LAM es el principal linaje identificado, seguido de Haarlem, T y X. El linaje Beijing fue reportado en los tres países con una distribución menor o igual al 0.5% (Abadía, et al., 2009, Candia, et al., 2007, Rosales, et al., 2010)

En México, diversas investigaciones realizadas en los estados de Monterrey, Guerrero, Ciudad de México, San Luis Potosí y Veracruz, han utilizado espoligotipos y MIRU-VNTR para determinar la diversidad genética de *M. tuberculosis*, identificando gran variedad de linajes, donde LAM, Haarlem, T, X y EAI son los predominantes (López, et al., 2013, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013).

### ***Mycobacterium bovis***

La especie *M. bovis* es el agente causal de la TB bovina que afecta con más frecuencia al ganado vacuno y a otros animales como los búfalos, alces y venados. Sin embargo es considerada una fuente potencial de casos de TB en

humano afectando los pulmones, ganglios linfáticos y otras partes del cuerpo (Milián, et al., 2010). La infección por *M. bovis* es clínica, radiológica y microscópicamente indistinguible de la TB causada por *M. tuberculosis* (Martínez, et al., 2011, Wayne, et al., 2000), lo que ocasiona un problema en la salud del paciente con TB, ya que *M. bovis* es resistente natural a pirazinamida un fármaco de primera línea aplicado en el tratamiento primario contra la TB (Toledo, et al., 1999), sin embargo se ha reportado que una subespecie de *M. bovis* llamada *caprae* si es susceptible a la pirazinamida (Aranaz, et al., 2003).

En países desarrollados, la incidencia de TB por *M. bovis* en los humanos se ha reportado del 10 al 15%. Así también, se ha observado un aumento significativo en la incidencia de TB causada por *M. bovis* en comunidades fronterizas de EE.UU. y México (Dankner, et al., 2000, de Kantor, et al., 2010, De la Rúa, 2006, Hlavsa, et al., 2008, Lari, et al., 2006, Mignard, et al., 2006, Olabisi, et al., 2008, Padilla, et al., 2011, Rodwell, et al., 2008, Wilkins, et al., 2008). Un estudio retrospectivo realizado en San Diego, California mostró un incremento en los casos registrados de TB por *M. bovis*, de 5% en 1994 al 11% en 2005. De estos >96% de los casos eran personas hispanas, de los cuales el 60% era de origen mexicano. (Rodwell, et al., 2008). En el periodo 2005 – 2008, en la misma localidad, el número de casos detectados como *M. bovis* fue del 10.4% y el resto como *M. tuberculosis* (Rodwell et. al. 2012). Un aspecto importante de resaltar es que en el estudio realizado por Rodwell et. al.

(2008), se determinó que las personas infectadas con *M. bovis* tenían 2.55 veces más probabilidad de morir durante el tratamiento, en comparación con las que se encontraban infectadas con *M. tuberculosis*.

### **3. HIPÓTESIS**

---

El alto índice de migración poblacional y la alta incidencia de tuberculosis en Baja California influyen en la transmisión de la enfermedad. Por lo que se espera que exista una alta diversidad genética en los aislados clínicos del complejo *M. tuberculosis* en la región.

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo general

Determinar las características genéticas de aislados microbiológicos de *Mycobacterium bovis* y *M. tuberculosis* de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con tuberculosis en Baja California en el periodo de Octubre 2009 a Abril del 2011.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Identificar molecularmente los aislados clínicos como *M. tuberculosis* o *M. bovis*.
2. Identificar y caracterizar molecularmente los linajes a los que pertenecen los aislados clínicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* utilizando 12 loci de minisatélites MIRU-VNTR.
3. Analizar la distribución de los linajes de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en la población de estudio.
4. Determinar la relación entre las características genéticas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* con las características epidemiológicas en la población de estudio.



## **5. METODOLOGÍA**

---

### **5.1 Diseño y tamaño de muestra**

Estudio cuantitativo, descriptivo, analítico, transversal, cuya finalidad es conocer la diversidad genética molecular de las micobacterias causantes de TB en la población que acude a clínicas de la Secretaría de Salud del Estado de Baja California. El muestreo se realizó a conveniencia, el tamaño de muestra fue de acuerdo al número de personas diagnosticadas con TB en las clínicas de la Secretaria de Salud de Baja California durante el periodo de Octubre 2009 a Abril del 2011.

### **5.2 Población de estudio y obtención de muestras**

Se colectaron durante 18 meses (Octubre 2009 a Abril del 2011), 309 muestras de aislados microbiológicos de muestras clínicas, correspondiente al mismo número de pacientes diagnosticados con TB en clínicas de la Secretaria de Salud en Baja California. Las muestras clínicas fueron referidas al Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California, del Hospital General de Tijuana (LETBC), en donde se realizó el análisis baciloscópico y el cultivo microbiológico. Posteriormente, se tomó una muestra de cada uno de los aislados clínicos y se trasladaron al Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular (LEEM) de la Escuela de Ciencias de la Salud, UABC Ensenada para su análisis molecular. 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), con el objetivo de obtener los datos sociodemográficos y clínicos existentes. Además, se obtuvo un oficio de colaboración por parte de la Secretaria de Salud, así como la aprobación del Comité de Bioética del Hospital General de Tijuana para la realización del proyecto. 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.

### **5.3 Estudio microbiológico (aislamientos clínicos)**

Las muestras positivas de la baciloscopía se cultivaron por duplicado en cultivo Löwenstein-Jensen (LJ), incluyendo la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv como control positivo, este estudio se realizó en el LETBC. 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 3,000 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 LJ. Uno de los dos tubos 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 durante ocho semanas, tomando nota del tiempo en que se desarrollaron en el medio LJ. 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).

#### **5.4 Análisis Molecular**

Se desarrolló en tres partes: 1) Extracción de DNA, 2) Identificación molecular para diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, 3) Determinación de genotipos, linajes y complejos clonales utilizando 12 loci de MIRUs.

##### **5.4.1 Extracción de ADN**

Se llevó a cabo directamente de los aislados clínicos colectados bajo condiciones de BSL3. La extracción se realizó utilizando 500 mg de la masa bacilar homogenizados con 100 µL solución de lisis (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl). Se incubó 15 min a 95 °C, después se centrifugó por 10 min a 6,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y etiquetado (Yugueros, et al., 1999). Por último, el DNA extraído fue almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis. La calidad y cantidad del DNA

se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 30 minutos con Gelstar (Cambrex®). Se utilizó una regla molecular como referencia para evaluar el tamaño y la concentración del DNA obtenido (Mass Ruler low range DNA Ladder, Fermentas, USA).

#### **5.4.2 Identificación molecular de especie**

Con el objetivo de identificar la especie de micobacteria, las muestras de DNA fueron analizadas mediante la amplificación de una región del operon *mce-3* (mammalian cell- entry, por sus siglas en inglés). La identificación molecular consistió en la amplificación de un fragmento de 337 pb que corresponde a la especie de *M. tuberculosis* y un fragmento de 168 pb correspondiente a *M. bovis* (Bakshi, et al., 2005). La amplificación se realizó mediante una PCR multiplex (mPCR), utilizando tres cebadores, un cebador cadena arriba (forward) para ambas especies y dos cadena abajo (reverse) específicos para cada especie. Las condiciones de la reacción se realizaron de acuerdo a las especificaciones del autor (Bakshi, et al., 2005) con algunas modificaciones. El volumen final de la reacción fue 10 µL, constituida de 5 a 20 ng de DNA, 0.4X de Buffer (Apex), 0.8 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Apex), 0.40 µM de cada cebador, 1X de BSA (BioLab), 0.05 U *Taq* DNA polimerasa (SIGMA®). El perfil de temperatura fue de un ciclo de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52.3 °C por 1.5 min y 72 °C por 1 min y un ciclo

final de 72 °C por 10 min. En todas las reacciones se incluyó la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG como controles positivos y como control negativo agua nanopura grado molecular. La calidad y cantidad de los productos amplificados se evaluó en geles de agarosa al 2% a 100 mV por 30 min, teñidos con Gelstar (Cambrex®). Para la identificación del tamaño del fragmento amplificado se utilizó una regla molecular (Mass Ruler low range DNA Ladder (Fermentas, USA).

#### **5.4.3 Genotipado con MIRU-VNTR**

Con el objetivo de caracterizar e identificar genéticamente los aislados clínicos, se utilizó un set de 12 loci de MIRU-VNTR (MIRU 02, 04, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40) diseñados por Supply *et al.* (2005,2001). Los cebadores de inicio fueron marcados con un fluorocromo específico (Anexo 2) y se amplificaron mediante reacciones de PCR siguiendo los protocolos reportados por Supply *et. al.* (Supply, 2005,2001) con algunas modificaciones. El volumen total de la reacción consistió de 15 µL, con 5 a 20 ng de DNA, 1X Buffer (Biorad), 0.12 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (BioRad), 0.4 µM de cada cebador, 0.05 U Taq DNA polimerasa (SIGMA®). El perfil de temperatura para cada uno de los MIRUs utilizados se describe en la Tabla 1. En todas las reacciones se incluyó la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* y *M. bovis* AN5 como controles positivos y como control negativo agua nanopura grado molecular.

**Tabla 1. Condiciones de temperatura de las reacciones de PCR para cada uno de los 12 loci de MIRU-VNTR amplificados.**

<b>MIRU 10, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40</b>		
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclo</b>
95 °C	3 min	1x
96 °C	50 s	33x
55 °C*	50 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1x
10 °C	∞	

*\*En los MIRU 02 y 04 la temperatura de alineación cambia a 58 °C.*

<b>MIRU 16</b>		
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclo</b>
95 °C	3 min	1X
96 °C	30 s	33X
48°C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1X
10 °C	∞	

La concentración de los fragmentos amplificados fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100 V por 30 min, teñidos con Gelstar (Cambrex®) y visualizados con luz UV con un marcador de peso molecular para cuantificación (MassRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use, 80-1031 bp, Fermentas). Los fragmentos amplificados se prepararon a una concentración de

2 ng/μL y se enviaron al laboratorio comercial SeqXcel Inc.

(<http://www.seqxcel.com>), en la ciudad de San Diego, California, EE.UU. donde fueron genotipadas mediante un secuenciador automático de DNA ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer.

#### **5.4.4 Análisis de genotipos**

El análisis de genotipos se realizó con el objetivo de determinar las características genéticas de los aislados de *M. tuberculosis* y *M. bovis* colectadas. Los cromatogramas obtenidos para cada locus MIRU-VNTR fueron analizados con el programa GeneMarker Software 1.71 (Softgenetics®) para asignar el tamaño de alelos. El tamaño de los alelos de los 12 loci MIRU-VNTR fueron convertidos a un código numérico (Allix-Béguet, et al., 2004, Supply, et al., 2001, Supply, et al., 2000) disponible en la Guía Técnica “Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of Mycobacterium tuberculosis Technical Guide” (Supply, 2005, Supply, et al., 2006).

El código numérico de cada uno de los genotipos fue analizado en dos diferentes bases de datos con el objetivo de asignar los linajes correspondientes:

1) MIRU-VNTR *plus*

<http://www.miruvntrplus.org/MIRU/index.faces>

2) SITVIT WEB

[http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/description.jsp](http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/description.jsp)

### **MIRU-VNTR *plus***

La asignación de los linajes se realizó utilizando la herramienta "similitud de búsqueda" que compara los genotipos con una colección de 186 genotipos del complejo *M. tuberculosis*, que representan los principales linajes a nivel mundial. Se construyó un dendograma con el algoritmo UPGMA con la distancia genética categórica para determinar las similitudes entre los aislados e identificar "genotipos únicos" y "genotipos idénticos" (clúster). Los genotipos únicos, son aquellos que solo están representados por un solo aislado y los clusters se definen como dos o más aislados de diferentes pacientes que presentan el mismo genotipo. Los aislados que no coinciden con algún otro reportado en la base de datos de MIRU-VNTR *plus* son considerados como genotipos No Definidos (Rodwell, et al., 2012).



Los clúster son el resultado de transmisión reciente, adquirido de persona a persona; mientras que los genotipos únicos son originados por reactivación de infecciones de TB latentes adquiridos en diferente tiempo y espacio (Small, et al., 1994). La tasa de transmisión fue calculada como: número de aislados en clúster menos el número de clúster entre el número total de aislados; toma valores de 0 a 1 ó de 0 a 100%, donde el valor de 0 representa casos de TB por reactivación y el valor de 1 representa casos por transmisión reciente (Nabyonga, et al., 2011, Tazi, et al., 2007).

La relación genética entre los genotipos fue analizada con un árbol de mínima expansión, generado en la base de datos MIRU-VNTR *plus*. Los genotipos fueron agrupados en complejos clonales, los cuales se definen como un grupo de aislados genéticamente relacionadas con no más de un locus MIRU-VNTR de diferencia entre ellos (Allix-Béguec, et al., 2008a, Rodwell, et al., 2012, Weniger, et al., 2010).

## **SITVIT WEB**

Cada genotipo fue comparado con 2379 MIT's (números internacionales de MIRU). Un MIT es asignado cuando un genotipo es idéntico a los reportados en la base de datos SITVIT, los genotipos que no coinciden son reportados como huérfanos (únicos).

#### **5.4.5 Poder de discriminación entre loci.**

El poder de discriminación de cada uno de los 12 loci de MIRU-VNTR, fue calculado con el Índice Discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) (Hunter, et al., 1988), el cual determina la capacidad de un método de tipificación de distinguir cepas no relacionadas genéticamente entre sí (Anexo 3).

Los loci que presentaron un valor de HGDI  $> 0.6$  fueron clasificados como altamente discriminante; los que presentaron valores entre  $> 0.3$  a  $< 0.6$  moderados y  $< 0.3$  se clasificaron con bajo poder de discriminación (Sola, et al., 2003).

#### **5.5 Estudio epidemiológico**

La información sociodemográfica y clínica de los pacientes permitió construir una matriz de 24 variables, la cual fue analizada con el programa Statistic 8.0 para determinar asociaciones entre las variables clínicas (baciloscopía, tipo de ingreso y egreso al tratamiento de TB, esquema y tiempo de tratamiento, enfermedades asociadas y localización de la TB); variables sociodemográficas (edad y sexo, lugar de nacimiento y residencia, ocupación y escolaridad) y variables moleculares (linaje, genotipos) (Anexo 2).

El análisis de baciloscopía se realizó en el LETBC utilizando la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos,

2003, Koch, et al., 1965) y los resultados fueron enviados al LEEM. Este análisis fue de rutina para todas las muestras clínicas referidas al LETBC.

## **5.6 Análisis epidemiológico molecular**

### **Análisis genético entre Baja California, San Diego y México**

Se realizó un análisis comparativo entre los genotipos reportados en este estudio, 5 estados de México (Monterrey, Guerrero, San Luis Potosí, Cd. México y Veracruz) y San Diego, California, los cuales utilizaron 12 y 15 MIRU-VNTR y/o espoligotipado (Rodwell, et al., 2012), con la finalidad de identificar la presencia de genotipos idénticos en ambas regiones.

### **Análisis entre características moleculares y epidemiológicas.**

Se analizó la asociación entre los linajes y genotipos y las características clínicas y sociodemográficas mediante un análisis de regresión logística ( $P < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS

---

En total se colectaron 323 aislados clínicos correspondientes al mismo número de pacientes, sin embargo, solo se logró extraer DNA de 309 aislados. Con respecto al genotipo, solo 213 muestras de DNA amplificaron los 12 loci MIRU-VNTR, y de estas, solo 176 muestras contaban con la información epidemiológica correspondiente.

### 6.1 Análisis molecular

#### 6.1.1 Identificación molecular de especie infectante

Se identificaron molecularmente 309 aislados, de los cuales el 2% (6) fueron *M. bovis* y el 98% (303) fueron *M. tuberculosis* (Fig. 1).



**Figura 1. Electroforesis de la PCR multiplex del operon *mce-3* para la identificación de *M. bovis* (168 pb) y *M. tuberculosis* (337 pb).**

E = escalera, C+T= control positivo de *M. tuberculosis*, C01, C02, C03 aislados clínicos identificados como *M. tuberculosis*; C+B=control positivo de *M. bovis* C04, C05 C06 aislados clínicos identificados como *M. bovis*, C- = control negativo (agua nanopura).

### 6.1.2 Análisis de genotipo (MIRU-VNTR)

#### Diversidad genética

El número total de alelos detectados por locus varió de 2 en MIRU-24 a 6 en MIRU-26 y MIRU-40. La diversidad alélica varió de 0.08 en el MIRU 24 a 0.73 en el MIRU 40 (Tabla 2).

**Tabla 2. Número de alelos y diversidad alélica determinados en este estudio y comparación con otros estudios.**

Locus (MIRU-VNTR)	Este estudio		Demay et al., 2012	Alonso et al., 2008	Sharma et al. 2008
	Número de alelos	HGDI	HGDI	HGDI	HGDI
40	6	0.73	0.55	0.73	0.81
10	5	0.63	0.51	0.68	0.84
26	6	0.52	0.48	0.46	0.89
16	6	0.51	0.42	0.45	0.84
23	4	0.47	0.26	0.65	-
31	4	0.43	0.43	0.36	-
4	4	0.36	0.24	0.21	0.58
2	3	0.27	0.13	0.23	-
27	5	0.26	0.14	0.13	-
39	4	0.24	0.16	0.09	0.76
20	3	0.16	0.14	0.16	-
24	2	0.08	0.03	0.06	-

### **6.1.3 Linaje**

#### ***MIRU-VNTR plus***

Los 213 aislados genotipados se distribuyeron en 11 linajes, siendo el linaje de América Latina-Mediterráneo (LAM) el predominante (22.5%). Se reportó el linaje Beijing en 5.6% de los aislados. El linaje X fue el menos frecuente, identificándolo en solo un aislado (0.5%). El 14.6% de los aislados no coincidió con ninguno de los genotipos reportados en la base de datos de referencia *MIRU-VNTR plus*, por lo que se les clasificó como linaje no definido. Estudios realizados en el centro y norte del país en los estados de Guerrero, Monterrey, Veracruz y Cd. de México, el linaje predominante es T, seguido de EAI y LAM (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013), mientras que en San Diego California el linaje más frecuente fue EAI (30.9%), seguido de LAM (16.9%) y Haarlem (15.1%) (Rodwell, et al., 2012) (Fig.2).

### **6.1.4 Genotipos**

Se identificaron 95 genotipos, 29 genotipos en clústeres (69%) (Tabla 3) y 66 genotipos únicos (31%) (Tabla 4). Cada clúster se encuentra formado por un mínimo de dos a un máximo de 20 aislados.

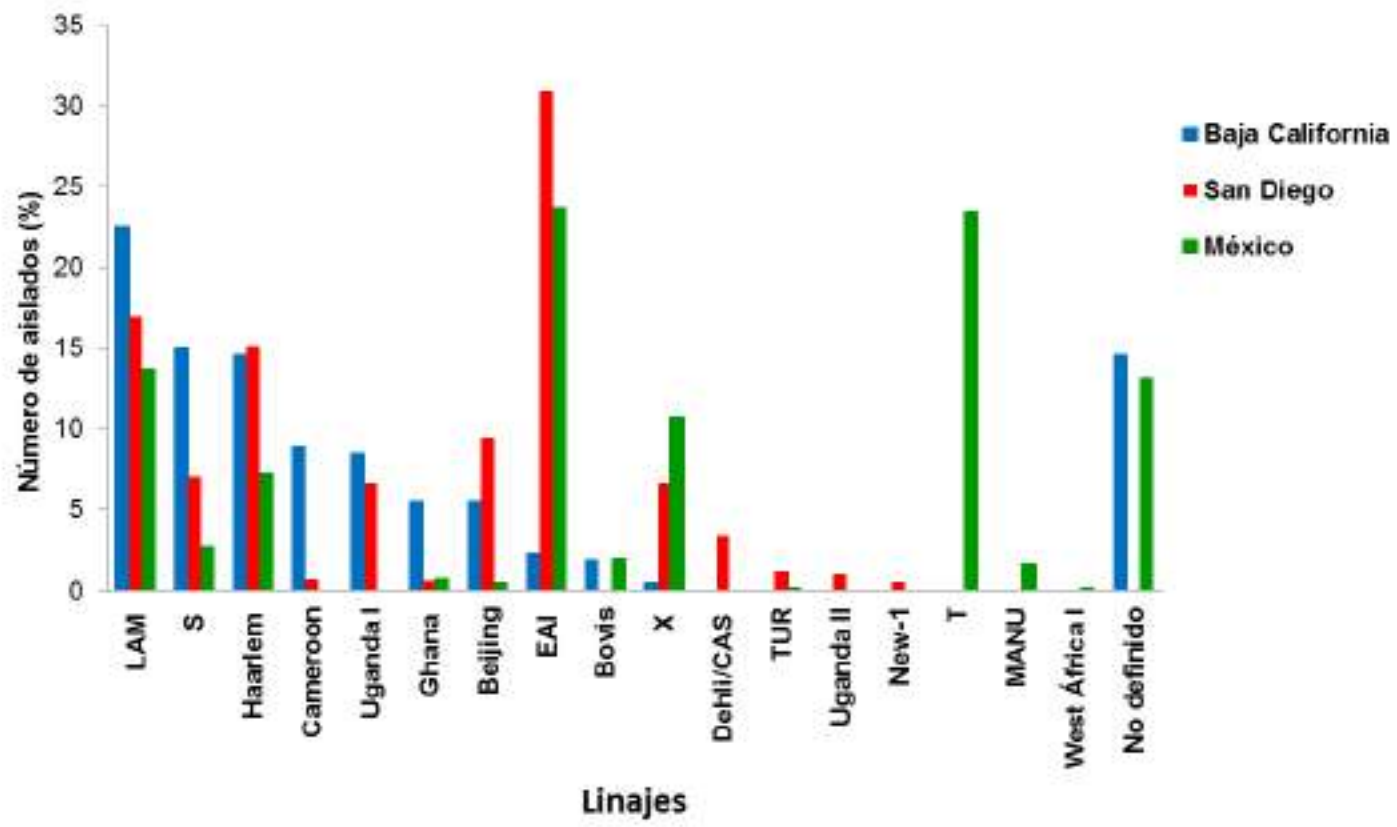


Figura 2. Linajes distribuidos en Baja California, San Diego y México.

**Tabla 3. Genotipos idénticos (clúster) en las muestras clínicas de las micobacterias analizadas.**

Número de Genotipo	Genotipo	Linaje	Aislados
1	124326163325	LAM	C73, C227, C320
2	224226133321	LAM	C274, C283, C292
3	224226143321	LAM	C12, C182
4	224226153321	LAM	C101, C110, C117, C157, C168, C170, C175, C181, C191, C209, C248, C252, C256, C258, C266, C284, C312, C317
5	224316163227	LAM	C265, C298
6	233325153324	S	C211, C319
7	234325153324	S	C34, C306
8	333325153222	S	C38, C47, C48, C67, C72, C102, C114, C167, C174, C178, C206, C218, C222, C226, C242, C246, C261, C277, C282, C310
9	224425153322	Haarlem	C279, C295
10	225323153325	Haarlem	C244, C251, C264, C276, C321
11	225325133324	Haarlem	C200, C224, C301
12	225325153322	Haarlem	C116, C189
13	225325153323	Haarlem	C83, C120, C169, C179, C180, C183, C185, C187, C240, C247, C269, C305, C308
14	223325153323	Cameroon	C46, C91, C93, C115, C119, C250, C296, C299, C300



15	225315153323	Cameroon	C87, C100, C103, C111, C186, C196, C214, C223
16	223325153223	Uganda I	C33, C86, C208
17	223325154322	Uganda I	C263, C278
18	223325154324	Uganda I	C45, C163, C164
19	223425153322	Uganda I	C190, C194, C237, C293
20	223325173533	Beijing	C197, C198, C280, C314, C315, C316
21	223325173534	Beijing	C22, C297
22	223325164333	Ghana	C57, C69, C122, C123, C160, C171, C184, C201, C285, C309
23	254326223422	EAI	C177, C235, C241
25	213425154322	No definido	C259, C304
26	223225153323	No definido	C195, C199, C245, C281
27	223425154322	No definido	C24, C207, C217, C313
28	224315143323	No definido	C155, C322
29	233423153323	No definido	C76, C233, C249, C257, C288
24	232224253322	Bovis	C94,C106,C118

**Tabla 4. Genotipos únicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.**

<b>Número de genotipo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Linaje</b>	<b>Aislado</b>
30	224226153322	LAM	C32
31	224236153321	LAM	C62
32	224226163321	LAM	C71
33	223226153221	LAM	C95
34	124326143225	LAM	C104
35	224225143321	LAM	C176
36	124126153224	LAM	C213
37	224325153224	LAM	C219
38	124316143323	LAM	C221
39	223226154321	LAM	C230
40	124316143322	LAM	C231
41	224326132323	LAM	C234
42	224325153214	LAM	C238
43	224326143323	LAM	C260
44	223226163221	LAM	C262
45	124126153222	LAM	C267
46	123326143224	LAM	C272
47	223226163321	LAM	C275
48	224226153313	LAM	C286
49	223226143321	LAM	C291
50	213325153324	S	C239
51	223325133324	S	C03
52	223325153324	S	C07
53	333225152222	S	C17
54	232325153325	S	C26
55	333325153324	S	C31
56	232325153324	S	C225
57	333325155222	S	C311
58	224535153322	Haarlem	C20
59	225325135323	Haarlem	C162
60	225325163322	Haarlem	C203
61	225325133323	Haarlem	C220
62	225225133323	Haarlem	C236

63	225313153323	Haarlem	C303
64	223322153323	Cameroon	C90
65	225315153324	Cameroon	C166
66	223325152422	Uganda I	C68
67	223324153223	Uganda I	C78
68	223425143322	Uganda I	C109
69	223325153322	Uganda I	C158
70	222325143223	Uganda I	C173
71	222425153522	Uganda I	C229
72	223325163532	Beijing	C23
73	223325153533	Beijing	C75
74	223325171531	Beijing	C121
75	223325153531	Beijing	C204
76	223325163333	Ghana	C172
77	223325164433	Ghana	C193
78	224326223432	EAI	C28
79	254326223432	EAI	C202
81	223325153325	X	C35
82	323225153323	No definido	C36
83	323325133323	No definido	C53
84	223425143323	No definido	C77
85	223425153323	No definido	C80
86	223225143323	No definido	C192
87	223325172324	No definido	C205
88	233426163323	No definido	C210
89	213425154422	No definido	C216
90	224325173344	No definido	C228
91	224315153322	No definido	C232
92	224325153323	No definido	C243
93	223225153324	No definido	C255
94	223425144322	No definido	C268
95	224325143323	No definido	C307
80	232224263322	Bovis	C273

El linaje LAM fue el que presentó el mayor número de genotipos (25), de los cuales 20 fueron únicos y cinco idénticos, es decir más de un aislado reportaba el mismo genotipo, seguido de los linajes Haarlem y S con 11 genotipos cada uno. El linaje X solo reportó un genotipo. La tasa de agrupamiento general del estudio fue de 55.3%, mientras que por linaje, Cameroon fue el linaje con la mayor tasa de agrupamiento de 78.9%, seguido de Ghana (75%); el linaje No definido presentó el menor porcentaje (38.7%) (Tabla 5).

Tabla 5. Genotipos únicos y agrupados identificados por linaje.

Linaje	Total de Aislados	Aislados en clúster	Genotipos			Tasa de agrupamiento
			Clúster	Únicos	Total	
<b>LAM</b>	48	28	5	20	25	47.9%
<b>S</b>	32	24	3	8	11	65.6%
<b>Haarlem</b>	31	25	5	6	11	64.5%
<b>Cameroon</b>	19	17	2	2	4	78.9%
<b>Uganda I</b>	18	12	4	6	10	44.4%
<b>Beijing</b>	12	8	2	4	6	50.0%
<b>Ghana</b>	12	10	1	2	3	75.0%
<b>EAI</b>	5	3	1	2	3	40.0%
<b>Bovis</b>	4	3	1	1	2	50.0%
<b>X</b>	1	0	0	1	1	0.0%
<b>No definido</b>	31	17	5	14	19	38.7%
<b>Total</b>	213	147	29	66	95	-

### **6.1.5 Complejos clonales**

Un grupo o complejo clonal se define como un grupo de aislados genéticamente relacionados, con no más de un locus MIRU de diferencia entre ellos. La relación genética de los 213 aislados genotipados con 12 loci MIRU-VNTR se determinó con un árbol de mínima expansión, el cual evidenció la presencia de 10 complejos clonales (CC). El número de aislados en cada CC varió entre dos (CC8, CC9, CC10) y 92 aislados (CC1), siendo el CC1 el más diverso con 43 genotipos en total, 16 en cluster y 27 únicos, seguido del CC2 con 12 genotipos en total, dos en cluster y nueve únicos. El CC6 reportó una alta tasa de agrupamiento de 90%, mientras que el CC5 fue el que presentó la menor tasa de 40% (Tabla 6).

Los CC3, CC4, CC5, CC6 y CC7 estuvieron representados por aislados pertenecientes a un solo linaje: Beijing, Ghana, EAI, S y Bovis. Los CC8, 9 y 10 incluyeron solo dos aislados del linaje LAM. Los linajes Beijing y Ghana presentaron mayor asociación entre sí, seguido de los linajes S y Bovis; EAI y LAM. Dentro del CC1 los linajes Haarlem, Cameroon y Uganda I mostraron asociación (Fig. 3).

Tabla 6. Caracterización de aislados de *M. tuberculosis* y *M. bovis* dentro de complejos clonales (CC).

CC	Linaje	Total de aislados	Aislados en clúster	Genotipos		Tasa de agrupamiento
				Clústeres	Únicos	
CC1	Haarlem, Cameroon, Uganda I, S,X, LAM, No definido	92	65	16	27	53%
CC2	LAM	31	21	2	10	61%
CC3	Beijing	10	8	2	2	60%
CC4	Ghana	12	10	1	2	75%
CC5	EAI	5	3	1	2	40%
CC6	S	21	20	1	1	90%
CC7	Bovis	4	3	1	1	50%
CC8	LAM	2	0	0	2	0%
CC9	LAM	2	0	0	2	0%
CC10	LAM	2	0	0	2	0%

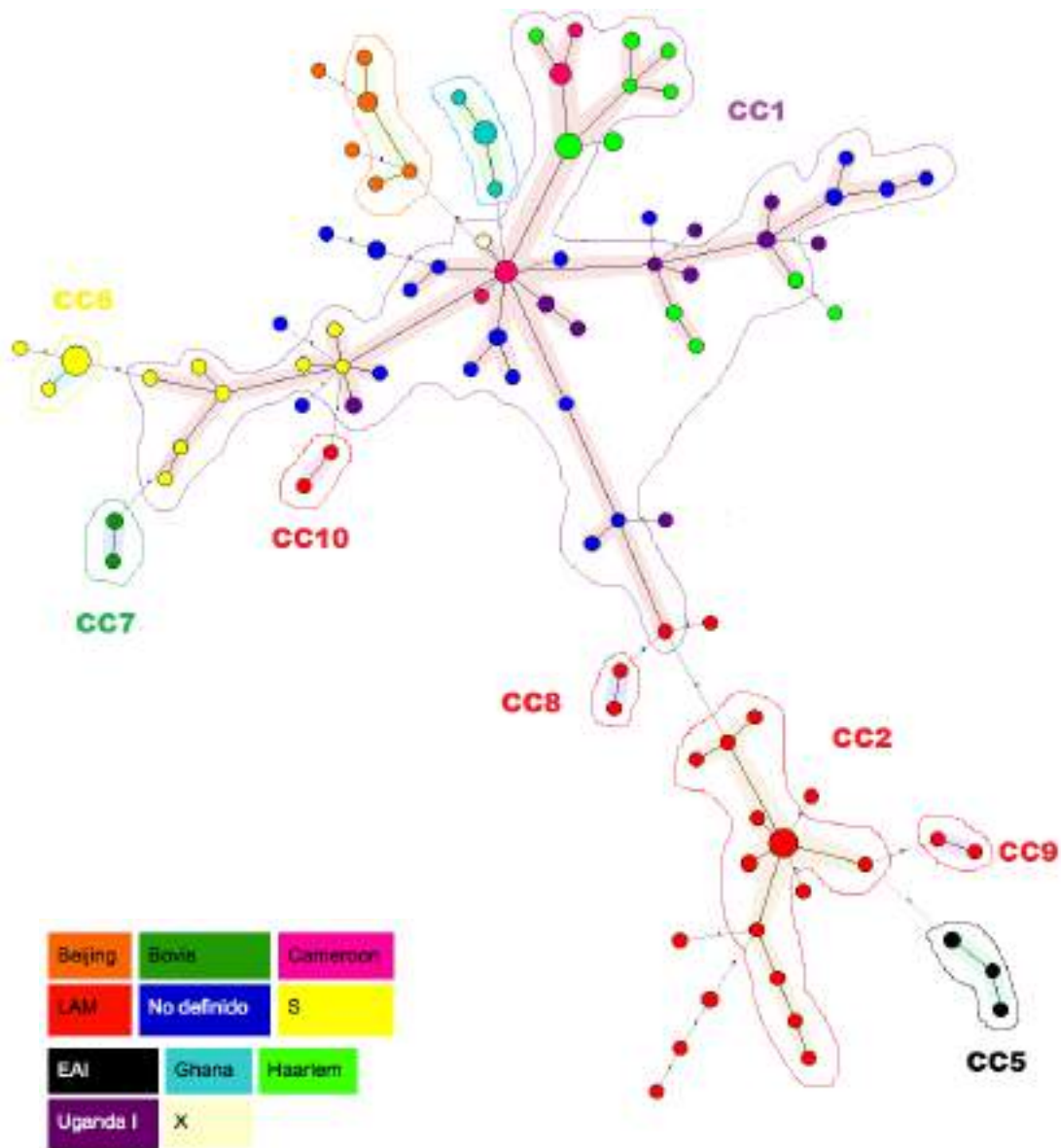


Figura 3. Árbol de mínima expansión que muestra la relación de los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* (12 MIRU-VNTR) en Baja California. La longitud de las ramas indican la cantidad de alelos diferentes. Las líneas sólidas engloban los complejos clonales, con no más de un alelo de diferencia. El tamaño de los círculos representa el número de los aislados clínicos en el estudio: los círculos grandes incluyen de 11-20 aislados, los círculos pequeños de 1-10 aislados.



### **6.1.6 Comparación entre genotipos de Baja California y San Diego, EE.UU.**

Para este análisis, 316 genotipos del trabajo de Rodwell *et. al.* (2012), que corresponden al área de San Diego, California, se integraron con 88 genotipos de Baja California que cuentan con información epidemiológica. Solo 45 genotipos (12.5%) de San Diego, fueron iguales a los reportados en este estudio, de los cuales el 60% (27) coincidieron en los linajes reportados en ambos estados (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Comparación de genotipos y linajes de aislados de *M. tuberculosis* agrupados en cluster de Baja California y San Diego.

Genotipo	Baja California		San Diego	
	Linajes	Aislados	Linajes	Aislados
124326163325	LAM	C73, C227, C320	LAM	SD282
224226153321	LAM	C101, C110, C117, C157, C168, C170, C175, C181, C191, C209, C248, C252, C256, C258, C266, C284, C312, C317	LAM	SD62, SD317, SD357
<b>224316163227</b>	<b>LAM</b>	<b>C265, C298</b>	<b>Uganda II</b>	<b>SD403</b>
233325153324	S	C211, C319	S	SD370, SD374
234325153324	S	C34, C306	S	SD17
333325153222	S	C38, C47, C48, C67, C72, C102, C114, C167, C174, C178, C206, C218, C222, C226, C242, C246, C261, C277, C282, C310	S	SD362
<b>224425153322</b>	<b>Haarlem</b>	<b>C279, C295</b>	<b>X</b>	<b>SD61, SD443</b>
225323153325	Haarlem	C244, C251, C264, C276, C321	Haarlem	SD13
225325133324	Haarlem	C200, C224, C301	Haarlem	SD242
225325153322	Haarlem	C116, C189	Haarlem	SD267

225325153323	Haarlem	C83, C120, C169, C179, C180, C183, C185, C187, C240, C247, C269, C305, C308	Haarlem	SD1, SD7, SD11, SD231, SD250, SD251, SD253, SD254
<b>223325153323</b>	<b>Cameroon</b>	<b>C46,C91,C93,C115,C119,C250,C296,C299,C300</b>	<b>Haarlem, Cameroon</b>	<b>SD2, SD9, SD93, SD232, SD241, SD245, SD275</b>
<b>225315153323</b>	<b>Cameroon</b>	<b>C87, C100, C103, C111, C186, C196, C214, C223</b>	<b>Haarlem</b>	<b>SD3, SD229</b>
223325153223	Uganda I	C33, C86, C208	Uganda I	SD392
<b>223325154322</b>	Uganda I	<b>C263, C278</b>	<b>Uganda I, Haarlem</b>	<b>SD56, SD279</b>
223425153322	Uganda I	C190, C194, C237, C293	Uganda I	SD54, SD387, SD395
223325173533	Beijing	C197, C198, C280, C314, C315, C316	Beijing	SD41, SD73, SD76
223325173534	Beijing	C22, C297	Beijing	SD47
<b>223325164333</b>	<b>Ghana</b>	<b>C57, C69, C122, C123, C160, C171, C184, C201, C285, C309</b>	<b>Beijing</b>	<b>SD70</b>
254326223422	EAI	C177, C235, C241	EAI	SD136, SD139, SD23, SD32, SD33
<b>213425154322</b>	<b>No definido</b>	<b>C259, C304</b>	<b>Uganda I</b>	<b>SD59</b>
<b>223425154322</b>	<b>No definido</b>	<b>C24, C207, C217, C313</b>	<b>Uganda I, Haarlem</b>	<b>SD55, C238, C259</b>

*Los valores en negritas, son aquellos genotipos en los que hubo diferencia en la asignación de linaje*

Tabla 8. Aislados de *M. tuberculosis* con genotipos únicos identificados en Baja California y San Diego. \*Linajes determinados con 12 loci de MIRU-VNTR. \*\* Linajes determinados con 12 loci de MIRU-VNTR y espigotipado. Los valores en negritas, son aquellos genotipos en los que hubo diferencia en la asignación de linaje.

Genotipo	Baja California		San Diego	
	*Linajes	Aislados	**Linajes	Aislados
224226163321	LAM	C71	LAM	SD64, SD294, SD300
124326143225	LAM	C104	LAM	SD321
<b>224325153224</b>	<b>LAM</b>	<b>C219</b>	<b>X</b>	<b>SD434</b>
124316143323	LAM	C221	LAM	SD283, SD301
<b>224325153214</b>	<b>LAM</b>	<b>C238</b>	<b>X</b>	<b>SD408, SD418, SD426</b>
223226163221	LAM	C262	LAM	SD305
<b>223325153324</b>	<b>S</b>	<b>C07</b>	<b>S, X</b>	<b>SD366, SD416</b>
333325153324	S	C31	S	SD372
225325133323	Haarlem	C220	Haarlem	SD4
225313153323	Haarlem	C303	Haarlem	SD260, SD266

223425143322	Uganda I	C109	Uganda I	SD60, SD393
<b>222325143223</b>	<b>Uganda I</b>	<b>C173</b>	<b>Haarlem</b>	<b>SD226, SD228</b>
223325153533	Beijing	C75	Beijing	SD43
223325171531	Beijing	C121	Beijing	SD91
223325153531	Beijing	C204	Beijing	SD87
224326223432	EAI	C28	EAI	SD143, SD182
223325153325	X	C35	X	SD445
<b>223425153323</b>	<b>No definido</b>	<b>C80</b>	<b>Haarlem</b>	<b>SD233</b>
<b>213425154422</b>	<b>No definido</b>	<b>C216</b>	<b>Uganda I</b>	<b>SD398</b>
<b>224325153323</b>	<b>No definido</b>	<b>C243</b>	<b>Haarlem, X</b>	<b>SD20, SD257, SD273, SD413, SD423</b>
<b>223225153324</b>	<b>No definido</b>	<b>C255</b>	<b>S</b>	<b>SD377</b>
<b>223425144322</b>	<b>No definido</b>	<b>C268</b>	<b>Uganda I</b>	<b>SD57, SD385</b>
<b>224325143323</b>	<b>No definido</b>	<b>C307</b>	<b>LAM</b>	<b>SD352</b>

### **6.1.7 SITVIT WEB**

El 49.5% (47) de los 95 genotipos identificados en este estudio coincidió con un MIT reportado en la base de datos SITVIT WEB, lo que indica que dichos genotipos ya han sido reportados previamente en otras partes del mundo. Sin embargo, el 50.5% (48) de los genotipos no coincidió con ningún MIT, por lo que fueron asignados como patrones huérfanos. En total se asignaron 47 MIT's, siendo los predominantes el MIT279, seguido del MIT25 y MIT45. Comparando los linajes obtenidos en ambas bases de datos, el 40.2% (19) de los genotipos a los que se les asignó un MIT coincidieron en ambas bases (Tabla 9).

**Tabla 9. Genotipos a los que se les asignó MIT's y linajes generados en la base de datos SITVIT comparados con los linajes reportados en la base de datos MIRU-VNTR plus.  
n = número de aislados. \*Ambiguo: Término empleado en la base de datos SITVIT para asignar los aislados con múltiple linaje.**

MIT	n	Genotipo	Linaje MIRU-VNTR plus	Linaje SITVIT	Distribución geográfica por país de acuerdo con SITVIT
6	1	222325143223	Uganda I	X3	EE.UU.
10	1	223226143321	LAM	Ambiguo	Bélgica, Reino Unido, Francia, Italia, Polonia, EE.UU
15	1	223325153322	Uganda I	Ambiguo	Bélgica, Croacia, Reino Unido, Francia, Bulgaria, España, Haití, Ecuador, Italia, Turquía, Sur de África, EE.UU.
16	1	223325153533	Beijing	Ambiguo	Australia, Bélgica, Reino Unido, Japón, Rusia, Singapur, EE.UU.
17	6	223325173533	Beijing	Beijing	Australia, Bélgica, Rusia, China, Nepal, Reino Unido, Japón, Rusia, Singapur, Sur de África, EE.UU.
<b>25</b>	<b>18</b>	<b>224226153321</b>	<b>LAM</b>	<b>LAM 1,4,5,9</b>	<b>Australia, Bélgica, Croacia, Reino Unido, Francia, España, Brasil, Haití, Sur de África</b>
26	1	224226163321	LAM	LAM 1,2,9	Francia, EE.UU, Bélgica, Haití, Bangladés,
30	1	224325143323	No definido	Ambiguo	Austria, Croacia, Bélgica, Reino Unido, España, Ecuador, Haití, EE.UU., Singapur, Sur de África, Francia
31	1	224325153224	LAM	Ambiguo	Japón, EE.UU., Sur de África

33	1	224325153323	No definido	Ambiguo	Australia, Bélgica, Bulgaria, Canadá, Reino Unido, Francia, Croacia, EE.UU., Sur de África
38	1	224326143323	LAM	LAM3,5,9 LAM12-Madrid1	Bélgica, España, Reino Unido, Sur de África, Marruecos
42	1	225313153323	Haarlem	H1,2,3	Australia, Croacia, Bélgica, Brasil, Canadá, Reino Unido, Francia, EE.UU., Sur de África, Haití, Marruecos
<b>45</b>	<b>13</b>	<b>225325153323</b>	<b>Haarlem</b>	<b>Ambiguo</b>	<b>Australia, Bélgica, Ecuador, Bolivia, Croacia, EE.UU., Sur de África, Singapur, Rusia, Polonia, Turquía, Italia, India, Reino Unido, Bulgaria</b>
48	1	232224263322	Bovis	BOV_1,2	Argentina, Australia, EE.UU., Países bajos
56	1	254326223432	EAI	EAI2-nonthaburi, EAI2-Manilla, EAI5	Australia, Bélgica, Canadá, Reino Unido, Singapur, Francia, Haití, Tailandia, Filipinas, EE.UU.
80	3	254326223422	EAI	EAI2-Manilla, EAI5	Australia, Reino Unido, EE.UU., Singapur
96	1	223325171531	Beijing	-	Australia, Singapur, EE.UU., Reino Unido
98	1	223325163532	Beijing	-	Singapur
116	9	223325153323	Cameroon	Ambiguo	Australia, Bélgica, Croacia, Reino Unido, EE.UU., Marruecos, Sur de África
125	1	223325153324	S	Ambiguo	Australia, Bélgica, Bulgaria, EE.UU., Sur de África, Francia, Reino Unido, Croacia
131	8	225315153323	Cameroon	H1, H3	Australia, Bélgica, Croacia, Reino Unido, EE.UU., Italia, Rusia, Brasil, Caribe



134	4	223225153323	No definido	Ambiguo	Bélgica, Croacia, Brasil, Francia, Turquía
152	2	225325153322	Haarlem	Ambiguo	Croacia, Bélgica, España, India, Japón Cameroon, India, Ecuador, Perú, Francia, Reino Unido, EE.UU.
157	4	223425153322	Uganda I	Ambiguo	Bélgica, Croacia, Reino Unido, Italia, EE.UU., Sur de África, España
160	1	223425143322	Uganda I	T1	Croacia, Reino Unido, Bélgica, España, Canadá, Ecuador, Haití, Caribe
169	1	223225153324	No definido	T1	Bélgica, Croacia, Rusia, EE.UU.
204	1	223325133324	S	T1	Bélgica, Rusia, Caribe
209	2	223325154322	Uganda I	T1	Polonia
212	2	233325153324	S	Ambiguo	Australia, Bélgica, Croacia, Turquía, Canadá, EE.UU., Reino Unido, Sur de África
219	1	223325153325	X	Ambiguo	Bélgica, Brasil, España, Reino Unido, Croacia, Polonia, EE.UU., Sur de África
<b>279</b>	<b>20</b>	<b>333325153222</b>	<b>S</b>	-	<b>Australia, Bélgica, Italia, Marruecos</b>
307	1	223226163321	LAM	LAM 1	Reino Unido, Francia, Haití, Caribe, EE.UU.
309	3	232224253322	Bovis	BOV_1,2,3	Argentina, EE.UU., Países bajos

382	1	223425153323	No definido	T1, T3	Croacia, Bélgica, Francia, Turquía
397	1	333325153324	S	S	Croacia, Bulgaria, Sur de África, Turquía
398	1	225315153324	Cameroon	T1	Reino Unido, EE.UU.
464	3	224226133321	LAM	LAM9	Bélgica, Reino Unido
492	1	223226153221	LAM	-	Reino Unido
510	1	224226153322	LAM	H3	Reino Unido, Marruecos, Bélgica
522	4	223425154322	No definido	T5	Croacia, Reino Unido, Sur de África
608	5	225323153325	Haarlem	H3	EE.UU.
645	1	225325133323	Haarlem	-	Perú, España, Croacia, EE.UU.
648	1	224315153322	No definido	Ambiguo	Croacia, EE.UU.
706	2	223325173534	Beijing	Beijing	Japón, Australia
707	1	223325153531	Beijing	Beijing	Japón

738	2	224226143321	LAM	LAM4, LAM5	Croacia, EE.UU., Caribe
794	3	223325153223	Uganda I	T1	Bulgaria, Canadá

---

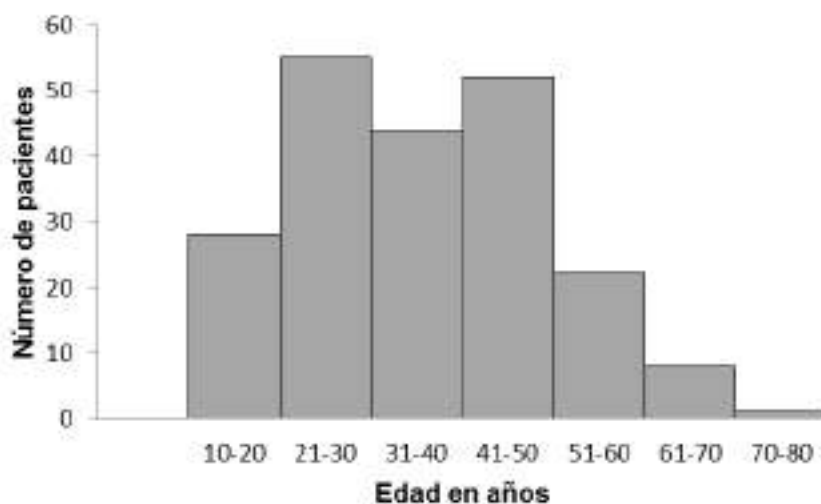
## **6.2 Estudio epidemiológico**

Se colectaron un total de 323 aislados clínicos de micobacterias, correspondiente al mismo número de pacientes, sin embargo, solo se obtuvo información epidemiológica de 210 pacientes. Por tal motivo, el análisis epidemiológico que se muestra a continuación es con base en la información de los 210 pacientes estudiados.

### **6.2.2 Variables sociodemográficas**

#### **6.2.2.1 Edad y Sexo**

La edad de los pacientes correspondientes a los 210 aislados analizados mostró una media de 36 años, un mínimo de 11 años y un máximo de 76 años (Fig. 4). El sexo masculino representó el 67% y el sexo femenino el 33% del total de los pacientes.



**Figura 3. Edad en años de 210 pacientes analizados**

### **6.2.2.2 Lugar de nacimiento y de residencia**

El 45.7% (96) de los pacientes nacieron en Baja California, el 53.3% (112) es originario de otros estados de Mexico y el 1% (2) reportó haber nacido en otro país (Fig. 5). El mayor número de aislados foráneos provienen de Sinaloa 6.6% (14), Jalisco 5.7% (12) y Nayarit 4.7% (10). De acuerdo con el INEGI (2011), en Baja California residen 3,155,070 de personas, de los cuales el 53.4% nacieron en el estado y 41.2% de personas nacieron en otro estado de

la República Mexicana, donde el principal estado de procedencia es Jalisco, seguido de Sonora (Fig. 5).

En cuanto al lugar de residencia actual, el 96% (202) vive en Baja California, 2% (4) en Sonora, seguido de Baja California Sur, Guerrero, Veracruz y el Distrito Federal con 0.5% (1) cada uno. Con respecto a los que residen en Baja California, la distribución por municipio corresponde el 88% (178) al municipio de Tijuana, el 9% (18) a Ensenada, 1.5% (3) a Tecate, 1% (2) en Mexicali y 0.5% (1) a Playas de Rosarito. Los aislados de Sonora son de los municipios de Hermosillo, Álamo, Cajeme y San Luis Río Colorado. Los aislados de Baja California Sur, Guerrero y el Distrito Federal son de los municipios de Loreto, Coyuca y Chamontoya, respectivamente.

Con respecto al tiempo de residencia en Baja California, el 49% (99) de los pacientes tiene más de 5 años viviendo en el estado, el 22.3% (45) entre 1 y 5 años, 23.3% (47) menos de 1 año y 5.4% (11) sin especificar. De los pacientes de Sonora de los municipios de Cajeme y Hermosillo reportan haber residido más de 5 años en estos municipios, mientras que los que residen en Álamo y San Luis Río Colorado, reportan haber vivido menos de 1 año en dichos municipios. El paciente de Guerrero lleva más de 5 años viviendo en el municipio de Coyuca, mientras que el paciente del Distrito Federal lleva menos

de 1 año en el municipio de Chamontoya. Los pacientes de Veracruz y Baja California Sur no reportaron tiempo de residencia.

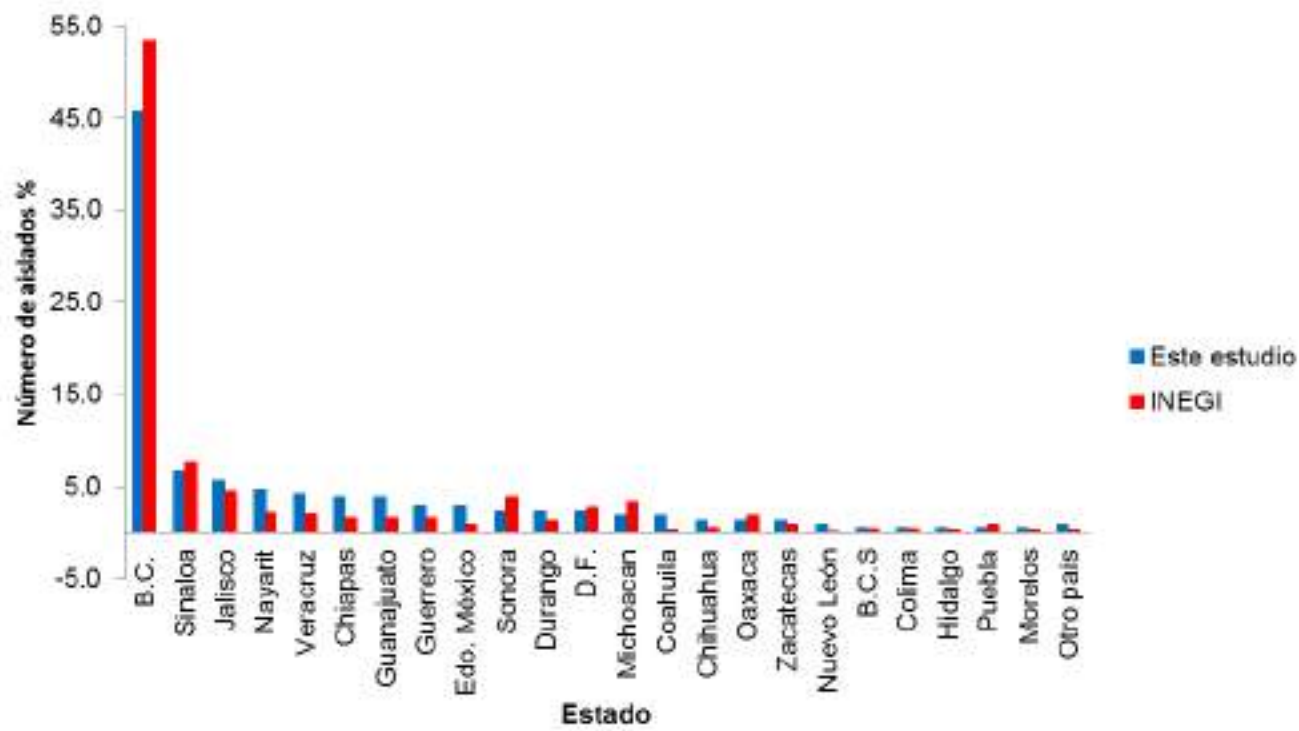


Figura 4. Lugar de nacimiento de los pacientes a los que se les tomó muestra clínica comparado con los datos de INEGI (INEGI, 2011)



### 6.2.2.3 Ocupación y escolaridad

El 56.7% de los pacientes reportaron ser desempleados (Fig.6). La escolaridad predominante en los pacientes fue primaria y secundaria (30.5%, respectivamente) (Fig. 7).

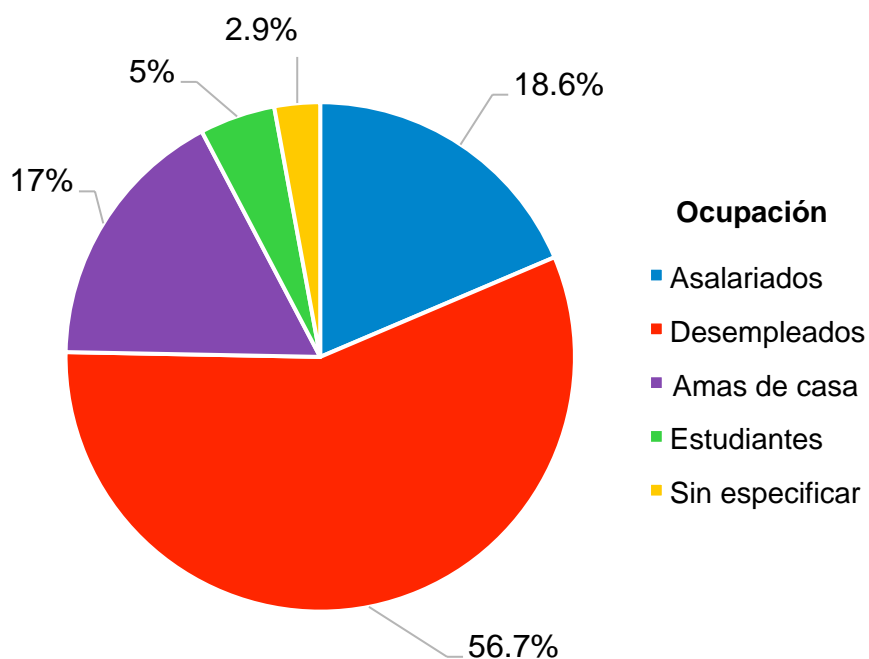
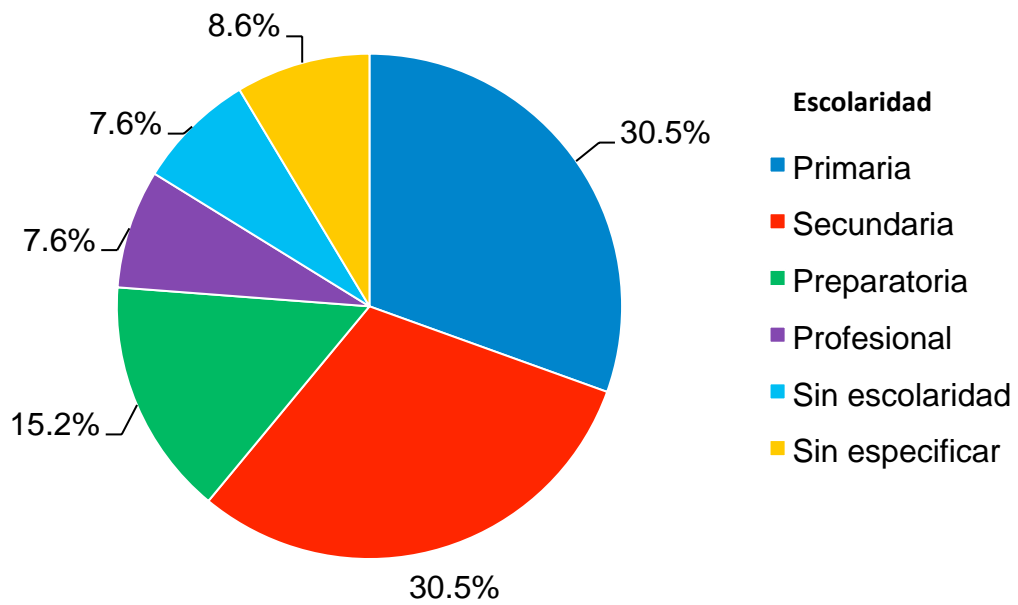


Figura 1. Ocupación de los pacientes estudiados (n = 210 pacientes).





**Figura 6. Escolaridad de los pacientes a los que se les tomó muestra clínica (n = 210 aislados)**

### **6.2.3 Variables clínicas**

#### **6.2.3.1 Baciloscopia**

Los resultados de la prueba de baciloscopia indicaron que el 52.4% (110) de los aislados fueron baciloscopia positiva +++, 10% (21) baciloscopia positiva ++, 27.1% (57) baciloscopia positiva +; de estos el 75% fueron casos nuevos. El 2.8% (6) fueron diagnosticados por cultivo y radiografía, respectivamente; 1% (2) por histopatología y 0.5% (1) por broncoscopia. El 3.4% (7) se reporta como no definido debido a que no se contó con información epidemiológica.

#### **6.2.3.2 Tipos de caso de ingreso y egreso de tratamiento**

De los 210 pacientes que iniciaron el tratamiento, el 75.7% fueron casos nuevos y el 11% recaída, en ambos casos el mayor porcentaje fueron hombres (64.8% y 78.3%, respectivamente) (Tabla 10). Respecto al egreso, el 47.6% se curaron y solo el 8.6% fracaso, asimismo, en ambos casos el mayor porcentaje fueron hombres (57% y 61.1%, respectivamente) (Tabla 11).

Tabla 10. Tipo de ingreso al tratamiento de acuerdo al sexo.

Tipo de Ingreso	Sexo				Total	
	Mujer		Hombre		n	%
	n	%	n	%		
Casos nuevos	56	35.2	103	64.8	159	75.7
Reingreso	4	17.4	19	82.6	23	11.0
Recaída	5	21.7	18	78.3	23	11.0
Referido	3	100.0	0	0.0	3	1.4
Fracaso	1	50.0	1	50.0	2	1.0
<b>Total</b>	69	32.9	141	67.1	210	100

Tabla 11. Tipo de egreso al tratamiento de acuerdo al sexo.

Tipo de Egreso	Sexo				Total	
	Mujer		Hombre		n	%
	n	%	n	%		
Curado	43	43.0	57	57.0	100	47.6
Abandono	3	9.7	28	90.3	31	14.8
Término	12	36.4	21	63.6	33	15.7
Fracaso	7	38.9	11	61.1	18	8.6
Continúa	1	10.0	9	90.0	10	4.8
Defunción	1	11.1	8	88.9	9	4.3
Defunción por otras causas	1	20.0	4	80.0	5	2.4
Traslado	1	50.0	1	50.0	2	1.0
No especificado	0	0.0	2	100.0	2	1.0
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>32.9</b>	<b>141</b>	<b>67.1</b>	<b>210</b>	<b>100.0</b>

### 6.2.3.3 Esquema y tiempo de tratamiento

El 84.7% de los pacientes recibieron tratamiento primario acortado y solo el 3.3% tratamiento individualizado (Tabla 12). En todos los esquemas de tratamiento el mayor porcentaje de egreso fue de curación (31.6% a 50.6%), con excepción del retratamiento estandarizado en el que solamente se reportó un paciente, el cual fracasó al tratamiento (Tabla 13).

Con relación al tiempo de tratamiento, la mayoría de los pacientes recibieron tratamiento por seis meses (72.8%), de los cuales el 54.9% egresó como curado y solo el 1.4% no recibió tratamiento. Por otro lado el 37.8% de los pacientes que recibieron tratamiento de 7 a 12 meses se curó (Tabla 14 y 15).

**Tabla 1. Esquema de tratamiento de los 210 pacientes.**

<b>Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Primario acortado</b>	178	84.8
<b>Retratamiento primario</b>	19	9.0
<b>Retratamiento estandarizado</b>	1	0.5
<b>Individualizado</b>	7	3.3
<b>Continúa tratamiento</b>	2	1.0
<b>Sin tratamiento</b>	1	0.5
<b>No especificado</b>	2	1.0
<b>Total</b>	210	100

Tabla 13. Relación entre esquema de tratamiento y tipo de egreso.

Egreso	Tratamiento							
	Primario acortado		Retratamiento		Retratamiento estandarizado		Individualizado	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Curado</b>	90	50.6	6	31.6	0	0	3	42.9
<b>Abandono</b>	27	15.2	3	15.8	0	0	1	14.3
<b>Término</b>	31	17.4	1	5.3	0	0	1	14.3
<b>Fracaso</b>	12	6.7	2	10.5	1	100	2	28.6
<b>Continúa</b>	7	3.9	3	15.8	0	0	0	0
<b>Defunción</b>	4	2.2	3	15.8	0	0	0	0
<b>Defunción por otras causas</b>	3	1.7	1	5.3	0	0	0	0
<b>Traslado</b>	2	1.1	0	0	0	0	0	0
<b>No especificado</b>	2	1.1	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	178	100	19	100	1	100	7	100



**Tabla 14. Tiempo de tratamiento reportado en meses de los 210 pacientes estudiados.**

<b>Tiempo de tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>0</b>	3	1.4
<b>1</b>	4	1.9
<b>2</b>	2	1.0
<b>3</b>	1	0.5
<b>4</b>	1	0.5
<b>6</b>	153	72.9
<b>7</b>	10	4.8
<b>8</b>	5	2.4
<b>9</b>	8	3.8
<b>10</b>	1	0.5
<b>11</b>	2	1.0
<b>12</b>	12	5.7
<b>16</b>	1	0.5
<b>18</b>	3	1.4
<b>24</b>	1	0.5
<b>No especificado</b>	3	1.4
<b>Total</b>	<b>210</b>	<b>100.0</b>

**Tabla 15. Tipo de egreso de los 153 pacientes que recibieron tratamiento por seis meses o más meses.**

Tipo de Egreso	6 meses		7 a 12 meses		16 a 24 meses	
	n	%	n	%	n	%
<b>Curado</b>	84	54.9	14	37.8	2	40
<b>Terminó</b>	18	11.8	15	40.5	0	0
<b>Abandono</b>	25	16.3	1	2.7	0	0
<b>Fracaso</b>	12	7.8	3	8.1	2	40
<b>Continua</b>	3	2	3	8.1	0	0
<b>Defunción</b>	7	4.6	1	2.7	0	0
<b>Defunción por otras causas</b>	3	2	0	0	0	0
<b>Traslado</b>	1	0.6	0	0	1	20
<b>Total</b>	153	100	37	100	5	100

#### **6.2.3.4 Enfermedades asociadas**

Entre las enfermedades asociadas, la DM fue la enfermedad con mayor asociación a TB (12.4%), seguido de alcoholismo (8.6%). Sin embargo, más de la mitad de los pacientes (55.7%) no reportaron enfermedades asociadas (Tabla 16).

**Tabla 16. Enfermedades asociadas que se reportaron en el momento de ingresar al tratamiento de tuberculosis.**

<b>Enfermedades Asociadas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Ninguna</b>	117	55.7
<b>Diabetes</b>	26	12.4
<b>Alcoholismo</b>	18	8.6
<b>Desnutrición</b>	10	4.8
<b>Drogas</b>	12	5.7
<b>VIH/SIDA</b>	13	6.2
<b>Otras enfermedades</b>	8	3.8
<b>No especificado</b>	6	2.9
<b>Total</b>	<b>210</b>	<b>100</b>

### 6.2.3.4.1 Enfermedad asociada vs tipo de egreso

La mayoría de las enfermedades asociadas a la TB presentaron altos porcentajes de curación (30% a 44.4%), con excepción de drogas que presentó el mayor porcentaje de abandono al tratamiento (41.7%) (Fig. 8).

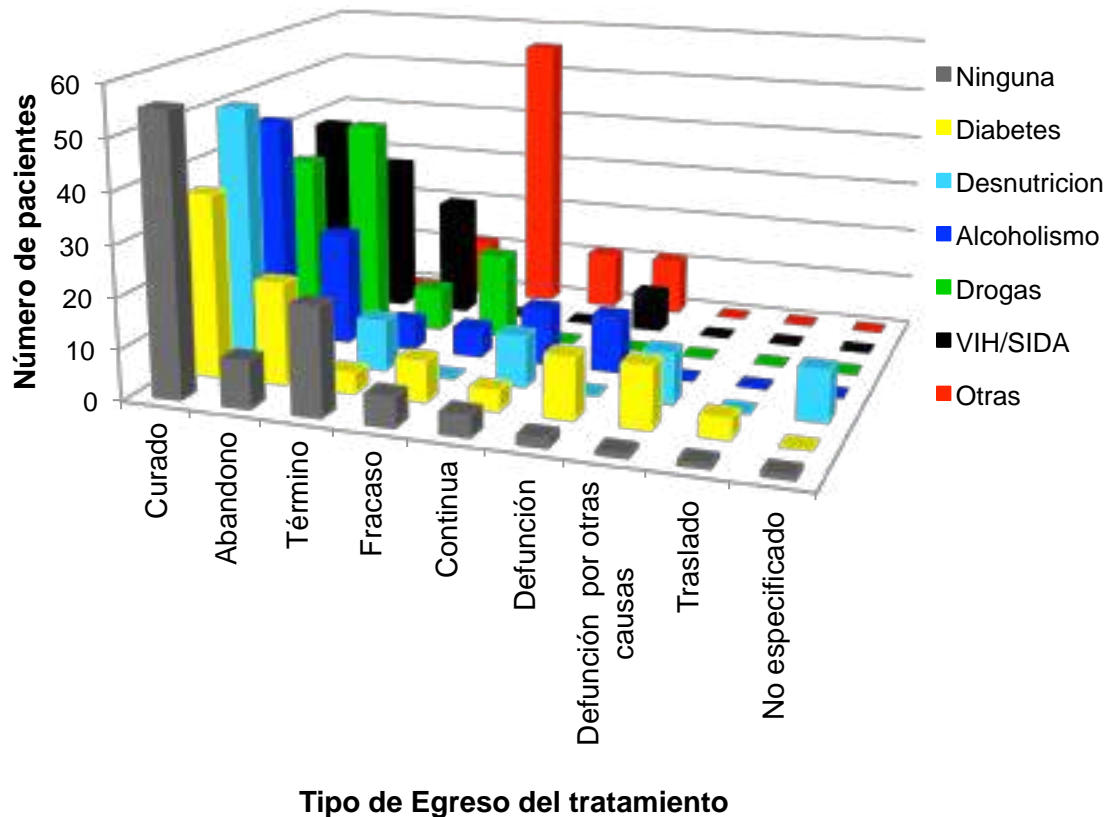


Figura 7. Enfermedades asociadas con respecto al tipo de egreso a tratamiento de tuberculosis

### **6.2.3.5 Localización de la tuberculosis**

El 95.7% (201) de los aislados analizados presentaron la enfermedad de forma pulmonar, 1.4% (3) intestinal, 1% (2), ganglionar, 1% (2) pleural, 0.5% (1) renal y 0.5% (1) mixta.

## **6.3 Análisis epidemiológico molecular**

El análisis de asociación entre los linajes y las características clínicas y sociodemográficas mediante un análisis de regresión logística fue no significativo con respecto a todas las variables analizadas ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, se realizó un análisis descriptivo entre las características genéticas (linajes) y las variables clínicas y sociodemográficas.

### **6.3.1 Relación de los linajes identificados con variables clínicas**

El análisis comparativo se llevó a cabo solamente con 176 aislados que presentaron información clínica e información molecular (linajes). El linaje LAM fue el que agrupó el mayor número de casos nuevos y mayor asociación a alcoholismo. Dentro del linaje Uganda I se identificó el mayor número de ingresos por recaída y retratamientos. El linaje S presentó el mayor número de fracasos como egreso del tratamiento y mayor asociación a diabetes mellitus (Tabla 17).

### **6.3.2.2 Relación entre linajes y variables sociodemográficas**

Se analizaron los datos sociodemográficos de los 118 pacientes agrupados en los 29 cluster identificados. El sexo masculino fue el predominante en la mayoría de los linajes con excepción del linaje Bovis donde los dos pacientes reportados fueron del sexo femenino. La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados entre el 2009 al 2011, sin embargo dos pacientes fueron diagnosticados desde el 2007 y 2008 dentro de los linajes Cameroon y No definido (Tabla 18).

**Tabla 17. Relación entre linajes y variables clínicas (n = 176).**

Linaje	n	Ingreso				Egreso					Tratamiento			Enfermedades Asociadas					
		CN	RI	RC	FR	CU	FR	DF	AB	Otros*	P	R	I	Ninguna	Alcoh	DM	VIH	Drogas	Otras**
LAM	39	29	6	4	0	11	0	1	5	12	26	3	0	22	4	2	2	2	7
S	28	25	0	3	0	12	5	4	1	6	25	2	1	15	2	5	1	1	4
Haarlem	22	18	3	1	0	10	2	1	4	5	19	2	1	11	3	1	1	2	3
Cameroon	14	10	3	1	0	5	0	1	4	4	13	1	0	8	2	4	0	0	0
Uganda I	16	8	2	5	1	6	2	1	2	0	10	5	1	9	2	2	0	1	2
Beijing	11	6	2	2	0	3	1	1	3	3	8	0	0	6	0	1	1	2	0
Ghana	10	7	1	1	0	6	1	1	0	2	8	2	0	6	0	2	0	0	2
EAI	4	4	0	0	0	2	1	0	1	0	4	0	0	3	0	0	0	1	0
Bovis	3	3	0	0	0	1	0	1	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0
X	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
No definido	28	25	2	2	1	12	2	3	3	8	25	3	0	17	1	4	4	0	2
<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>136</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>2</b>	<b>68</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>23</b>	<b>41</b>	<b>141</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	<b>97</b>	<b>15</b>	<b>24</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>20</b>

CN= Caso nuevo, RI= Reingreso, RC= Recaída, FR= Fracaso; CU= Curado, DF= Defunción, AB=Abandono, Otros= Continúa, Término de tratamiento; P =Primario, R=Retratamiento, I=Individualizado; Alcoh= Alcoholismo, DM= Diabetes mellitus. \*\*Otras: Desnutrición, Tabaquismos, Anemia, Hepatitis C.

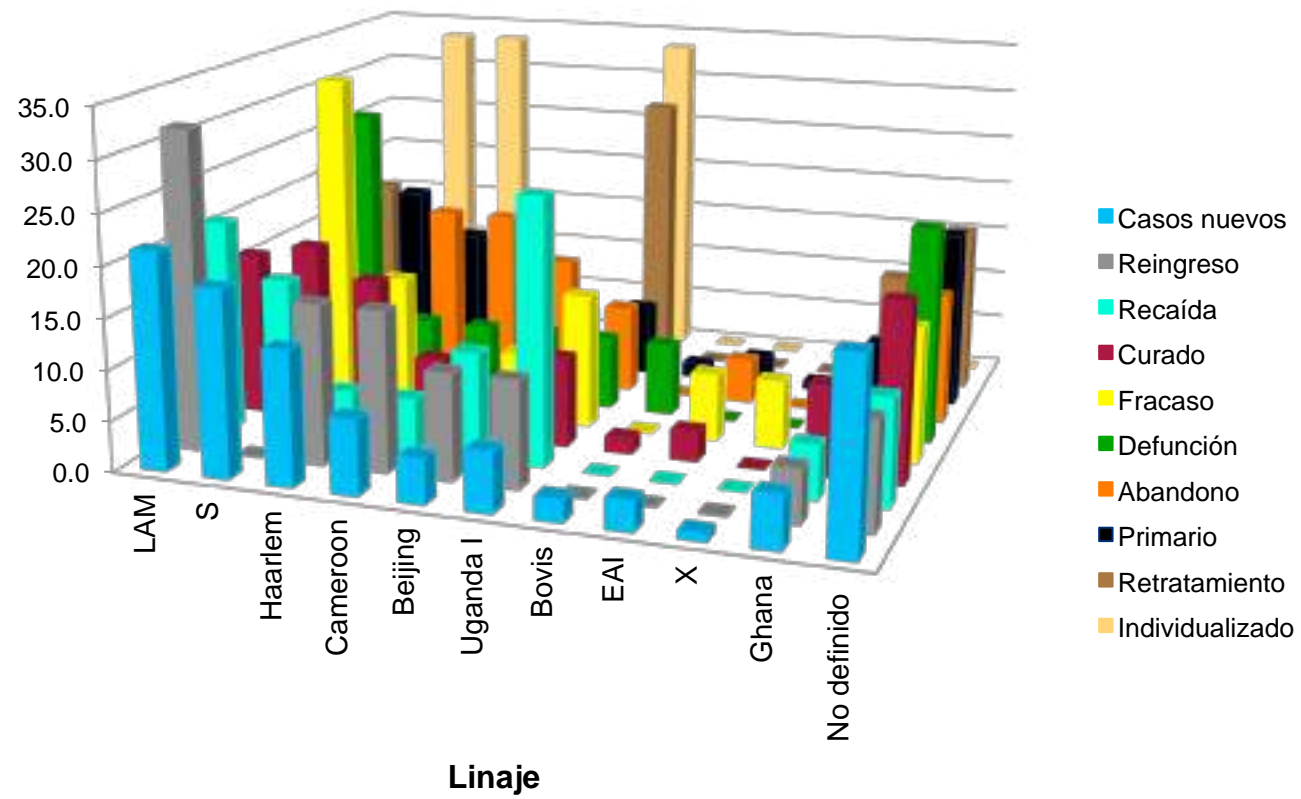


Figura 8. Distribución de linajes con respecto al tipo de ingreso, egreso y esquema de tratamiento



**Tabla 18. Clústeres identificados dentro de los linajes y variables sociodemográficas por clúster.**

Linaje	Clúster	Aislados	Sexo		Año de diagnostico	Lugar de residencia
			M	F		
LAM	L1	3	3	0	2010	Tijuana-Ensenada
	L2	14	10	4	2010-2012	Tijuana-Ensenada
	L3	2	2	0	2011	Tijuana
	L4	2	1	1	2011	Tijuana
S	S1	2	1	1	2010-2011	Tijuana
	S2	17	13	4	2009-2011	Tijuana
	S3	2	2	0	2010-2011	Tijuana-Sonora
Haarlem	H1	8	4	4	2009-2011	Tijuana
	H2	3	3	0	2010-2011	Tijuana
	H3	3	2	1	2010-2011	Tijuana
	H4	2	2	0	2010-2011	Tijuana
Cameroon	C1	8	7	1	2007-2011	Tijuana
	C2	5	3	2	2009-2011	Tijuana-Ensenada
Uganda I	U1	3	2	1	2009-2010	Tijuana
	U2	2	0	2	2009	Tijuana
	U3	3	3	0	2010-2011	Tijuana
	U4	2	1	1	2011	Tijuana

Beijing	B1	2	2	0	2009	Tijuana
	B2	5	4	1	2010-2011	Tijuana
Ghana	Gh1	8	7	1	2010-2011	Tijuana-Ensenada
EAI	E1	2	2	0	2010-2011	Tijuana
Bovis	Bo1	2	0	2	2009-2010	Tijuana-Tecate
No definido	Nd1	4	4	0	2008-2010-2011	Tijuana
	Nd2	5	3	2	2010-2011	Tijuana
	Nd3	2	1	1	2010-2011	Tijuana
	Nd4	3	2	1	2009-2011	Tijuana-Sonora
	Nd5	2	2	0	2011	Tijuana
Total		116	86	30		

La distribución de linajes respecto al lugar de residencia en Baja California (n=168) mostró que Tijuana es el municipio que presenta todos los linajes, mientras que el linaje Bovis se encuentra distribuido principalmente en Tecate, solo los linajes S y Beijing se reportaron en Mexicali (Fig. 10).

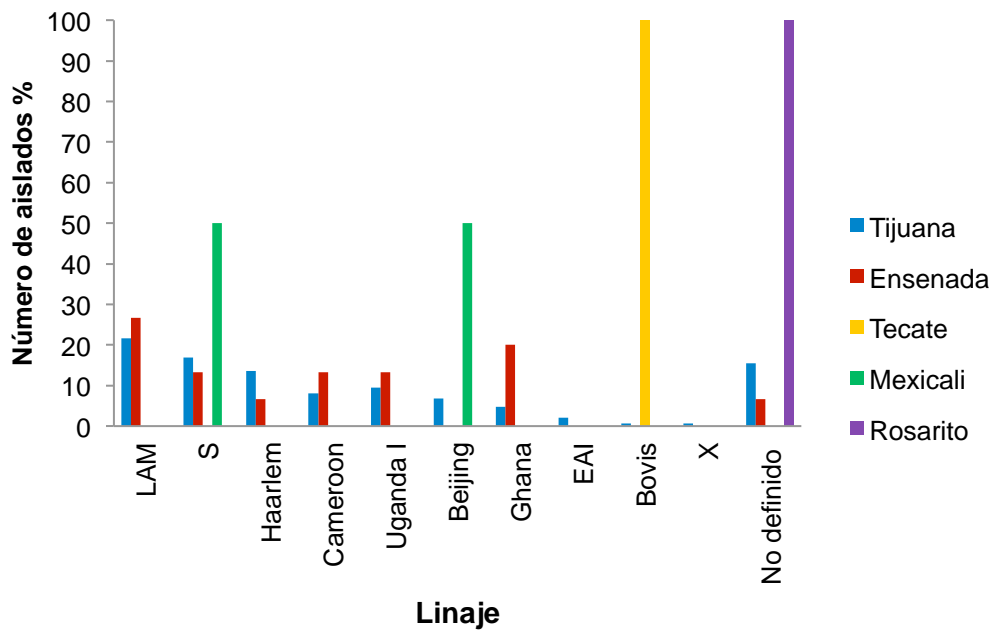


Figura 9. Distribución de linajes con respecto al lugar de residencia en Baja California

## 7. DISCUSIÓN

---

### Identificación molecular de la especie de *Mycobacterium*

Con el análisis de identificación molecular se determinó la presencia de *M. bovis* en el 2% (6/309) de los aislados clínicos analizados, lo cual indica la existencia de TB bovina en humanos en Baja California. Los resultados de este estudio coinciden con otros realizados en México, EE.UU. y otros países desarrollados, en donde se ha reportado un incremento de TB en humanos por *M. bovis* en los últimos años.

Los estudios realizados en México utilizando IS6110, espigotipado y/o MIRU-VNTR, han detectado la presencia del linaje Bovis en muestras clínicas de personas diagnosticadas con TB. En el estado de Querétaro, el 6% (34) de los pacientes (sintomáticos y trabajadores ganaderos) analizados se encontraban infectados con *M. bovis* (Milián, et al., 2010). En la ciudad de México en población VIH positiva (n = 67), el 13.4% fue identificado con *M. bovis* (López, et al., 2010). Otro estudio realizado en 90 muestras de infantes procedentes de 19 estados del país, se identificó que el 33.3% correspondía al linaje Bovis. (Macías-Parra, et al., 2011).

En San Diego, California entre 1994 a 2005, se reportó que el 8% (265) de los casos diagnosticados con TB presento cultivos positivos a *M. bovis*

(Rodwell, et al., 2008), y más del 50% de los casos eran pacientes nacidos en México (Hlavsa, et al., 2008). En otro estudio binacional, se compararon los genotipos de *M. bovis* de muestras de pacientes contra los de ganado procedente de México y California. Los resultados mostraron que más del 91% (97/106) de los aislados de *M. bovis* en humano presentaron espoligotipos idénticos a los del ganado mexicano, lo que sugiere una alta transmisión de cepas de *M. bovis* entre ganado y humanos (Rodwell, et al., 2010).

Recientemente en Baja California se determinó el genotipo de 11 aislados obtenidos de ganado sacrificado en un rastro de Mexicali y 10 aislados de un rastro de Tijuana, utilizando seis loci de MIRU-VNTR, en donde se identificaron 14 genotipos de *M. bovis*, lo que indica la presencia de más de una cepa circulando en la región (Martínez, et al., 2011). Desafortunadamente, solo dos loci del set de MIRU-VNTR utilizado coincide con los que utilizamos en este estudio, por lo que no fue posible, realizar una comparación entre los dos genotipos de *M. bovis* que identificamos en humanos con los reportados por (Martínez, et al., 2011).

Todos los estudios presentados demuestran que se han incrementado los casos de *M. bovis* lo que es un riesgo de salud para la población humana, por lo que es prioritario generar mayor información que permita estudiar los patrones de transmisión y las fuentes de infección de la tuberculosis entre humanos y ganado bovino, identificar los casos de infección por *M. bovis* para

poder dar tratamiento adecuado al paciente, y que estas cepas no se sigan dispersando en la población, principalmente debido a que *M. bovis* es resistente natural a pirazinamida, un fármaco de primera línea aplicado en el tratamiento primario de TB (Toledo, et al., 1999).

## **Identificación y caracterización molecular de linajes**

### **Poder de discriminación**

En la presente investigación con el método de 12 MIRU-VNTR se reportó un elevado índice discriminatorio de 0.976, similar a lo reportado en Colombia de 0.983 con el mismo método (Cerezo, 2009), sin embargo, fue menor a lo reportado en Uganda de 0.996 con el set de 15 MIRU (Nabyonga, et al., 2011), resultado esperado ya que el set de 12 MIRU presenta un poder de discriminación menor a los set de 15 y 24 MIRU (Christianson, et al., 2010, Maes, et al., 2008). En particular el MIRU 40, 10 y 26 presentan un elevado poder de discriminación (Sharma, et al., 2008) (Alonso, et al., 2008), resultados que concuerdan con los reportados en este estudio (Tabla 2). Los últimos reportes recomiendan utilizar el set de 15 MIR-VNTR para estudios de epidemiología molecular de la TB, o bien el set de 12 MIRU-VNTR en combinación con espigotipado, ya que tiene un poder de discriminación mayor que el set de 12 MIRU-VNTR por si solo (Alonso, et al., 2008, Gibson, et al., 2005). Sin embargo, diversas investigaciones afirman la eficiencia del uso de

12 MIRU-VNTR como método de primera línea para el análisis de transmisión de la TB (Cowan, et al., 2005, Van Deutekom, et al., 2005).

### **Distribución de linajes**

En este estudio se identificaron 11 linajes, siendo los de mayor prevalencia LAM, S y Haarlem, los cuales también se han reportado en estudios realizados en México y en San Diego, California. Sin embargo, el linaje EAI y X que se encuentra en alta frecuencia en San Diego y varios estados de México, se encontraron con menor frecuencia en el presente estudio. La alta diversidad de linajes detectada en este estudio, coincide con la hipótesis planteada en este estudio, en que Baja California al ser una zona de alta migración presenta una alta diversidad de linajes prevalentes a nivel mundial (Brudey, et al., 2006, Demay, et al., 2012). La ausencia del linaje T en este estudio, el cual es altamente frecuente en México, se debe a la técnica utilizada (12 MIRU-VNTR), ya que este linaje puede ser identificado solamente con la técnica de espigotipado, sin embargo con MIRU-VNTR puede ser clasificado dentro de los linajes Euro-Ámericanos como Haalem, LAM, X, entre otros (Allix-Béguec, et al., 2008a).

## **Linaje LAM**

El linaje predominante en este estudio fue el linaje LAM (22.5%) que es altamente frecuente en América Latina (Candia, et al., 2007, Millet, et al., 2011, Rosales, et al., 2010), principalmente en Brasil (Cardoso, et al., 2011, Oliveira, et al., 2007), Venezuela y en la región del Caribe (Brudey, et al., 2006). El linaje LAM representa el 50% de los casos de TB en América del Sur (Demay, et al., 2012) y es predominante en el Mediterráneo (Brudey, et al., 2006). La identificación de este linaje era de esperarse en Baja California ya que en el centro y norte de México ha sido reportado en el 13.7% de los casos con TB (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013), en San Diego, California (16.9%) (Rodwell, et al., 2012) y Canadá (10%) (Christianson, et al., 2010).

## **Linaje S**

El linaje S fue el segundo linaje predominante (15%), lo que difiere con otros estados de México, donde en promedio se ha reportado en un 2.7% (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013), pero es similar a lo reportado en Canadá (17.5%) (Christianson, et al., 2010) y San Diego, California (17%) (Rodwell, et al., 2012). El linaje S se ha reportado en el sur y norte de África (5 y 8%, respectivamente), en el norte de Europa (6%) y Norte América (<4%) (Demay,



et al., 2012), pero se desconoce su lugar de origen (Brudey, et al., 2006). En América Latina y otras partes del mundo se ha reportado en muy baja frecuencia entre el 1% y 4.2% (Abadía, et al., 2009, Brudey, et al., 2006, Cerezo, et al., 2012, Homolka, et al., 2008, Lari, et al., 2007, Nabyonga, et al., 2011). La alta frecuencia del linaje S en Baja California, puede estar relacionada con la alta migración entre Canadá - EE.UU – México. Se tiene registrado que el 17% de los estadounidenses y 9.8% de los mexicanos migran a Canadá para trabajar temporalmente, regresando a los pocos meses o años a sus lugares de origen (Citizenship and Immigration Canada, 2012),

### **Linaje Haarlem**

El 14.6% de los aislados se clasificaron como linaje Haarlem, lo cual coincide con San Diego (15%) (Rodwell, et al., 2012), pero es la mitad de lo que se ha reportado en el estado de Veracruz (30%) (Pérez, 2013). En general, en otros estudios en diferentes estados de México, el linaje Harem varía entre el 2 al 14.4% (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013). El linaje Haarlem se distribuye en todo el mundo (Cubillos, et al., 2010), particularmente en Europa es el segundo linaje más representativo con el 24% de los casos con TB, mientras que en América del norte y del sur representa alrededor del 20% y 16% de los casos,

respectivamente (Candia, et al., 2007, Demay, et al., 2012, Millet, et al., 2011, Rosales, et al., 2010),

### **Linaje Cameroon**

El 8.9% de los aislados fueron identificados como Cameroon, valor que es muy superior a lo reportado en San Diego y Canadá (0.7% y 0.9%, respectivamente) (Christianson, et al., 2010, Rodwell, et al., 2012), mientras que en el resto del país no se ha reportado. El linaje Cameroon es predominante en África, en la región Sur Occidental de Ghana fue reportado en el 45.3% de los casos con TB (Yeboah, et al., 2011) y en Camerún en el 42% (Niobe, et al., 2003). La alta frecuencia de este linaje, puede deberse a que Baja California al colindar con EE.UU. recibe migrantes africanos que llegan inicialmente a Guatemala o Belice que después cruzan a México con la finalidad de llegar a EE.UU. y Canada; hasta el 2012 el 0.3% fueron migrantes provenientes de África (Unidad de Política Migratoria, 2012), país con un alto número de casos de TB a nivel mundial (26%)(OMS, 2012).

### **Linaje Uganda I**

El linaje Uganda I fue el segundo linaje predominante en Uganda, identificado en el 14% de los aislados, siendo el linaje Uganda II el predominante (Nabyonga, et al., 2011). En este estudio fue identificado en el

8.5% de los aislados, similar a lo reportado en San Diego en 6.6% aislados (Rodwell, et al., 2012). En Monterrey fue identificado dentro del linaje T, como T2-Uganda en un aislado (0.5%), por lo que la alta frecuencia de este linaje en el estado puede deberse al alto flujo migratorio entre California y Baja California (60 mil vehículos y 30 mil peatones por día) (Instituto Nacional de Migración, 2013).

### **Linaje Beijing**

El linaje Beijing es endémico de Asia Oriental (China, Corea, Japón, etc.), pero en los últimos años se ha diseminado a todos los continentes (Wirth, et al., 2008). En América del Norte representa alrededor del 20% de los casos (Demay, et al., 2012). En este estudio fue altamente frecuente (5.6%) en comparación con lo reportado a nivel nacional (menos del 1%) (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013), sin embargo fue menos frecuente a lo reportado en San Diego, California, donde fue reportado en 9.5% de los aislados (Rodwell, et al., 2012). La diferencia en la frecuencia del linaje en ambos países puede deberse al gran número de personas de origen asiático que alberga EE.UU., principalmente de los países de China, Filipinas y Vietnam (25% de la población foránea en EE.UU.) (CDC, 2012). La identificación de este linaje es de vital importancia ya

que los miembros de la familia Beijing presentan altas tasas de resistencia a múltiples fármacos (Niemann, et al., 2010a, Varghese, et al., 2012).

### **Linaje Ghana**

El linaje Ghana es predominante en África pero se encuentra distribuido tanto en Europa como en América (Wirth, et al., 2008). Fue identificado en el 5.6% de los aislados, superior a lo reportado en San Diego en 0.6% aislados (Rodwell, et al., 2012), pero menor a lo reportado en Veracruz donde el 10% de los aislados pertenecían a este linaje (Pérez, 2013). Es el segundo linaje predominante en la región Sur Occidental de Ghana, identificado en 16.9% aislados (Yeboah, et al., 2011).

### **Linaje EAI**

En esta investigación el linaje EAI fue identificado en el 2.3% de los aislados, a diferencia de lo reportado en San Diego, California donde fue el principal linaje (30.9%) (Rodwell, et al., 2012). Asimismo, este linaje representa el 23.7% de los casos con TB en el país (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013). El linaje EAI pertenece al grupo de los linajes Asiáticos como Beijing y CAS (Brudey, et al., 2006), es prevalente en el norte de Europa, sur y sureste de Asia identificado en

el 25%, 37% y 33% de los casos con TB, respectivamente (Demay, et al., 2012).

### **Linaje X**

En esta investigación fue el linaje de menor frecuencia, identificado en un solo aislado (0.5%), lo que difiere con lo reportado en San Diego donde el 6.6% de los aislados pertenecían a este linaje (Rodwell, et al., 2012). Asimismo, estudios nacionales lo han reportado con mayor frecuencia, en el 10.7% de los casos con TB (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013). El linaje X es altamente prevalente en América del Norte y América Central (22% y 12%) (Brudey, et al., 2006); particularmente en Estados Unidos y el Caribe (8.2%) (Demay, et al., 2012).

### **Linaje Bovis**

El 1.9% de los pacientes fue reportado como linaje Bovis, lo cual coincide con lo reportado en otros estudios realizados en el centro y norte del país (2%) (López, et al., 2010, Martínez, et al., 2013, Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013). Es importante destacar que todos los pacientes identificados como bovis, presentaban TB pulmonar, lo que sugiere que la transmisión fue de persona a persona por vía aérea; esto es importante ya que generalmente *M. bovis* se asocia a TB extrapulmonar ya que es adquirida por la

ingestión de leche o queso contaminado generando lesiones no pulmonares, por lo tanto *M. bovis* raramente es identificado como agente causal de la TB pulmonar. Sin embargo, estudios realizados en el país han identificado resultados similares a los reportados en esta investigación, López y colaboradores en San Luis Potosí identificaron cinco espoligotipos (2.1%) de *M. bovis* de casos confirmados con TBP (López, et al., 2013, Milián, et al., 2010) identificaron 18 espoligotipos de *M. bovis* que se obtuvieron de muestras de esputo y Toledo et al. (1999). identificaron tres aislados de *M. bovis* en muestras de expectoración de pacientes humanos

### **Linaje no definido o huérfano**

El 14.6% de los aislados no pudieron ser clasificados dentro de un linaje en la base de datos de *MIRU-VNTR plus*. Estudios a nivel nacional han reportado resultados similares que van desde el 3% al 25% de aislados no identificados con espoligotipado y 12 MIRU-VNTR (Molina, et al., 2010, Nava, et al., 2011, Pérez, 2013). A nivel mundial también se han reportado aislados sin clasificar con las diversas técnicas de espoligotipado, 12, 15 y 24 MIRU-VNTR. En Colombia el 28% de los aislados fueron huérfanos con el set de 12 MIRU (Cerezo, et al., 2012), en Canadá el 3.8% con 12 MIRU y el 66% con 24 MIRU fueron desconocidos (Christianson, et al., 2010, Rodwell, et al., 2012), mientras que en Uganda el 25.7% con 15 MIRU no fueron definidos (Nabyonga, et al., 2011). La identificación de aislados no definidos sugiere la presencia de cepas

endémicas de Baja California o del país, es decir cepas que no han sido reportadas en otras partes del mundo. Es importante, resaltar que estos linajes fueron identificados con la base de datos MIRU-VNTR *plus*, la cual cuenta con un número muy reducido de cepas de referencia (186), lo que puede generar una alta frecuencia de aislados no definidos. Además, el set que se utilizó en este estudio fue el de 12 loci MIRU-VNTR, el cual tiene un menor poder de discriminación, comparado con el set de 15 ó 24, o bien 12MIRU-VNTR combinado con espoligotipado. Por tal motivo, es posible que el porcentaje de aislados no definidos llegue a disminuirse cuando se analicen con el set de 15 o 24 loci. El análisis de mínima expansión, asocia los aislados no definidos con varios linajes: Cameroon, Haarlem, Uganda I, LAM, S y X, lo que sugiere que dichos aislados presentan similitudes con cepas de África y América Latina, sin embargo, esto no se puede aseverar debido al número de loci que se utilizó en este estudio.

### **Diversidad genética**

Se genotiparon 213 aislados de los cuales se identificaron 95 genotipos, 66 fueron únicos y 29 en clúster, diversidad mayor a lo reportado en diferentes estados del país por medio de espoligotipado. En Acapulco, Guerrero se analizaron 330 aislados y se identificaron 85 genotipos: 59 únicos y 26 en clúster (Nava, et al., 2011) mientras que en Monterrey fueron analizados 180 aislados y se obtuvieron 50 genotipos: 24 únicos y 26 en clúster (Molina, et al.,

2010). En la ciudad de México utilizando IS6110, espoligotipado y MIRU-VNTR 12 loci se analizaron 67 aislados de personas VIH+ y se obtuvieron un total de 40 genotipos, 5 en clúster y 35 únicos solamente con 12 MIRU (López, et al., 2010). A nivel mundial, en Rusia se analizaron 92 aislados de *M. tuberculosis* con 12 MIRU identificando 47 genotipos, 38 únicos y 9 en clúster (Kovalev, et al., 2005), en Colombia utilizando el mismo set de 12 MIRU se identificaron 93 genotipos de 152 aislados, de los cuales 72 fueron únicos y 21 en clúster (Cerezo, et al., 2012), siendo similar a lo reportado en este estudio; sin embargo, al comparar con San Diego, California la diversidad en la presente investigación fue mucho menor, ya que de 832 aislados analizados en San Diego se identificaron 446 genotipos de los cuales 352 fueron únicos y 94 en clúster (Rodwell, et al., 2012)., cabe destacar que la proporción de linajes únicos en San Diego fue muy alta, lo cual puede explicarse por el método empleado que fue la combinación de 12 MIRU-VNTR y espoligotipado que proporciona un mayor poder de discriminación que el conjunto de 12 MIRU-VNTR por si solo (Maes, et al., 2008).

### **Tasa de transmisión**

Se determinó una tasa de transmisión de 55.3%, similar a lo reportado en Colombia y en San Diego, California de 52.6% y 58%, respectivamente (Cerezo, et al., 2012, Rodwell, et al., 2012). En contraste, fue menor a la tasa



reportada en Guerrero de 68% y Canadá de 75.7% (Christianson, et al., 2010, Nava, et al., 2011) y mayor a lo reportada en Marruecos de 37% (Tazi, et al., 2007) y en Uganda de 17% con el set de 15 MIRU (Nabyonga, et al., 2011). Es posible que la tasa de transmisión estimada en este estudio puede estar sobreestimada por el número de loci utilizado, ya que se ha reportado que el set de 12 locus puede sobreestimar la proporción de agrupamiento de 20% a 30% (Christianson, et al., 2010, Maes, et al., 2008, Supply, et al., 2006).

El linaje Cameroon reportó la mayor tasa de agrupamiento (78.9%), es decir, la mayoría de los casos de TB identificados con este linaje son de transmisión reciente. Los linajes LAM y Beijing presentan una tasa de transmisión del 50%, por lo que la mitad de los casos reportados son por reactivación y la otra mitad por transmisión reciente. Los aislados con linaje no definido, fueron los que presentaron la menor tasa de transmisión (38.7%).

Se identificaron 10 complejos clonales (CC), de los cuales el CC6 agrupó el mayor número de aislados del linaje S con una tasa de agrupamiento del 90%, es decir, existe muy poca variabilidad genética dentro del CC e indica que solo el 10% de los aislados del linaje S no están relacionados genéticamente con el resto de los aislados del mismo linaje. El CC1 agrupó todos los aislados de los linajes Cameroon, Haarlem, Uganda I, X y No definido,

sin embargo, se identificaron aislados de los linajes LAM y S; la tasa de agrupamiento fue de 53% lo que indica que existe una alta diversidad genética dentro de este CC, ya que engloba siete linajes de 11 identificados en este estudio. El resto de los aislados del linaje LAM se agruparon en cuatro CC, tres de los cuales no reportaron tasa de agrupamiento, mientras que el CC2 del mismo linaje reportó una tasa de agrupamiento de 61%, por lo tanto se puede inferir que los aislados dentro de este linaje presentan una alta variabilidad genética. Cabe mencionar que los aislados no agrupados dentro de los CC (32), son aislados que presentan dos o más locus MIRU de diferencia respecto al resto, lo cual puede deberse al poder de discriminación del método de 12 MIRU.

En el análisis comparativo entre la investigación realizada en San Diego, California y el presente estudio, se compararon 316 genotipos de San Diego y 88 genotipos de Baja California. Solo 45 (12.5%) genotipos compartían ambos estados. Esto sugiere que el flujo de transmisión de la TB en ambos estados es principalmente de California a B.C. lo cual se corrobora con el alto número de genotipos únicos (352) reportados en San Diego. En el 2012, 352 mil mexicanos fueron devueltos a México por las autoridades de EE.UU., hecho que puede contribuir a la dispersión de la TB de California a B.C.

## **MIRU-VNTR *plus* vs SITVIT**

MIRU-VNTR *plus* y SITVIT son dos bases de datos que permiten comparar y analizar las cepas del complejo *M. tuberculosis* con cepas de referencia para asignar la especie, linaje y genotipo. SITVIT contiene datos de espoligotipos de un gran número de cepas de origen diverso y permite analizar datos generados por espoligotipo, 12 MIRU-VNTR y VNTR o combinados (Demay, et al., 2012), a diferencia de MIRU-VNTR *plus* que permite analizar datos de 24 MIRU-VNTR, espoligotipo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), RFLP-IS6110 y datos de sensibilidad a fármacos, además permite crear arboles filogenéticos y de mínima expansión para determinar la relación genética entre las cepas (Weniger, et al., 2010), servicios que SITVIT no genera.

En total en este estudio se logró asignar 141 aislados en 41 MIT's, siendo el MIT279 el más frecuente, seguido de MIT25 y MIT45. Comparando nuestros resultados con la base de datos SITVIT que incluye 6,626 aislados agrupados en 847 MIT's; el MIT279 ha sido reportado en los países de Australia, Bélgica e Italia en el 0.1% (7) de los aislados (Demay, et al., 2012), a diferencia del 14.1% (20) reportado en este estudio, lo cual es un hallazgo importante ya que no se ha reportado en tan alta frecuencia. Todos los aislados incluidos dentro de este MIT fueron del linaje S, el segundo linaje predominante

en este estudio y altamente frecuente en América del Norte (Christianson, et al., 2010, Rodwell, et al., 2012) .

El MIT25 se ha reportado en 0.5% (31) aislados, en Australia, Bélgica, Brasil, España, Croacia, Reino Unido, Francia, Haití y Sudáfrica (Demay, et al., 2012). En Colombia 111 aislados fueron agrupados en 51 MIT's donde el MIT25 fue el tercer MIT predominante en 8.1% (9) de los aislados a diferencia del 7.5% (18) en este estudio (Cerezo, 2009). Los aislados dentro de este MIT fueron identificados dentro del linaje LAM, linaje predominante en este estudio.

El MIT45 es uno de los tres principales MIT reportados en la base de datos SITVIT representando el 3.4% (226) de los aislados y se ha reportado en Australia, Bélgica, Ecuador, Bolivia, Croacia, EE.UU., Sudáfrica, Singapur, Rusia, Polonia, Turquía, Italia, India, Reino Unido y Bulgaria (Demay, et al., 2012). Fue el segundo MIT más frecuente en Colombia en 9% (10) de los aislados a diferencia del 5.4% (13) reportado en este estudio (Cerezo, 2009). Este MIT agrupó aislados del linaje Haarlem, el tercer linaje predominante en este estudio.

## **Análisis epidemiológico**

El mayor número de pacientes diagnosticados con TB reportó edades entre los 20 y 50 años, siendo el sexo masculino el más afectado. La edad promedio entre los hombres fue mayor que el de las mujeres (36 años  $\pm$ 13.1 y 30 años  $\pm$ 13.2). Reportes nacionales e investigaciones entre la frontera México-EE.UU. presentan resultados similares entre los 25 y 44 años (Rodwell, et al., 2008, Schneider, et al., 2004, Secretaría de Salud, 2012). Esto sugiere que en sentido general la TB afecta principalmente a personas jóvenes adultas, que es el grupo de edad económicamente más activo y al sexo masculino por sus actividades sociales y laborales (González, et al., 2010) Secretaría de Salud 2012.

El 68.1% de los pacientes reportaron bajo nivel de educación (sin estudios, 7.6%; primaria, 30.5% y secundaria 30.5%), de los cuales el 58.1% son desempleados. Diversos estudios indican que el bajo nivel de estudio y el desempleo son factores que están relacionados con el abandono al tratamiento de la TB, principalmente por la falta de conocimiento sobre el tratamiento bajo supervisión (Albuquerque, et al., 2007, Gopi, et al., 2007) (Jakubowiak, et al., 2007, Mishra, et al., 2005). Sin embargo, en este estudio el grupo de pacientes con bajo nivel de estudio fueron los que presentaron un mayor porcentaje de abandono, mientras que de los pacientes desempleados, solo el 17.6% abandono el tratamiento comparado con el 42.8% que egreso como curado.

La mayoría de los pacientes (75.7%) ingresaron como casos nuevos, es decir, que nunca habían sido diagnosticados anteriormente con TB. Esto coincide con la alta tasa de incidencia de TB para el Estado de Baja California. En contraste, solo el 1% se reportó como fracaso y xx% como recaídas, es decir, el tratamiento antituberculoso que les fue administrado no funcionó, y se tuvo que iniciar un nuevo tratamiento. Este bajo porcentaje de fracaso está relacionado con la alta tasa de curación (> 90%) que reporta Baja California, superior a lo que establece la OMS. La alta tasa de curación y la baja tasa de fracasos, en los casos nuevos, puede estar relacionado con el linaje que presentan los aislados, siendo LAM y S, de los cuales no se ha reportado asociación con casos de farmacorresistencia. En contraste, los casos que ingresaron como recaída, fracaso o reingreso solo el 54.5% (6) se curaron y el 18% (2) fallecieron al recibir tratamiento primario. Este bajo porcentaje de curación puede relacionarse, que la mayoría de estos pacientes, pertenecían a linajes como Beijing, Uganda I, Cameroon y Ghana, los cuales están asociados con farmacorresistencia.

El esquema de tratamiento aplicado a los pacientes con TB en Baja California es con base a los lineamientos del Comité Estatal de Farmacorresistencia (COEFAR) de la Secretaría de Salud. Dicho esquema establece que: Todo paciente que inicia tratamiento por primera vez recibe tratamiento primario acortado con una duración de 6 meses, si el paciente abandona, fracasa o recae se le realiza cultivo microbiológico y prueba de

sensibilidad antimicrobiana para establecer tratamiento individualizado y así lograr mayor porcentaje de curación. En este estudio, el esquema de tratamiento primario acortado además de ser aplicado en casos nuevos también se aplicó al 14% (25) de los pacientes que ingresaron como recaída y reingreso, por lo que estos pacientes no iniciaron tratamiento según lo establecido por la COEFAR. Lo anterior sugiere que a un gran número de pacientes no se les aplicó el tratamiento correcto, ya que estudios nacionales e internacionales han reportado asociación entre linaje y farmacorresistencia (Beijing, Uganda I, Ghana, Cameroon, Harlem) (Niemann, et al., 2010a, Varghese, et al., 2012) Por otro lado, las consecuencias de no dar el tratamiento adecuado al pacientes es que se incrementa la posibilidad de farmacorresistencia secundaria, ya que los casos que ingresan como recaída y reingreso son diagnosticados como farmacorresistentes y se les aplica un tratamiento individualizado (Secretaría de Salud, 2010).

En México se aplica la estrategia TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) como estándar para tratar al paciente con TB. Esta estrategia tiene como objetivo elevar los porcentajes de curación y disminuir las tasas de abandono al tratamiento. En este estudio, el porcentaje de curación de los pacientes que recibieron tratamiento primario acortado por 6 meses siguiendo la estrategia TAES, fue de 54.9%, similar a lo reportado en otro estudio realizado en Baja California donde el porcentaje de curación fue de 56.3% (Luna, et al., 2008). La Secretaría de Salud reporta hasta el 2011 que

71.7% con baciloscopia positiva se curaron (Secretaría de Salud, 2012). Por lo que, nuestro porcentaje es muy bajo comparado con la Secretaria de Salud y la OMS donde el porcentaje mínimo de curación mediante TAES es del 85% (OMS, 2012). La diferencia en porcentajes puede deberse un diagnóstico erróneo y a un esquema de tratamiento equivocado.

### **Lugar de nacimiento**

Con relación al lugar de nacimiento, la población foránea fue la predominante en este estudio (53.3%), la cual es ligeramente mayor a lo reportado (41.2%) por INEGI (2011) y Gobierno del Estado de Baja California (2010). El mayor número de pacientes foráneos provienen de Sinaloa (6.7%), Jalisco (4.5%), Nayarit (4.8%) y Veracruz (4.3%), estados, que también presentan altas de incidencia de TB (Secretaría de Salud, 2012). Es decir, el mayor número de personas migrantes que llegan a Baja California, presentan una alta probabilidad de venir infectadas con micobacterias del complejo de TB, o bien ya vienen enfermas de TB, en ambos casos, el riesgo de dispersar el bacilo en la región muy alta.

En el 2010, México ocupó el primer lugar en el número de emigrantes internacionales con 11.9 millones de personas, esta cifra representa alrededor del 10% de la población total mexicana. Baja California es uno de los estados de la frontera norte que concentra un gran número de migrantes principalmente



en el municipio de Tijuana. Al igual que en otras ciudades fronterizas, el crecimiento demográfico en Tijuana se debe principalmente al intenso flujo migratorio de personas procedentes del sur del país que tienen como destino los principales centros urbanos de la región. La importancia de esta ciudad como polo de atracción de población migrante interna e internacional se explica tanto por su desarrollo económico, basado en el comercio, los servicios y la industria maquiladora, así como por su posición geográfica, que históricamente ha servido como estación de paso para los migrantes internacionales que llegan a las ciudades fronterizas para cruzar a Estados Unidos. A estas dinámicas se añaden los movimientos de la población que tiene su residencia en las ciudades fronterizas de ambos países y que cotidianamente cruza la frontera de forma legal para trabajar, ir de compras, visitar a familiares, hacer negocios, etc. Además, desde el sur de México llegan a esta zona miles de migrantes centroamericanos, provenientes de Guatemala, Honduras y El Salvador principalmente, con la intención de cruzar a Estados Unidos (Instituto Nacional de Migración, 2013). Por lo tanto el alto flujo migratorio pudiera ser un factor que favorece la dispersión de la TB dificultando su control, ya que la mayoría de los migrantes son ilegales que no permanecen en un solo lugar de la región fronteriza, viven en hacinamiento y no acuden a los servicios de salud (OPS, 2011), por miedo de tener algún tipo de problema legal.

## **Enfermedades asociadas**

Más de la mitad de los pacientes (55.1%) no presentaron ninguna enfermedad asociada, y son los que presentaron el mayor porcentaje de curación, sin embargo, dentro de las enfermedades asociadas, el binomio TB-DM, fue el de mayor porcentaje (11.9%), de los cuales el 34.6% de los pacientes se curaron y 7.6% fracasaron al tratamiento. En el 2011 la Secretaría de Salud reportó que la TB presenta mayor asociación con DM (23.4%) (Secretaría de Salud, 2012), sin embargo, en Veracruz arriba del 30% de los pacientes reportan este binomio (Pérez, et al., 2011, Ponce de León, et al., 2004). Baja California presenta una prevalencia de DM de 9.3 - 10.1 por 100 mil hab, similar a lo reportado en Veracruz, quien presenta el primer lugar en incidencia de DM a nivel nacional, sin embargo, los casos del binomio TB-DM en Baja California fue la mitad a Veracruz, lo cual pudiera estar relacionado con el control de la glucemia en los pacientes. Esto ultimo no puede aseverarse, debido a que no se cuenta con informacion clinica que permita determinar si los pacientes con TB en Baja California, tienen mayor control de la DM con respecto a los de Veracruz, sin embargo, esta pregunta queda abierta para estudios posteriores. La relación de ambas enfermedades es importante, ya que las personas con DM tienden a desarrollar de 2 a 3 veces más TB, presentan mayor riesgo de muerte durante el tratamiento de TB y son propensos a sufrir recaída después de terminar el tratamiento, tal como lo

reportado en este estudio donde tres de los pacientes fallecieron y cuatro ingresaron como recaída.

La infección por VIH/SIDA se encuentra fuertemente ligada a la TB. Un estudio realizado en un centro de readaptación en Baja California, mostró que el 7.6% de los pacientes presentaban el binomio TB-VIH/SIDA (Cerecer, et al., 2006), similar a lo reportado en esta investigación donde el 6% de los pacientes padecían la comorbilidad VIH-TB el cual es un resultado alarmante ya que la mortalidad en pacientes con TB-VIH/SIDA es más alta que la causada por solo una de las enfermedades, sin embargo en este estudio los pacientes con el binomio egresaron principalmente como curados y solo uno falleció. Por otra parte, se ha observado que la pandemia del VIH/SIDA está afectando profundamente las características clínico-patológicas de la TB y está funcionando como una fuente generadora de cepas multi-drogoresistentes (Pozniak, 2001), tal como lo indican López y colaboradores (2010), donde el 39.6% de los aislados fueron resistentes a uno o más fármacos.

En la presente investigación se registró una asociación entre TB y alcoholismo de 8.6% (18), similar a lo reportado por la Secretaría de Salud de 5.1% (Secretaría de Salud, 2012). Una de las complicaciones médicas apreciadas en el abuso del alcohol es la alteración en la regulación inmune que

conlleva inmunodeficiencia, posiblemente por alteración en el equilibrio de las citoquinas. Como consecuencia aumenta la susceptibilidad a la neumonía bacteriana y a la tuberculosis (Cook, 1998). Se ha reportado que personas que consumen alcohol tienen mayor riesgo de desarrollar TB multirresistente, en Lima, Perú el 54.5% de los pacientes multirresistentes consumían excesivamente alcohol (Musayón, 2009), mientras que en el estado de Veracruz el 8% de los pacientes con TB multirresistente consumían alcohol (Rubí, 2009). Por otra parte, el alcoholismo ha sido considerado una causa determinante en el abandono del tratamiento de la TB (Anibarro, et al., 2004, Bustamante, et al., 1996, Musayón, 2009), sin embargo, en este estudio solo el 22.3% (4) de los pacientes con TB-alcoholismo abandonaron el tratamiento, a diferencia de lo reportado en Chiapas donde el 45.9% de los consumidores de alcohol abandonaron el tratamiento (Meza, et al., 1999). La baja asociación con el alcohol puede deberse a que Baja California presenta cifras bajas de abuso y dependencia al alcohol de 2.4 en hombres y 0.6 en mujeres a diferencia de la media nacional de 9.7 en hombres y 1.7 en mujeres (CONADIC, 2012).

## 8. CONCLUSIONES

---

1. Además de *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* también fue identificado como agente causal de TB pulmonar en la población de estudio.
2. La gran variedad de linajes identificados en Baja California es reflejo del alto flujo migratorio de personas provenientes del sur del país y/o EE.UU.
3. El linaje LAM fue el predominante, que era lo esperado ya que es altamente frecuente en América latina y se ha reportado en centro-norte de México y EE.UU.
4. El linaje S fue altamente frecuente a diferencia de lo reportado en América latina y centro -norte del México, por lo que la alta frecuencia en Baja California puede estar relacionada con la alta migración entre Canadá, EE.UU y México.
5. La frecuencia de los linajes Ghana, Cameroon y Uganda I en la región, fue mayor que en EE.UU y en el centro-norte del país, lo cual puede deberse a que B.C. es uno de los principales estados fronterizos que recibe migrante africanos que cruzan a EE.UU.
6. Los linajes predominantes en el centro-norte del país y EE.UU. como EAI y X fueron poco frecuentes en Baja California.

7. La presencia del linaje Beijing puede corroborar la alta prevalencia de cepas farmacorresistentes en la región.
8. La diversidad genética fue mayor que en el centro-norte del país.
9. La tasa de transmisión reciente fue de 55.3%, lo que sugiere que un poco más de la mitad de los casos con TB en B.C. fueron el resultado de transmisión reciente por cepas que han estado circulando en la región o cepas nuevas, mientras que la otra mitad fue por reactivación.
10. El linaje No definido presentó la menor tasa de agrupamiento, lo que sugiere que existe una alta variabilidad genética entre las cepas únicas de la región o del país y la transmisión de estas cepas fue por reactivación.
11. El 12.5% de los genotipos identificados en Baja California coinciden con los genotipos de San Diego, lo que corrobora la dispersión de las cepas de TB entre fronteras.
12. En la población de estudio, el sexo masculino fue el más afectado con TB entre los 20 y 50 años, siendo la escolaridad predominante primaria y secundaria. La mayoría de los pacientes estaban desempleados y un poco menos de la mitad fueron originarios de otros estados de la república.

13. El 14% de los pacientes no recibió tratamiento según lo establecido por la COEFAR, mientras que el porcentaje de curación fue menos a lo establecido a nivel internacional con tratamiento por seis meses (54.9% vs 85%).
  
14. No se reportó asociación estadísticamente significativa entre variables epidemiológicas y linajes.

## 9. RECOMENDACIONES

---

La presencia del linaje Bovis en la población de estudio permite sugerir que se realicen más estudios que determinen la incidencia real de TB producida por *M. bovis*, así como la identificación de especie previamente a la aplicación del tratamiento, con el fin de administrar el tratamiento adecuado a cada uno de los pacientes y asegurar la recuperación exitosa del individuo.

La identificación de los linajes en las distintas regiones del país, puede aportar información importante para el sector salud en la prevención y tratamiento de los casos con TB, ya que existe asociación entre linajes y farmacorresistencia. Por lo que se recomienda que se generen programas de vigilancia epidemiológico-molecular donde se apliquen de manera rutinaria los marcadores moleculares utilizados en esta investigación para generar información sobre las características genéticas de las cepas infectantes en la región y así asegurarle al paciente el éxito del tratamiento.

El 14% de los pacientes no recibió tratamiento según lo establecido por la COEFAR y el porcentaje de curación fue menor a lo establecido a nivel internacional con tratamiento por seis meses. Por lo que se sugiere a la Secretaria de Salud en Baja California se cambien los lineamientos de tratamiento para los casos de recaída, fracaso y reingreso y se les aplique tratamiento individualizado con previa baciloscopia, cultivo microbiológico y pruebas de sensibilidad a fármacos



## 10. REFERENCIAS

---

- Abadía, E, Sequera, M, Ortega, D, Méndez, M, Escalona, A, Da Mata, O, Izarra, E, Rojas, Y, Jaspe, R, Motiwala, A, Alland, D, de Waard, J, Takiff, H. 2009, *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BioMed Central Infectious Diseases* 9 (122), 1-12,
- Albuquerque, M, Alencar, R, Lucena, N, Souza, W, Tavares, A, Souza, O, Cunha, L. 2007, Factors associated with treatment failure, dropout, and death in a cohort of tuberculosis patients in Recife, Pernambuco State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 23 (7), 1573-1582,
- Alonso, A, Martínez, M, Herránz, M, Sanchez, M, Barroso, P, INDAL-TB group, Bouza, E, García, D. 2008, Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BioMed Central Microbiology* 8 (34), 1-9,
- Allix-Béguec, C, Harmsen, D, Weniger, T, Supply, P, Niemann, S. 2008a, 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 of clinical microbiology* 46 (8), 2692–2699,
- Allix-Béguec, C, Harmsen, D, Weniger, T, Supply, P, Niemann, S: MIRU-VNTRplus Help, pp. 1-61. 2008b
- Allix-Béguec, C, Supply, P, Fauville-Dufaux, M. 2004, Utility of fast *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeat* Genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clinical Infectious Diseases* 39 783-789,
- Anibarro, L, Liresb, J, Iglesias, F, Vilariñod, C, Baloriad, A, De Lise, J, Ojeaa, R. 2004, Factores sociales de riesgo para la falta de cumplimiento

terapéutico en pacientes con tuberculosis en Pontevedra. *Gaceta Sanitaria* 18 (1), 38-44,

- Aranaz, A, Cousins, D, Mateos, A, Domínguez, L. 2003, Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 1785–1789,
- Bakshi, C, Shah, D, Verma, R, Singh, R, 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,
- Borrell, S, Español, M, Orcau, A, Tudó, G, March, F, Caylá, J, Jansá, J, Alcaide, F, Martín, N, Salvadó, M, Martínez, J, Vidal, R, Sanchez, F, Altet, N, Rey, E, Coll, P, González, J. 2010, Tuberculosis transmission patterns among Spanish-born and foreign-born populations in the city of Barcelona. *Clinical Microbiology Infection* 16 568–574,
- Brudey, K, Driscoll, J, Rigouts, L, Prodinger, W, Gori, A, Al-Hajoj, S, Allix, C. 2006, *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology* 6 (23), 1-17,
- Bustamante, L, Bellido, F, Riojas, O, Borja, V, Yáñez, L, Becerra, F. 1996, Características sociodemográficas de personas que murieron por tuberculosis pulmonar en Veracruz, México *Salud Pública de México* 38 (5), 323-331,
- Candia, N, Lopez, B, Zozio, T, Carrivale, M, Diaz, C, Russomando, G, Romero, N, Jara, J, Barrera, L, Rastogi, N, Ritacco, V. 2007, First insight into

*Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. BMC Microbiology 7 (75),

Cardoso, M, Gomes, H, Willery, E, Possuelo, L, Valéria, K, Lima, B, Allix-Béguec, C, Loch, C, Olivier, Y, Gutierrez, M, Suffys, P, Supply, P. 2011, The forest behind the tree: Phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. Plos One 6 (3),

Cave, M, Eisenach, K, McDermott, P, Bates, J, Crawford, J. 1991, IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. Molecular Cell Probes 5 73-80,

CDC: Reported Tuberculosis in the United States 2012. 2012

Cerecer, P, Aranda, J, Márquez, A, Patiño, E, Hurtado, J, Rangel, M. 2006, Tuberculosis en un centro de readaptación social del noroeste de México: estudio retrospectivo del periodo 1999-2000, Tijuana, Baja California. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 26 (4), 94-100,

Cerezo, I, Jiménez, Y, Hernandez, J, Zozio, T, Murcia, M, Rastogi, N. 2012, A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. Infection, Genetics and Evolution 12 657-663,

Cerezo, M: Tipificación de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en Bogotá mediante la técnica molecular MRUs-VNTR. In: Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2009

Citizenship and Immigration Canada: Canada facts and figures immigration overview permanent and temporary residents. 2012

CONADIC: Programa contra el alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas: Actualización 2011-2012 2012

- Cook, R. 1998, Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system—a review. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 22 (9), 1927-1942,
- Cowan, L, Diem, L, Monson, T, Wand, P, Temporado, D, Oemig, T, Crawford, J. 2005, Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *Journal of clinical microbiology* 43 (2), 688–695,
- Cowan, L, Mosher, L, Diem, L, Massey, J, Crawford, J. 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 (5), 1592–1602,
- Cubillos, A, Sandoval, A, Ritacco, V, López, B, Robledo, J, Correa, N, Hernandez, I, Zambrano, M, Del Portillo, P. 2010, Genomic signatures of the Haarlem lineage of *Mycobacterium tuberculosis*: implications of strain genetic variation in drug and vaccine development *Journal of clinical microbiology* 48 (10), 3614–3623,
- Chola, I, Lee, J, Allix-Béguet, C, Jin Cho, E, Lee, J, Rajan, V, Gae, E, Hong, J, Carroll, M, Goldfeder, L, Kim, J. 2010, Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a Tertiary Care Tuberculosis Hospital in South Korea. *Journal of clinical microbiology* 48 (2), 387–394,
- Christianson, S, Wolfe, J, Orr, P, Karlowsky, J, Levett', P, Horsman, G, Thibert, L, Tang, P, Sharma, M. 2010, Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Canada. *Tuberculosis* 90 31-38,
- Dankner, W, Davis, C, . 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,

- de Kantor, I, LoBue, P, Thoen, C. 2010, Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 14 1369-1373,
- De la Rua, 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,
- Del portillo, P, Murillo, L, Patarroyo, M. 1991, Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. Journal of clinical microbiology 29 (10), 2163-2168,
- Demay, C, Liens, B, Burguière, T, Hill, V, Couvin, D, Millet, J, Mokrousov, I, Sola, C, Zozio, T, Rastogi, N. 2012, SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infection, Genetics and Evolution 12 755–766,
- Dickman, K, Nabyonga, L, Kateete, D, Katabazi, F, Asiimwe, B, Mayanja, H, Okwera, A, Whalen, C, Joloba, M. 2010, Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. Biomed Central Infectious Diseases 10 (349), 1-8,
- Driscoll, J. 2009, Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Methods Molecular Biology 551 117-128,
- Garfein, R, Burgos, J, Rodriguez, A, Brodine, S, Pietrucha, A, Rondinelli, A, Laniado, R, Ibarra, E, Can˜ez, A, Fraga, M. 2010, Latent tuberculosis infection in a migrant agricultural community in Baja California, Mexico. Journal of immigrant minority health 13,

- Gibson, A, Brown, T, Baker, L, Drobniewski, F. 2005, Can 15-locus mycobacterial interspersed repetitive unit–variable number tandem repeat analysis provide insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*? Applied and Environmental Microbiology 71 (12), 8207–8213,
- Gilbert, R, Antoine, D, French, C, Abubakar, I, Watson, J, Jones, J. 2009, The impact of immigration on tuberculosis rates in the United Kingdom compared with other European countries. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 13 (5), 645-651,
- González, N, Di Vasto, G, Rodríguez, O, Barranco, L. 2010, Comportamiento clínico epidemiológico de la tuberculosis pulmonar. Revista Archivo Médico de Camagüey 14 (4), 1-12,
- Gopi, P, Vasantha, M, Muniyandi, M, Chandrasekaran, V, Balasubramanian, R, Narayanan, P. 2007, Risk factors for non-adherence to directly observed treatment (DOT) in rural tuberculosis unit, South India. Indian Journal of Tuberculosis 54 66-70,
- Hill, V, Zozio, T, Sadikalay, S, Viegas, S, Streit, E. 2012, MLVA based classification of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages for a robust phylogeographic snapshot of its worldwide molecular diversity. Plos One 7 (9),
- Hlavsa, M, Moonan, P, Cowan, L, Navin, T, Kammerer, S, Morlock, G, Crawford, J, LoBue, F. 2008, Human Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995–2005. Clinical Infectious Diseases 47 168–175,
- Homolka, S, Post, E, Oberhauser, B, Garawani, A, Westman, L, Dafaie, F, Rüsçh, S, Niemann, S. 2008, High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. BMC Microbiology 8 (103), 1-8,

- 44 Hunter, P, Gaston, M. 1988, Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology* 26 (11), 2465-2466,
- INEGI: Censo de Población y Vivienda 2010: Tabulados del Cuestionario Básico, Migración 2. 2011
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos: Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico, Mexico, D.F., 2003
- Instituto Nacional de Migración: Encuesta sobre Migración en la Frontera Norte de México, 2011, pp. 1-397. 2013
- Jakubowiak, W, Bogorodskaya, E, Borisov, E, Danilova, D, Kourbatova, E. 2007, Risk factors associated with default among new pulmonary TB patients and social support in six Russian regions. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 11 (1), 46-53,
- 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 (4), 907-914,
- Koch, M, Cote, R. 1965, Comparison of fluorescence microscopy with Ziehl-Neelsen stain for demonstration of acid-fast bacilli in smear preparations and tissue sections. *American Review Respiratory Disease* 91 283–284,
- Koneman, E, Allen, S, Janda, W, Schreckenber, P, Winn, W. *In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, ed. Wilkins LW. 1997
- Kovalev, SY, Kamaev, EY, Kravchenko, MA, Kurepina, NE, Skorniakov, SN. 2005, Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 9 (7), 746–752,

- Kremer, K, Van Soolingen, D, Frothingham, R, Haas, H, Hermans, P, Martin, C, Palittapongarnpim, P, Plikaytis, B, Riley, L, Yakrus, M, Musser, J, 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. *Journal of clinical microbiology* 37 (8), 2607-2618,
- Kumate, J, Gutiérrez, G: Tuberculosis e infecciones por micobacterias atípicas. *In: Infectología Clínica*, ed. Mendez, pp. 131-147. 2008
- Lari, N, Rindi, L, Bonanni, D, Rastogi, N, Sola, C, Tortoli, E, Garzelli, C. 2007, Three-year longitudinal study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Tuscany, Italy. *Journal of clinical microbiology* 45 (6), 1851-1857,
- Lari, N, Rindi, L, Bonanni, D, Tortoli, E, Garzelli, C. 2006, Molecular Analysis of Clinical Isolates of *Mycobacterium bovis* Recovered from Humans in Italy *Journal of Clinical Microbiology* 44 4218-4221,
- Lee, A, Tang, L, Lim, I, Bellamy, R, Wong, S. 2002, Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. *Journal of clinical microbiology* 40 (2), 657–659,
- López, E, Juárez, J, Riego, L, Enciso, L, Ortega, F, Hernández, J, Enciso, A, López, R. 2013, Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosí, México. *BMC Research Notes* 6 (172), 1-11,
- López, R, Badillo, C, Cerna, J, Castillo, I, Rivera, S, Helguera, A, Aguilar, D, Hernandez, R, Samper, S, Gonzalez, J. 2010, First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. *BMC Microbiology* 10 (82), 1-12,



- Lozano, J. 2002, Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Farmacoterapia* 21 (8), 102-110,
- Luna, Y, Cerecer, P, Ramírez, M, Zonana, A, Anzaldo, M. 2008, Evaluación del tratamiento de la tuberculosis pulmonar en una unidad de medicina familiar en Baja California (México). *Archivos en Medicina Familiar* 10 (2), 47-51,
- Macías-Parra, M, Kumate-Rodríguez, e, Arredondo-García, JL, et al. 2011, *Mycobacterium tuberculosis* complex genotype diversity and drug resistance profiles in a pediatric population in Mexico. *Tuberculosis Research and Treatment*,
- Maes, M, Kremer, K, van Soolingen, D, Takiff, H, H de Waard, J. 2008, 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis* 88 (5), 490-494,
- Martínez, A, Rastogi, N, Couvin, D, Escobar, A, Gonçalves, L, Vazquez, C, Rivera, S, Lozano, D, Vergara, A, Gonzalez, J, Vaughan, G. 2013, Genetic diversity among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* 14 434–443,
- Martínez, C, Hori, S, De la Mora, A, Bermúdez, R, Rentería, T, López, G, Galván, L, Medina, G. 2011, Genotipificación por VNTR de aislados de *Mycobacterium bovis* de ganado sacrificado en Baja California, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 2 (4), 393-401,
- Massey, P, Durrheim, D, Stephens, N, Christensen, A. 2013, Local level epidemiological analysis of TB in people from a high incidence country of birth. *BMC Public Health* 13 (62), 1-7,
- Mazars, E, Lesjean, S, AL, B, 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 (4), 1901–1906,
- Meza, Y, Altúzar, M. 1999, Factores relacionados con el abandono del tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar. Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social 7 (1),
- Mignard, S, Pichat, C, Carret, G. 2006, *Mycobacterium bovis* Infection, Lyon, France Emerging Infectious Diseases 12 1431-1433.,
- Milián, F, Pérez, L, Arriaga, C, Escartín, M. 2010, Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. Preventive Veterinary Medicine 97 37–44,
- Millet, J, Laurent, W, Zozio, T, Rastogi, N. 2011, Finer snapshot of circulating *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Guadeloupe, Martinique, and French Guiana. Journal of clinical microbiology 49 (7), 2685–2687,
- Mishra, P, Hansen, E, Sabroe, S, Kafle, K. 2005, Socio-economic status and adherence to tuberculosis treatment: a case-control study in a district of Nepal. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 9 (10), 1134–1139,
- Molhuizen, H, Bunschoten, A, Schouls, L, Van Embden, J. 1998, Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. Methods in molecular biology 101 381-394,
- Molina, C, Moreno, E, Ocampo, J, Rendon, A, K, B, Kremer, K, Rastogi, N, Welsh, O, Vera, L. 2010, *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, México. Journal of clinical microbiology 48 (2), 448-455,
- Musayón, F: La dependencia alcohólica como factor de riesgo de tuberculosis multidrogo-resistente Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2009

- Nabyonga, L, Kateete, D, Katabazi, F, Odong, P, Whalen, C, Dickman, K, Moses, J. 2011, Determination of circulating *Mycobacterium tuberculosis* strains and transmission patterns among pulmonary TB patients in Kawempe municipality, Uganda, using MIRU-VNTR. Biomed Central Research Notes 4 (280), 1-6,
- Nava, E, López, Y, Harris, E, Morales, A. 2011, Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: spoligotyping and risk factors. Clinical and Developmental Immunology 2011,
- Niemann, S, Diel, R, Khechinashvili, G, Gegia, M, Mdivani, N, Tang, Y. 2010a, *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. Journal of clinical microbiology 48 (10), 3544–3550,
- Niemann, S, Diel, R, Khechinashvili, G, Gegia, M, Mdivani, N, Wei, Y. 2010b, *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Lineage Favors the Spread of Multidrug-Resistant Tuberculosis in the Republic of Georgia Journal of clinical microbiology 48 (10), 3544-3550,
- Niobe, S, Kuaban, C, Sorlin, P, Cunin, P, Thonnon, J, Sola, C, Rastogi, N, Vincent, V, Gutierrez, M. 2003, Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. Journal of clinical microbiology 41 (6), 2547–2553,
- NOM-EM-017-ZOO-2005: Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-017-ZOO-2005, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). 2005
- Oelemann, M, Diel, R, Vatin, V, Haas, W, Rusch-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 (3), 691–697,

Olabisi, O, Sheehan, S, Corcoran, G, Okker, M, Gover, K, Nikolayevsky, V, Brown, T, Dale, J, Gordon, S, Drobniowski, F, Prentice, M. 2008, *Mycobacterium bovis* Strains Causing Smear-Positive Human Tuberculosis, Southwest Ireland. *Emerging Infectious Diseases* 14 1931-1934,

Oliveira, L, Huard, R, Boechat, N, Gomes, H, Oelemann, M, Kurepina, N. 2007, Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of clinical microbiology* 45 (12), 3891–3902,

OMS: Tuberculosis and Diabetes. 2011

OMS: Global Tuberculosis Report 2012. 2012

OPS. 1994, La epidemiología molecular en México. *Boletín de la oficina sanitaria panamericana* 117 (1), 89-90,

OPS: Normas y guía técnica: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, parte 1: Baciloscopia. 2008a

OPS: Normas y guía técnica: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, parte 2: Cultivo. 2008b

OPS: Coinfección TB/VIH, Guía Clínica 2010

OPS: Situación de la Tuberculosis en la frontera México-Estados Unidos. 2011

Padilla, I, Segura, J, Rodriguez, J, Morales, A, Alvarez, G. 2011, Molecular pattern of *Mycobacterium bovis* isolates and its relationship with risk factors associated with the presence of bovine tuberculosis in northern Mexico. *Tropical and subtropical agroecosystems* 14 (2), 465-471,

- Pareek, M, Abubakar, I, White, P, Garnette, G, Lalvani, A. 2011, Tuberculosis screening of migrants to low-burden nations: insights from evaluation of UK practice. *European Respiratory Journal* 37 1175–1182,
- Pérez, D: Epidemiología molecular de tuberculosis en Veracruz. *In: Instituto de Salud Pública Universidad Veracruzana, Veracruz, 2013*
- Pérez, L, Fuentes, F, Morales, J, Zenteno, R. 2011, Factores asociados a tuberculosis pulmonar en pacientes con diabetes mellitus de Veracruz, México. *Gaceta Médica de México* 147 (219-225),
- Ponce de León, A, García, M, García, C, Gomez, F, Valdespino, J. 2004, Tuberculosis and Diabetes in Southern Mexico. *Diabetes Care* 27 (7), 1584-1590,
- Pozniak, A. 2001, Multidrug-resistant tuberculosis and HIV infection. *Annals of the New York Academy of sciences* 953 192-198,
- Rodríguez, J, Mejia, G, Del Portillo, P, Patarroyo, M, Murillo, L. 1995, Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 141 2131-2138,
- Rodwell, T, Kapasi, A, Barnes, R, Moser, K. 2012, Factors associated with genotype clustering of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in an ethnically diverse region of southern California, United States. *Infection, Genetics and Evolution* 12 1917–1925,
- Rodwell, T, Kapasi, A, Moore, M, Milian, F, Harrisf, B, Guerrero, L, Moser, K, Strathdee, S, Garfein, R. 2010, Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *International Journal of Infectious Diseases* 14 (129-135),
- Rodwell, T, Moore, M, Moser, K, Brodine, S, Strathdee, S. 2008, Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. *Emerging Infectious Diseases* 14 (6), 909-916,

- Rosales, S, Pineda, L, Ghebremichael, S, Rastogi, N, Hoffner, S. 2010, Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Honduras. BMC Microbiology 10 (208), 1-9,
- Rubí, A: Prevalencia de Tuberculosis en contactos de pacientes con TB-MDR. *In: Instituto de Salud Pública/UV. Universidad Veracruzana, 2009*
- Rubio, M, Millan, S, Gutierrez, J: La migración indígena en México, Estado del Desarrollo Económico y Social de los pueblos indígenas de México. *In: Instituto Nacional Indigenista, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, México. 2000*
- Schneider, E, Laserson, K, Wells, S, Moore, M. 2004, Tuberculosis along the United States-Mexico border, 1993–2001. Revista Panamericana de Salud Pública 16 (1), 23-34,
- Secretaría de Agricultura, G, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-017-ZOO-2005, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). 2005
- Secretaría de Salud: Programa de Acción: Tuberculosis 2001
- Secretaría de Salud: Programa de acción específico 2007-2012 Tuberculosis. 2007
- Secretaría de Salud: Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos. 2010
- Secretaría de Salud: Situación actual de la tuberculosis en México. 2012
- Secretaría de Salud: Vigilancia epidemiológica del binomio SIDA-Tuberculosis 2013
- Shah, D, Verm, R, Bakshi, C, Singh, R. 2002, A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiology Letters 214 39-43,

- Sharma, P, Singh, D, Upadhyay, P, Faujdar, J, Lavania, M, Sachan, S, Katoch, K, Mohan, V. 2008, Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a rural area of Kanpur by spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) typing. *Infection, Genetics and Evolution* 8 (621-625),
- Small, P, Hopewell, P, Singh, S, Paz, A, Parsonnet, J, Ruston, D, Schechter, G, Daley, C, Schoolnik, G. 1994, The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *The New England Journal of Medicine* 330 (24), 1703-1709,
- Sola, C, Filliol, I, Legrand, E, Lesjean, S, Locht, 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. *Infection Genetics Evolution* 3 125–133
- Supply, P: Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* technical guide. 2005
- Supply, P, Allix, C, Lesjean, S, Oelemann, M, Rusch-Gerdes, S, Willery, E, Savine, E, De Haas, P, Van Deutekom, H, Roring, S, Bifani, P, Kurepina, N, 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 (12), 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 of clinical microbiology* 39 (10), 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 (3), 762-771,

- Svensson, E, Millet, J, Lindqvist, A, Olsson, M, Ridell, M, Rastogi, N. 2011, Impact of immigration on tuberculosis epidemiology in a low-incidence country. *Clinical Microbiology and Infection* 17 (6), 881-887,
- Tazi, L, Reintjes, R, Bañuls, A. 2007, Tuberculosis transmission in a high incidence area: A retrospective molecular epidemiological study of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *Infection, Genetics and Evolution* 7 (5), 1-9,
- Thoen, C, LoBue, P, De Kantor, I. 2006 The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis *Veterinary Microbiology* 112 339-345,
- Toledo, P, Milian, F, Santillan, M, Ramírez, I. 1999, Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Veterinaria México* 30 (3),
- Unidad de Política Migratoria: Tendencias de la migración de tránsito irregular de africanos y asiáticos por México hacia Estados Unidos. 2012
- Van Deutekom, H, Supply, P, de Haas, P, Willery, E, Hoijng, S, Locht, C, Coutinho, R, van Soolingen, D. 2005, Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by *Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis*, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 43 (9), 4473–4479,
- Van embden, J, Cave, D, Crawford, J, Dale, J, Eisenach, K, Gicquel, B, Hermans, S, Martin, C, Mcadam, R, Shinnick, T, Small, P. 1993, Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology* 31 (2), 406-409,
- Varghese, B, Hillemann, A, Rachma, D, Shoukri, M, Al-rabiah, F, Al-Omari, R, Al-Hajoj, S. 2012, New insight into the molecular characterization of




- isoniazid and rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Saudi Arabia Infection, Genetics and Evolution 12 (3), 549-556,
- Varghese, B, Supply, P, Shoukri, M, Allix-Béguet, C. 2013, Tuberculosis Transmission among Immigrants and Autochthonous Populations of the Eastern Province of Saudi Arabia. Plos One 8 (10),
- Wayne, M, Charles, 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 (6), 1-5,
- Weil, A, Plikaytis, B, Butler, R, Woodley, C, Shinnick, T. 1996, The mtp40 gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of clinical microbiology 34 (9), 2309-2311,
- Weniger, T, Krawczyk, J, Supply, P, Niemann, S, Harmsen, D. 2010, MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic Acids Research 38 326-331,
- Wilkins, M, Meyerson, J, Bartlett, P, Spieldenner, S, Berry, D, Mosher, L, Kaneene, J, Robinson, B, Stobierski, M, Boulton, M. 2008, Human *Mycobacterium bovis* Infection and Bovine Tuberculosis Outbreak, Michigan, 1994–2007. Emerging Infectious Diseases 14 657-660,
- Wirth, T, Hildebrand, F, Allix-Béguet, C, Woßlbein, F, Kubica, T, Kremer, K, Van Soolingen, D, Rusch-Gerdes, S, Locht, C, Brisse, S, Meyer, A, Supply, P, Niemann, S. 2008, Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLOS Pathogens 4 (9),
- Yeboah, D, Asante, A, Bodmer, T, Stucki, D, Koram, K, Bonsu, B, Pluschke, G, Gagneux, S. 2011, Genotypic diversity and drug susceptibility patterns among *M. tuberculosis* complex isolates from South-Western Ghana. Plos One 6 (7), 1-8,

- Yugueros, M, Cascón, A, Sanchez, M. 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,
- Zumarraga, M, Bigi, F, Alito, A, Romano, M, Cataldi, A. 1999, A 12.7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. Microbiology 145 893-897,

# 11. ANEXOS

## Anexo 1. Encuesta realizada para el estudio epidemiológico de tuberculosis

Anexo 1. Encuesta realizada para el estudio epidemiológico de tuberculosis

 <p style="text-align: center;"><b>ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE TUBERCULOSIS</b> <span style="float: right;">TB 04-I</span></p>				
I DATOS DE IDENTIFICACION DEL PACIENTE	Muestra: <input type="text"/> Folio: <input type="text"/>			
	NOMBRE: _____ DIF: <input type="text"/>			
	FECHA DE NACIMIENTO: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> ESTADO: _____ JURISDICCION: _____			
	MENOR: _____ EDAD: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> SEXO: <input type="radio"/> M <input type="radio"/> F			
	OCUPACION: _____			
	ESCOLARIDAD: _____			
	RESIDENCIA ACTUAL: _____			
	Calle y número: _____ CP: _____ Estado: _____ Municipio: _____			
	TIPO DE MUNICIPIO: Municipio prioritario TB <input type="checkbox"/> Municipio población indígena <input type="checkbox"/> Municipio muy alta migración <input type="checkbox"/> Municipio de alta migración <input type="checkbox"/> Municipio migración <input type="checkbox"/> Municipio arranque parejo en la vida <input type="checkbox"/>			
	TIEMPO DE RADICAR EN DOMICILIO ACTUAL: <input type="checkbox"/> Menos de 1 año <input type="checkbox"/> De 1 a 5 años <input type="checkbox"/> Más de 5 años			
II DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE	Calle de la Unidad: _____ Estado: _____ Jurisdicción Sanitaria: _____ Municipio: _____ Localidad: _____			
	Institución: _____ (Hospital, Clínica, Centro de Salud, Otro)			
	Sistema de Salud: _____ Unidad de Atención: _____			
III DATOS CLINICOS	Fecha de inicio de signos y síntomas: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>			
	Signos y síntomas: _____ _____ _____ _____			
	Método de diagnóstico: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
	1 = Baciloscopia, 2 = Cultivo, 3 = Histopatología, 4 = Clínico, 5 = Radiológico, 6 = Epidemiológico, 7 = Clínico Epidemiológico, 8 = Otro, 9 = Ignorado			
LABORATORIO Y GABINETE	ESTUDIO	RESULTADOS	Fecha de solicitud Dia/ Mes / Año	Fecha de resultado Dia/ 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 = Carga viral de LCR, 8 = Otro. Especificar: _____				
Resultado de baciloscopia: 1 = BK + (uno azul), 2 = BK ++ (dos azules), 3 = BK +++ (tres azules), 4 = BK - (Negativo), 5 = Positivo, 6 = No se realizó, 7 = Muestra inadecuada, 8 = De 1 a 5 días, 9 = Ignorado. Resultado de cultivo y PCR: 1 = Positivo, 2 = Negativo, 3 = Ignorado. Resultado para Rx de Tórax, TAC de cráneo, Histopatología y Carga viral de LCR: 1 = Cox datos sugestivos de TB, 2 = Sin datos sugestivos de TB, 3 = Ignorado. Resultado de otro: 1 = Positivo, 2 = Sugestivo, 3 = Negativo.				

**TIPO DE PACIENTE, LOCALIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD, ANTECEDENTES DE IMPORTACIÓN Y TRATAMIENTO**

Tipo de paciente:  1 = Casos nuevos,  2 = Reingreso,  3 = Reactivo,  4 = Prolata,  5 = Otro,  6 = Ignorado.

Documento de referencia:  Tarjetas,  Hojas de historia,  Otros.

Indicar el país de origen:  1 = U.S.A.,  2 = México,  3 = Otro.

Paciente tuberculoso anteriormente:  1 = Sí, 2 = No, 3 = Ignorado. En caso afirmativo, indicar el año de diagnóstico: AÑO

Localización de la enfermedad:  1 = Pulmón, 2 = Mediastino, 3 = Sistema linfático, 4 = Oído, 5 = Testículo, 6 = Ginecología, 7 = Piel, 8 = Ojo, 9 = Oído, 10 = Glándula Tiroides, 11 = Glándula Suprarrenal, 12 = Ganglios, 13 = Miel, 14 = Páncreas, 15 = Hígado, 16 = SNC, 17 = Hueso.

Lugar de detección:  1 = Clínica Especial,  2 = Puesto, 3 = Examen de orina, 4 = Hospitalización, 5 = Residencia, 6 = Dispensario, 7 = Otro, 8 = Ignorado.

Fecha de notificación:  /  /

Fecha de inicio de estudio:  /  /

Fecha de término de estudio:  /  /

Fecha de diagnóstico:  /  /

Enfermedades asociadas:  1 = VIH/SIDA, 2 = Diabetes, 3 = Hipertensión, 4 = Asma, 5 = Enfermedad cardíaca, 6 = EPOC, 7 = Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, 8 = Mieloma, 9 = Otro, 10 = Ignorado.

ENFERMEDAD	AÑO DE INICIO	SI	NO	¿CÓMO SE DIAGNOSTICÓ LA ENFERMEDAD?	FECHA DE INICIO**			RESULTADO**
					DI	ME	AÑO	
VIH/SIDA								
DIABETES								
HIPERTENSIÓN								
EPOC/EPOC								
MELANOMA								
OTRA								

\* 1 = Sí, 2 = No  
\*\* 1 = Positivo, 2 = Negativo

Tuvo contacto con alguna persona que padecía o padeciera tuberculosis:  1 = Sí, 2 = No, 3 = Ignorado. En caso afirmativo, indicar el lugar:

Tiene cicatriz de BCG?:  1 = Sí, 2 = No, 3 = Ignorado. Fecha de vacunación con BCG:  /  /

Le aplicaron PPD?:  1 = Sí, 2 = No, 3 = Ignorado. Resultado:  1 = Reactivo, 2 = No reactivo. Fecha de inicio de tratamiento:  /  /

Esquema de tratamiento:  1 = Primero acordado, 2 = Retratamiento primario, 3 = Retratamiento estandarizado, 4 = Retratamiento individualizado, 5 = Otro. Especificar:

**VI ESTUDIO DE CONTACTOS**

Número de contactos declarados:

NOMBRE	SEXO*		EDAD**		EXAMINADO***				CASO		QUIEROPROFILAXIS*	
	M	F	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI	NO

\* 1 = Masculino, 2 = Femenino  
\*\* En caso de que el paciente sea menor de un año registrar en edad. De y para los pacientes menores de 10 años registrar un cero antes de la edad, ejemplo: el paciente tiene nueve años registrar 09.  
\*\*\* 1 = PPD, 2 = BAAR, 3 = Cultivo, 4 = Radiografía, 5 = Clínico, 6 = Otros de BCG.

**VII SUSCEPTIBILIDAD ANTITUBERCULOSA**

Nota: Este apartado no es obligatorio para todos los casos, solo se llenará cuando se sospeche farmacorresistencia al momento del diagnóstico.

Se realizó estudio de susceptibilidad antimicrobiana:  1 = Sí, 2 = No, 3 = Ignorado. Si la respuesta es sí, indicar el resultado en cada uno de los fármacos:

Isoniazida:  Rifampicina:  Pirazinamida:  Estreptomicina:  Etambutol:

Opciones de resultado para cada uno de los fármacos: 1 = Sensible, 2 = Resistente, 3 = No resultado, 4 = Se ignora.

Otros fármacos:  1 = Fluorocitidina, 2 = Kanamicina, 3 = Amikacina, 4 = Capreomicina, 5 = Ofloxacina, 6 = Ciprofloxacina, 7 = Etionamida.

Fue analizado por el Comité Estatal de Farmacorresistencia:  1 = Sí, 2 = No, 3 = Ignorado.

FORMA DEL MEDICO NOTIFICANTE: \_\_\_\_\_ NOMBRE Y FIRMA DEL EPIDEMIOLOGO JURISDICCIONAL: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Secuencias de los cebadores de los 12 loci MIRU

Anexo 2. Secuencias de los cebadores de los 12 loci MIRU

MIRU	Tamaño pb	Secuencia Cebadores (5´-3´) (marcador fluorescente)
MIRU 02F MIRU 02R	510	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)
MIRU 04F MIRU 04R	352	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGTCAGC
MIRU 10F MIRU 10R	643	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
MIRU 16F MIRU 16R	672	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (HEX)
MIRU 20F MIRU 20R	591	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU 23F MIRU 23R	466	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (HEX) AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC
MIRU 24F MIRU24R	447	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (HEX)
MIRU 26F MIRU26R	439	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (HEX)
MIRU 27F MIRU 27R	660	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
MIRU 31F MIRU 31R	653	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
MIRU 39F MIRU 39R	642	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)
MIRU 40F MIRU 40R	407	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

### Anexo 3. Índice discriminatorio de Hunter-Gaston

#### Anexo 3. Índice discriminatorio de Hunter-Gaston

Para calcular el HGDI se utilizó la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Dónde:

N: Número total de aislamientos en el estudio.

S: Número de clusters obtenidos

$n_j$ : Número de aislados por cluster

El HGDI varía entre 0.00 y 1.00, un valor de 0.00 indica que todos los aislados son indistinguibles y un valor de 1.00 indica que todos los aislados en la muestra se diferencian.

## **Anexo 4. Glosario**

### Anexo 4. Glosario

**Abandono:** Interrupción del tratamiento durante 30 días o más.

**Baciloscopia:** Técnica de laboratorio aplicada en el diagnóstico de tuberculosis, que mediante la tinción de Ziehl Neelsen, permite observar en un frotis, Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR).

**Caso de tuberculosis:** Persona en quien se establece el diagnóstico de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar.

**Caso nuevo:** Enfermo en quien se establece el diagnóstico de tuberculosis por primera vez y nunca han recibido tratamiento antituberculoso.

**Continúa tratamiento:** Paciente que continúa recibiendo tratamiento después de seis meses de haberlo iniciado.

**Cultivo:** Técnica de laboratorio que permite el aislamiento de colonias de *M. tuberculosis* en medio sólido o líquido.

**Curación:** Caso de tuberculosis que termina su tratamiento, desaparecen los signos clínicos y tiene baciloscopia negativa en los dos últimos meses o cultivo negativo al final del tratamiento.

**Defunción por tuberculosis:** Defunción en la que la tuberculosis inicia la serie de acontecimientos que llevan a la muerte.

**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 durante el tratamiento, tiene baciloscopia positiva confirmada por cultivo.

**Recaída:** 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.

**Reingreso:** Enfermo de tuberculosis que reinicia el tratamiento después de haberlo abandonado.

**Referido:** Paciente que por causa justificada se recibe para continuar su tratamiento.

**Retratamiento primario:** Esquema de tratamiento que se instituye a los pacientes con recaída, fracaso o abandono de un tratamiento primario acortado, comprende la administración de 5 fármacos de primera línea durante 8 meses, dividido en 3 fases 2HRZES/1HRZE/5H3R3E3.

**Retratamiento estandarizado:** Esquema de tratamiento que se instituye a un enfermo con fracaso a un esquema de retratamiento primario o con tuberculosis multifarmacorresistente, y es avalado por el Comité Estatal de Farmacorresistencia correspondiente.

**Retratamiento individualizado:** Esquema de tratamiento que se instituye a un enfermo con tuberculosis multifarmacorresistente (TBMFR) multitratado o con fracaso a un esquema de retratamiento estandarizado, fundamentado en el resultado del estudio de susceptibilidad antimicrobiana. Comprende la administración de un tratamiento con fármacos de segunda línea, la combinación y el número de fármacos será definido por el grupo de expertos en TBMFR.

**Término de tratamiento:** Caso de tuberculosis que ha completado el esquema de tratamiento, han desaparecido los signos clínicos y no se realizó baciloscopia o cultivo al finalizar el tratamiento.

**Traslado:** Es el proceso para enviar al paciente para tratamiento y control a otra unidad de salud.

**Tratamiento estrictamente supervisado:** Tratamiento que administra el personal de salud o personal comunitario capacitado por personal de salud, quien debe confirmar la ingesta y deglución del fármaco para garantizar el cumplimiento del tratamiento.

**Tratamiento primario acortado:** Al tratamiento que se instituye a todos los casos nuevos. Comprende la administración de cuatro fármacos de primera línea (isoniacida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) y etambutol (E)) en 60 dosis durante la fase intensiva y dos fármacos en 45 dosis durante la fase de sostén (seis meses) 2HRZE/4H3R3.

**Tuberculosis multifarmacorresistente (TBMFR):** Tuberculosis en la cual un microorganismo del complejo *M. tuberculosis* no es susceptible a la acción de isoniacida ni de rifampicina, administradas simultáneamente.