



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA:  
BIOTECNOLOGÍA PECUARIA**

**PROYECTO DE TESIS:  
EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICO MOLECULAR DE CEPAS DE *M. tuberculosis*  
DE LOS ESTADOS DE MICHOACÁN Y QUERÉTARO**

**PRESENTA:  
Biol. MAR DEL ROSARIO VÁZQUEZ HEREDIA**

**Para obtener el grado de: Maestra en Ciencias Biológicas**

**DIRECTOR DE TESIS:  
D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO**

**Morelia, Michoacán.  
México  
AGOSTO DE 2017**



**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE CONSERVACIÓN Y BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA Y EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR MICROBIANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”, AMBOS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, ASÍ COMO EN EL LABORATORIO DEL DR. FELICIANO MILIÁN SUAZO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO. SE AGRADECE EL APOYO DE LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (CIC) DE LA UMSNH PARA EL PROYECTO 16.4. SE CONTÓ CON EL APOYO DEL CONACYT PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO (NO. DE BECARIO 572956).**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor, Dr. Gerardo por la invitación para formar parte de su equipo de trabajo con este proyecto. Por su paciencia, por toda su ayuda para la elaboración de este proyecto, la orientación en todos los trámites y siempre promover la calidad en el trabajo de sus estudiantes.

A la Dra. Soledad, por permitirme continuar en su laboratorio, por siempre brindar un ambiente idóneo para el crecimiento de los estudiantes, por la motivación para siempre salir de nuestra zona de confort, por intentar encaminar nuestras almas.

Al Dr. Feliciano Milián Suazo, por su apoyo para la elaboración de este proyecto y por recibirme en su laboratorio.

A Susana Sosa, técnico de laboratorio de Microbiología de la UAQ, por su ayuda para la elaboración de los espoligotipos.

A los Drs. Joel y Alejandra, por su ayuda con la revisión de este trabajo y todas sus observaciones y aportaciones al presente trabajo.

A la Dra. Sofía Samper Blasco, por recibirme en su laboratorio durante mi estancia de investigación en el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, por darme la oportunidad de conocerle y a su grupo de trabajo, por su disposición por enseñarme siempre nuevas líneas que desconocía.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio. Lupita, Lizeth, Ivonne, Rosa Elena, por los 22 años de amistad, que sea para siempre. Edgar, Abraham, Isabel, Jeni y Denisse, por continuar esta amistad desde la licenciatura y siempre estar presentes en mis días. Ana, gracias infinitas por compartir tu conocimiento y por tu disposición para ayudar siempre. Edgardo, Estela, Adrián, Eva, Rubén, Andrea, Claudia y Elda, por hacer los días tan amenos en el laboratorio.

A mis padres, por siempre motivarme a seguir esforzándome, a no conformarme. Mi hermana Belem, que alegra mis días.

Por último, de manera muy especial, a ti Carlos, por compartir tus conocimientos conmigo, tu ayuda aún en la distancia, por enseñarme mucho más que aspectos técnicos y todo lo que compartes conmigo, gracias por siempre.

## ÍNDICE

	PÁG.
I. RESUMEN.....	8
II. ABSTRACT .....	9
III. INTRODUCCIÓN.....	10
III.1 Generalidades sobre la tuberculosis .....	10
III.2 Bacteriología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	11
III.3 Diagnóstico de la tuberculosis .....	12
III.4 Epidemiología de la tuberculosis.....	14
III.5 El complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
III.6 Origen y evolución del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
III.7 Técnicas para el análisis de la diversidad del MTBC .....	18
III.7.1 RFLP-IS6110 .....	18
III.7.2 Panel de tipificación del MTBC .....	19
III.7.3 <i>Spoligotyping</i> (Espoligotipificación).....	20
III.7.4 MIRU-VNTR .....	21
III.7.5 Polimorfismos de secuencia larga (LPS) .....	22
III.7.6 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) .....	22
III.8 Linajes del MTBC .....	26
III.8.1 Linaje 1 (Indo-Oceánico).....	26
III.8.2 Linaje 2 (Este-Asiático) .....	27
III.8.3 Linaje 3 (Este Africano-Indio) .....	27
III.8.4 Linaje 4 (Euro-Americano) .....	28
III.8.5 Familia LAM .....	29
III.8.6 Familia Haarlem .....	29
III.8.7 Linaje 5 ( <i>Mycobacterium africanum</i> I, MAF1) y Linaje 6 ( <i>Mycobacterium africanum</i> II, MAFII) .....	30
III.8.8 Linaje 7 (Etiopía) .....	31
III.8.9 Linaje <i>M. bovis</i> .....	32
IV. ANTECEDENTES .....	33
IV.1 Epidemiología molecular de la TB en México .....	33
IV.2 Epidemiología molecular en Michoacán y Querétaro .....	34
V. JUSTIFICACIÓN .....	36

VI. HIPÓTESIS .....	37
VII. OBJETIVOS .....	37
VII.1 Objetivo general.....	37
VII.2 Objetivos particulares .....	37
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
VIII.1 Material biológico.....	38
VIII.2 Extracción de ADN .....	38
VIII.3 Ensayos de PCR del Panel de Tipificación del MTBC .....	38
VIII.4 Confirmación de la eliminación RD <sup>Rio</sup> para aislados con ausencia de la región <i>is1561'</i> .....	39
VIII.5 Tipificación mediante <i>spoligotyping</i> .....	40
VIII.6 Tipificación por MIRU-VNTR .....	42
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
IX.1 Tipificación a nivel de especie .....	44
IX.2 Aislados con patrones particulares .....	45
X. CONCLUSIONES .....	68
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Patrón de amplificación de la especie <i>M. tuberculosis</i> en el ensayo del Panel de Huard..	44
Figura 2. Patrón de amplificación de micobacterias no pertenecientes al MTBC en el ensayo del Panel de Huard.....	45
Figura 3. Patrón de amplificación de la especie <i>M. bovis</i> en el ensayo del Panel de Huard. ....	46
Figura 4. Confirmación de la eliminación RD <sup>Río</sup> mediante la amplificación de la región <i>IS1561'</i> . ....	48
Figura 55. Espoligotipos de los aislados de bacterias del complejo MCTB de los estados de Querétaro y Michoacán.....	50
Figura 6. Porcentajes de familias identificadas por espoligotipo..	52
Figura 7. Familias del MTBC identificadas por spoligotyping en Michoacán y Querétaro.....	55
Figura 8. Porcentajes de familias encontradas por MIRU-VNTR en los aislados de estudio. ....	57
Figura 9. Porcentajes de familias identificadas por MIRU-VNTR en Michoacán y Querétaro.....	59
Figura 10. Frecuencia de familias reportadas previamente para Michoacán..	61
Figura 11. Árbol filogenético de los aislados del MTBC analizados.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de tipificación del MTBC para la determinación de especie de los aislados de estudio. ....	39
Cuadro 2. Patrón de amplificación de las especies del MTBC <sup>1</sup> reportadas por Huard. ....	40
Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de tipificación del MTBC por MIRU-VNTR. ....	43
Cuadro 4. Patrones de amplificación de Huard de aislados distintos a <i>M. tuberculosis</i> . ....	45
Cuadro 5. Familias obtenidas por Spoligotyping y MIRU-VNTR para los aislados analizados. ....	51
Cuadro 6. Porcentajes de familias reportadas por estados .....	61
Cuadro 7. Inconsistencias de familias obtenidas por Spoligotyping vs. familias por MIRU-VNTR. ....	64

## I. RESUMEN

La tuberculosis (TB) humana es una enfermedad de relevancia en salud pública mundial, ocasionada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), que incluye los patógenos del humano *M. tuberculosis* y *M. africanum*, y a las especies *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedi*, causantes de tuberculosis en animales, pero que pueden ser transmitidas al humano (TB zoonótica). La identificación adecuada del miembro del CMTB asociado a un caso de TB humana tiene relevancia clínica, ya que puede determinar el tratamiento, por lo que en los últimos años se han desarrollado técnicas genético-moleculares aplicadas a la detección y tipificación del patógeno. El panel de tipificación (PT) es una técnica simple que permite diferenciar las especies del CMTB mediante la amplificación por PCR de ocho *loci*. En el caso de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, las herramientas de epidemiología molecular modernas han permitido establecer la presencia de variantes genéticas, algunas de las cuales presentan diferencias en sus patrones de distribución geográfica, así como en su virulencia y resistencia a antibióticos. Por lo anterior, los estudios epidemiológicos actuales de la TB no implican solo la identificación del bacilo, sino de la variante genética particular. La identificación de variantes genéticas permite establecer rutas de transmisión de una manera más precisa y, en consecuencia, establecer estrategias de prevención y control más efectivas. Entre las técnicas molecular más empleadas para la detección de variantes genéticas se encuentran el Espoligotipo y el ensayo MIRU-VNTR, mientras que en el primero se asigna un aislado a una familia analizando las variaciones de la región de repetidos directos del bacilo, el segundo permite diferenciar entre genotipos analizando 15 *loci* mediante PCR. La utilización conjunta de dichas herramientas moleculares permite realizar estudios epidemiológicos para la comparación de poblaciones del patógeno, revelando el flujo de especies/genotipos del CMTB a cualquier nivel geográfico. Los estados de Michoacán y Querétaro representan un caso interesante de comparar, ya que presentan antecedentes epidemiológicos de TB humana contrastantes. El objetivo del presente trabajo fue detectar cambios en las especies/genotipos que están causando TB humana en Michoacán y Querétaro, y el posible flujo del patógeno entre ambas entidades. En Querétaro se ha registrado previamente además de *M. tuberculosis*, la presencia de *M. bovis*, mientras que en Michoacán a *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas (Mnt), así como al genotipo RD<sup>Rio</sup> el cual parece mostrar gran capacidad de dispersión. Empleando el PT este trabajo corroboró la presencia de las mismas especies y genotipos en ambas entidades, además de encontrar por primera vez la presencia de Mnt en Querétaro. El ensayo MIRU-VNTR mostró como familias predominantes a Haarlem y S en los dos estados, mientras que por espoligotipo fueron X1 y T1. Se encontraron familias diferentes del CMTB específicas de cada entidad, pero también se encontraron genotipos compartidos. Estos resultados sugieren que ambas entidades comparten rutas de dispersión del patógeno, pero conservan también dinámicas específicas de la enfermedad.

Palabras clave: Tuberculosis, Epidemiología, *Mycobacteriu*. Michoacán, Querétaro



## II. ABSTRACT

Human tuberculosis (TB) is a disease with global public health importance caused by bacteria in the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MBTC) that includes species pathogenic of humans (*M. tuberculosis* and *M. africanum*) and animals (zoonotic TB; *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* and *M. pinnipedi*). Accurate clinical identification of the member of the MBTC associated to human TB cases is critical because treatment depends on it; therefore molecular genetics techniques have been developed in recent years for their application in clinical detection and typing of the pathogens. Among these techniques, the typing panel (TP) is a simple approach based on amplification of eight *loci*. Modern epidemiological tools allowed for identifying genetic variants of *M. tuberculosis* and *M. bovis*, some having different geographical distribution patterns, virulence, and resistance to antibiotics. For that reason, current epidemiological studies are not limited to identifying bacilli to species, but also attempt to establish particular genetic variants in order to more precisely know their transmission routes and establish more effective prevention and control strategies. Spoligotyping and the MIRU-VNTR assay are among the most used molecular techniques for detection of genetic variants of *Mycobacterium* spp. Spoligotyping assigns isolates to MBTC families by analyzing direct repeat regions, while MIRU-VNTR differentiates genotypes analyzing 15 *loci* by PCR. Combination of both molecular tools in epidemiological studies allows for comparing populations of the pathogenic species, thus revealing the geographic dispersion of species and genotypes at any spatial level. The Mexican states of Michoacán and Querétaro offer an interesting case for epidemiological comparison, given their contrasting human TB epidemiological backgrounds. Our work analyzed isolates of Michoacán and Querétaro aiming at detection of differences in species and genotypes causing human TB, and possible flow of the pathogens between both states. Besides *M. tuberculosis*, *M. bovis* was previously detected in Querétaro, while in Michoacán *M. tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria (NTB), and the RD<sup>Rio</sup> genotype of *M. tuberculosis* had been identified; the latter apparently with high dispersal capability. Our results from TP analysis corroborated the same distribution of species and genotypes reported earlier, but we discovered the presence of NTB in Querétaro. The predominant CMTB families in both states identified by both techniques used were Haarlem and S (MIRU-VNTR), and X1 and T1 (spoligotyping). Some of the identified CMTB families were specific to one of the states, but some genotypes were common to both states. Our results suggest both entities share dispersal routes of the pathogen, but each state maintains specific TB epidemiological dynamics.

### III. INTRODUCCIÓN

#### III.1 GENERALIDADES SOBRE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis humana (TB) es una enfermedad infecciosa que se transmite por aerosoles, causada por bacterias ácido-alcohol resistentes que son genéticamente muy cercanas entre sí, a las que se les conoce el nombre del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). La enfermedad se manifiesta en su forma activa por una serie de respuestas sistémicas tales como fiebre, pérdida de peso y sudoración nocturna, a estos síntomas se pueden añadir otros derivados de la localización de la infección como es la presencia de tos y hemoptisis, además de anomalías detectadas por radiografías como linfadenopatía torácica y cavidades o densidades pulmonares, en el caso de la TB pulmonar (Pai *et al.* 2016; O'garra *et al.* 2013).

La tuberculosis se puede clasificar bajo distintos criterios, uno de ellos es el aspecto clínico en el cual se suele subdividir a la enfermedad en TB latente, cuando el paciente permanece asintomático, por lo que no puede transmitir la enfermedad ni muestra síntomas, y TB activa, cuando el paciente puede transmitir la enfermedad. La TB activa a su vez, puede ser dividida en TB primaria, que se caracteriza por el desarrollo de la enfermedad en seguida de la infección y como TB postprimaria o reactivación, que tiene lugar cuando, una vez establecida la infección, esta logra ser contenida por el sistema inmune pasando a un estado de latencia, aunque al paso del tiempo se vuelve a activar (O'garra *et al.* 2013).

Por su localización, la tuberculosis se puede agrupar en dos formas principales, la primera de ellas es la TB pulmonar, que engloba a la gran mayoría de los casos en los que se desarrollan granulomas en los pulmones, esta se reconoce como la manifestación clínica característica de la enfermedad. Sin embargo, *M. tuberculosis* puede infectar una gran variedad de tejidos dando lugar a la segunda forma de la enfermedad que se conoce como TB extrapulmonar. La mayoría de los casos de TB extrapulmonar se presentan en órganos con condiciones subóptimas para el desarrollo de la bacteria, por lo que estas

infecciones son insidiosas y de lenta progresión, resultando en casos complicados de diagnosticar debido a la dificultad para acceder a muestras de fluidos o secreciones, por lo que hay que recurrir a métodos invasivos en la mayoría de los casos para confirmar la presencia del bacilo. Entre los principales tipos de TB extrapulmonar se encuentran la TB pleural que es la principal forma de TB extrapulmonar, la cual se desarrolla por la ruptura de un foco pulmonar subpleural o bien por una diseminación linfohematógena. La TB en nodos linfáticos es el segundo tipo más común de la manifestación extrapulmonar de la enfermedad, en esta el bacilo se aloja preferentemente en nodos cervicales y se distingue por su incremento en tamaño, llegando a presentar coalescencia, también se puede manifestar fiebre. En el caso de la TB miliar, ese presenta como una infección diseminada en todo el organismo vía hematógena, en la que varios órganos pueden ser infectados. Por su parte, la TB en el sistema nervioso puede ocurrir en dos formas principales, la tuberculosis meníngea y la intracraneal, en la que los síntomas son variables siendo el principal la presencia de inflamación, y los granulomas pueden estar localizados en la corteza cerebral o en las meninges. Otras formas de TB extrapulmonar son la osteoarticular, renal, genitourinaria, en piel, ojos y tracto digestivo (Palomino *et al.* 2007; Mathema *et al.* 2006).

Por último, la tuberculosis puede clasificarse por su origen. Normalmente la TB en humanos es causada por la especie *M. tuberculosis* proveniente de un paciente infectado, pero también puede ser causada por otras especies de micobacterias, principalmente por la especie *M. bovis*, que es el agente causal de la TB en bovinos. Cuando esta especie infecta al humano se le conoce como TB zoonótica o por zoonosis.

### **III.2 BACTERIOLOGÍA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

El agente causal de la tuberculosis es una bacteria en forma de bacilo, no móvil, no esporógena, débilmente Gram positiva, de 0.3 a 0.6 micrómetros de ancho y de 1 a 4 micrómetros de largo. Ésta bacteria incluye ácidos micólicos en su pared celular, lo que le confiere varias de sus características, como es la de ser ácido-

alcohol resistente, su extrema hidrofobicidad, la resistencia a la desecación, a condiciones de ácido-alcalinas y a múltiples antibióticos, así también propiedades inmunoestimuladoras. La secreción de ácidos micólicos provoca que la bacteria tenga un tiempo de replicación de entre 12 y 24 h, por lo que en los cultivos en agar la observación de colonias de cierto tamaño puede llegar a demorar hasta 21 días o más. Esta bacteria tiene como único hábitat el humano, no encontrándose de forma ambiental (Sakamoto, 2012).

En cuanto a las características genéticas de la bacteria, encontramos que poseen un genoma de aproximadamente 4,411,529 pares de bases. Como característica principal la presencia de gran proporción de GC en su cadena de ADN y aproximadamente 4,000 genes se han identificado (Mathema *et al.* 2006).

### **III.3 DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS**

En los países en desarrollo el diagnóstico de la TB se lleva a cabo principalmente por microscopía y por cultivo bacteriano. Como se mencionó con anterioridad, dado que los miembros del MTBC son organismos de crecimiento lento, pueden transcurrir de 6 a 12 semanas antes de que se observen colonias en el medio de cultivo, por lo que el diagnóstico suele basarse en la sintomatología del paciente, radiografías de tórax y microscopía. De éstas, la microscopía es el método de diagnóstico más específico y consiste en la tinción de muestras de esputo con la técnica de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR); sin embargo, se requiere de una gran cantidad de bacterias en la muestra para que la tinción sea positiva. Se ha calculado que la tinción para BAAR detecta solamente entre un 40 a 60% de los casos de TB activa (Palomino *et al.* 2007)

Debido a este bajo desempeño en las técnicas microbiológicas, así como a la enorme necesidad de enfrentar más eficientemente al agente causal de la TB, se ha impulsado desde hace más de 20 años el desarrollo de técnicas de diagnóstico automatizadas y genético-moleculares, que con el tiempo se han ido estableciendo como la técnicas de elección para el diagnóstico de la tuberculosis.

Algunas de las técnicas que se han desarrollado para el diagnóstico de la TB consisten en equipos automatizados que detectan el crecimiento de la bacteria en medios de cultivo, estos medios se encuentran en viales que son inoculados con muestras clínicas previamente descontaminadas. El sistema Bactec TB-460 (Becton Dickinson) utiliza un medio de cultivo que contiene ácido palmítico radiomarcado, al ser metabolizado el ácido palmítico por la bacteria se libera a la fase gaseosa, detectando así la presencia de bacterias en la muestra. Otro equipo automatizado es Bactec MGIT960, este utiliza un medio de cultivo con sales de ruterio que posee una fluorescencia propia, pero la presencia de oxígeno la limita, al inocularse el medio de cultivo el crecimiento bacteriano agota el oxígeno disuelto, permitiendo la fluorescencia y la detección de la bacteria (Palomino *et al.* 2007).

Posteriormente se desarrollaron kits comerciales basados en la amplificación de ADN, algunos ejemplos de estos kits son Amplified MTD (Gen-Probe) y Amplicor MTB Test (Roche Molecular System), basados en la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S. Otro método automatizado es realizado por el equipo Xpert-MTB RIF basado en la PCR, este equipo detecta, a partir de muestras clínicas, utilizando cartuchos donde se deposita directamente la muestra. El equipo realiza la extracción y amplificación del ADN de la muestra, además de analizar polimorfismos en el gen *rpoB*, detectando así la resistencia a rifampicina. Este equipo se utiliza ampliamente por tener un 95% de eficiencia en la detección de la enfermedad y el mismo porcentaje de eficiencia para la detección de la resistencia a rifampicina (Vallejo *et al.* 2015).

El conocimiento del genoma de *M. tuberculosis* posteriormente permitió el desarrollo de otras técnicas basadas en marcadores moleculares que además ayudan al conocimiento de la diversidad del bacilo, como son el IS6110-RFLP o Spoligotyping. La primera de estas técnicas se basa en la detección de la secuencia de inserción con una sonda específica marcada, y la segunda en la detección de las secuencias espaciadoras en la región de repetidos directos. Como se ha mencionado, además permiten el conocimiento del genotipo de la

bacteria que está causando la infección proveyendo de información epidemiológica y relevancia clínica (Mathema *et al.* 2006).

### **III.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS**

La tuberculosis humana es un problema de salud pública mundial ya que representa la primera causa de muerte por enfermedades infecciosas, seguida del VIH. Durante 2015 se presentaron 10.4 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes por esta enfermedad (WHO, 2016). Con excepción de Europa del Este y algunos países africanos, las tasas de prevalencia y mortalidad se han reducido en todo el mundo gracias a las medidas para el tratamiento y control sugeridas por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2016). Sin embargo, en los últimos años se han incrementado los reportes sobre cepas de agente patógeno resistentes a isoniazida y rifampicina, a los cuales se les ha denominado cepas multiresistentes a antibióticos (MDR-TB). También se han aislado cepas extensamente resistentes a antibióticos (XRD-TB), que además de presentar resistencia a los dos antibióticos anteriores, también son resistentes a cualquier fluoroquinolona, y al menos a uno de los tres antibióticos de segunda línea, que son capreomicina, kanamicina o amikacina. En el 2015 se detectaron 480,000 casos de MDR-TB alrededor del mundo, además de 100,000 casos de TB resistente a rifampicina. Se estima que un 45 % de los casos a nivel mundial de MDR-TB se concentraron en India, China y la Federación Rusa (WHO, 2016).

México no se encuentra entre los países de mayor incidencia de TB, aun así, la situación en la incidencia de la enfermedad no parece estar mejorando, ya que para el año 2013 se registraron 21, 306 casos nuevos, mientras que para el año 2015 la cifra ascendió a 22, 294 casos, casi mil casos más. En cuanto a los tipos de TB, en México la principal forma de tuberculosis es pulmonar, con una incidencia reportada de 81.6% del total de los casos, seguida de la tuberculosis de otras formas con un 16.8%, y por último la meníngea con un 1.6% (SINAVE, 2012). La situación de la TB-MDR y TB resistente a rifampicina es igual de desalentadora, ya que en 2013 se registraron 163 casos, mientras que para 2015

se confirmaron 156 casos, pero se estiman 610 casos; confirmándose además dos casos de TB-XDR. Estos datos indican que la disminución de la incidencia de TB en nuestro país se ha estancado, y que además está en aumento el caso de MDR-TB, por lo que no se pueden descuidar los esfuerzos para su erradicación. En la distribución de los casos de TB en nuestro país no se cuenta con información actualizada, ya que los últimos reportes existentes por estado son del año 2010. Entre la información disponible llama la atención la gran incidencia en los estados fronterizos del norte que incluye a Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, concentrando el 32% de los nuevos casos pulmonares que se registraron a nivel nacional para dicho año. Baja California es el estado con mayor morbilidad y mortalidad del país. Se cree que estos altos valores se registran debido a la gran cantidad de migrantes, población flotante y jornaleros, que se han identificado ya como poblaciones con altas cifras de tuberculosis pulmonar (SINAVE, 2012). Otros factores que favorecen la transmisibilidad de la enfermedad son el uso de drogas ilícitas, la relación de coinfección con VIH/SIDA y la comorbilidad tuberculosis-Diabetes mellitus.

Un acontecimiento de relevancia epidemiológica en México es la presencia de tuberculosis zoonótica. En un estudio realizado por Pérez-Guerrero y colaboradores (2008) se registraron 13 casos de TB por zoonosis en el estado de Querétaro (Pérez-Guerrero *et al.* 2008); también Vázquez-Marrufo y colaboradores (2008) han registrado al menos un caso de TB zoonótica en el estado de Michoacán (Vázquez-Marrufo *et al.* 2008). Datos de TB recabados en California, Estados Unidos, revelaron que entre los años 2001 y 2005, el 97% de los casos de TB zoonótica se detectaron en pacientes hispanos, de los que un 60% eran nacidos en México, lo que indica que la TB zoonótica es un tema de importancia en nuestro país que debe de ser atendido (Gallivan *et al.* 2015).

En el estado de Michoacán para el año 2010 se registró una tasa de incidencia de tuberculosis en todas sus formas de 7.7/100,000 hab, el cual se encuentra por debajo de la tasa nacional de 16.8/100,000 hab (SINAVE, 2012). Sin embargo, el panorama de la TB en Michoacán no es sencillo, ya que un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo (Guillén-Nepita 2014, datos no

publicados), basado en datos epidemiológicos estatales, demuestra que hay municipios dentro del estado que cuentan con altas tasas de incidencia. Por ejemplo, el municipio de Zináparo presentó en el año 2010 una tasa de incidencia superior a 50/100,000 hab, mientras que Apatzingán, Coahuayana, Aquila y Lázaro Cárdenas exhibieron tasas de incidencia superiores a 25/100,000 hab. Estas cifras son comparables con los países de más alta incidencia como Brasil, el cual presenta el mayor número de casos de TB en América. Un aspecto de relevancia epidemiológica para el control de la TB del estado de Michoacán es que la mayoría de los estados colindantes presentan una mayor tasa de incidencia, incluyendo a Jalisco, Colima, Querétaro y Guerrero, siendo este último el tercer estado con más casos de TB en el país. En el año 2010 se informaron en el estado de Michoacán, seis casos de MDR-TB, mientras que los estados de Guanajuato y Guerrero mostraron un mayor número de casos, con 8 y 15, respectivamente. Estos datos muestran claramente que algunos estados vecinos representan una posible fuente de dispersión de casos de TB no resistente y de MDR-TB hacia el estado de Michoacán (SINAVE, 2012).

### **III.5 EL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

El MTBC está formado por especies bacterianas asociadas a distintos hospederos, de tal forma que *M. tuberculosis* y *M. africanum* son específicas de humanos, mientras que las especies del complejo asociadas a otros mamíferos son *M. bovis* en bovinos y en diversas especies de mamíferos, *M. microti* en roedores, *M. caprae* en caprinos, *M. pinnipedii* en focas y lobos marinos y *M. orygis* en diversas especies; por último, están las especies que no muestran una asociación clara con el hospedero, que incluyen a *M. canettii* y otras conocidas como “bacilos suaves” que generan un cuadro clínico más atenuado. (Coscolla *et al.* 2013; Brosch *et al.* 2002). A pesar de que algunas especies muestran preferencia por hospederos diferentes al humano, todas ellas son capaces de provocar TB humana, proceso conocido como zoonosis o TB zoonótica.



### III.6 ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

La amplia distribución del bacilo en diferentes especies animales dio pie durante mucho tiempo a la idea de que *M. tuberculosis* evolucionó a partir *M. bovis*, que es una de las especies con mayor rango de hospederos. No obstante, la caracterización posterior de eliminaciones de fragmentos de ADN en el genoma en *M. bovis* con respecto de *M. tuberculosis* y *M. canettii*, sugirieron un escenario en el que un ancestro cercano o parecido a *M. canettii* pudo dar origen al MTBC al poseer el mayor número de características ancestrales. Dicha especie posee un genoma con el menor número de eliminaciones respecto a otras especies del complejo con las que se le comparó, rara vez se le aísla de casos clínicos, presenta una evidente dificultad para transmitirse de humano a humano, posee una menor virulencia y menor persistencia en estudios realizados en modelos animales, y presenta una gran facilidad para crecer en medios de cultivo, todas estas características sugieren de un pasado más cercano a la vida libre. Se postula que el ancestro del MTBC debió de ser de vida libre, como la mayoría de especies del género *Mycobacterium*, teniendo como hábitat el suelo o agua, lo que debió facilitar la interacción con otros microorganismos, favoreciendo el intercambio de material genético y la transferencia horizontal de genes con ellos, lo que pudo proporcionar las características necesarias para el cambio a una vida patógena (Boritsch y Brosch 2016) para el humano, y de ahí a otras especies animales.

Wirth y colaboradores (2008) realizaron un estudio analizando aislados de casos clínicos de humanos y otras especies obtenidas de mamíferos procedentes de diferentes regiones del mundo. Ellos realizaron una reconstrucción filogenética utilizando marcadores genéticos que son repetidos en tándem de número variable, conocidos como Unidades Repetitivas Interespaciadas Micobacterianas (MIRU). Dicho análisis generó dos clusters principales, uno de los cuales agrupó exclusivamente aislados específicos de humano, mientras que en el otro agrupó aquellos aislados provenientes de humanos y otros mamíferos; además, en las

posiciones más basales se posicionaron los aislados de humanos, y como variantes más recientes aquellos aislados de otras especies animales. A dichos clusters se les asignó el nombre de clado 1 y clado 2, respectivamente, y su estructura apoya fuertemente la teoría de que a partir de cepas humanas se llevó una adaptación a otras especies de animales (Wirth *et al.* 2008). Debido a que cada vez se registran nuevas variantes del MTBC es difícil determinar con certeza el momento en que éste se originó, pero en el estudio citado anteriormente, bajo los criterios de una tasa de mutación de  $1.4 \times 10^{-3.91}$  SNPs por año y un tiempo generacional de un día, se estimó que el ancestro común más reciente del MTBC debió existir hace aproximadamente 40,000 años, el ancestro común del clado 1 hace 21,000 y el del clado 2 hace 33,000 años (Wirth *et al.* 2008).

### **III.7 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DEL MTBC**

#### **III.7.1 RFLP-IS6110**

La correcta identificación de especies de micobacterias del MTBC es importante para proveer de información epidemiológica útil y para el éxito en el tratamiento de la enfermedad, es por esto que se han desarrollado distintas técnicas genético moleculares para su identificación. Una de las primeras para la diferenciación de aislados del MTBC es el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Dicho método había sido utilizado previamente por varios autores para el análisis de diversidad en otras especies de organismos, hasta que fue estandarizado para su aplicación en micobacterias por van Embden y colaboradores (1993), manteniéndose como un estándar de oro para la diferenciación de aislados del MTBC durante mucho tiempo. En esta técnica el ADN genómico se digiere con una endonucleasa específica, los productos de digestión se separan mediante electroforesis en geles de agarosa y se transfieren a una membrana de nylon, detectando en ésta (con una sonda específica) el número de copias de la secuencia IS6110 y el tamaño de los fragmentos generados por la digestión, características que permiten diferenciar cepas e inferir

el tipo de aislado que se tiene (van Embden *et al.* 1993; Van Soolingen *et al.* 1991). El análisis RFLP- IS6110 ha sido empleado para distinguir brotes o cadenas de contagio, así como diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* por el número de copias de la secuencia de inserción; sin embargo, no permite la diferenciación entre aislados de la especie *M. bovis*, ya que poseen sólo un sitio de inserción para la secuencia IS6110 ubicado en la región de repetidos directos, por lo que al realizar el análisis únicamente se obtienen 2 bandas producto de la digestión. Esto mismo se presenta en las demás especies del MTBC, por lo que dicha técnica es prácticamente exclusiva para la diferenciación de cepas de la especie *M. tuberculosis* (Van Soolingen *et al.* 1995).

La técnica de RFLP también se ha realizado empleando otras secuencias blanco. Con el fin de diferenciar entre aquellos aislados del MTBC que contienen una o pocas copias de la secuencia de inserción IS6110. Entre estas secuencias están la IS1081, una secuencia repetida rica en GC polimórfica (PGRS, por sus siglas en inglés), la secuencia de repetidos en tándem polimórfica mayor (MPTR, por sus siglas en inglés) y la secuencia de 36 pb en la región DR (repetidos directos); encontrando que los mejores resultados para las variantes de pocas copias de IS6110 fue el análisis con PGRS y DR (Van Soolingen *et al.* 1995).

### III.7.2 Panel de tipificación del MTBC

La secuenciación genómica ha permitido el reconocimiento de diferencias entre los genomas de miembros del MTBC, revelando otros elementos genéticos que permite discernir claramente entre las especies del complejo. Una de las técnicas que se han desarrollado a partir de la comparación de genomas es la descrita por Huard y colaboradores (2003), conocida como Panel de Tipificación del MTBC que se basa en la presencia o ausencia de grandes eliminaciones de ADN del genoma, a las que se les nombró Regiones de Diferencia (RD). Se han localizado RD exclusivas para cada miembro del complejo, lo que permite la diferenciación entre éstas. Dicha técnica se realiza mediante la amplificación por PCR de 8 genes que se encuentran dentro de las regiones posiblemente eliminadas,

posteriormente se lleva a cabo una migración en geles de agarosa, con la presencia o ausencia de los amplicones se obtiene un patrón de amplificación que permite asignar la especie (Huard *et al.* 2003; Huard *et al.* 2006). Esta técnica presenta múltiples ventajas, entre ellas la fácil realización, ya que se puede realizar en un solo día teniendo un resultado sin ambigüedades, además de necesitarse solo una pequeña cantidad de ADN, que puede obtenerse directamente de muestras clínicas.

### III.7.3 *Spoligotyping* (Espoligotipificación)

Esta técnica se basa en las propiedades de la región de repetidos directos (DR), que consta de una secuencia de 36 pb que se repite un número variable de veces, a la que se le designa como repetido. Entre cada repetido se encuentra una secuencia variable de entre 35 y 41 pb, conocida como espaciador. Se han identificado hasta 43 espaciadores en la región DR, los cuales pueden estar o no presentes y es precisamente esta característica la que permite la tipificación de los aislados del MTBC en grupos que se conocen como familias (Dale *et al.* 2001). La técnica fue desarrollada por Kamerbeek y colaboradores (1997) y utiliza ADN genómico para realizar una PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar la región DR, el producto obtenido se hibrida con una membrana que tiene sondas complementarias unidas covalentemente a cada uno de los espaciadores. Posteriormente se hace una detección de estas interacciones por una reacción de quimioluminiscencia, el patrón obtenido muestra la presencia y ausencia de cada uno de los espaciadores que es utilizado para realizar una comparación en bases de datos, como es SpolDB4, para asignar la familia a la que pertenece cada uno de los aislados analizados (Kamerbeek *et al.* 1997).

El estudio de las familias del MTBC es una práctica muy utilizada en todo el mundo, por su facilidad de realización y la capacidad para analizar varias muestras a la vez y su gran utilidad epidemiológica. Este uso tan extendido ha permitido que se describan cada vez más familias del MTBC por medio de bases de datos donde la información es recopilada mediante la entrada de patrones de

espoligotipo provenientes de usuarios de todo el mundo. Utilizando la base de datos SpoIDB4 ([www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd\\_myco.html](http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html)), la más reconocida a nivel mundial, Brudey y colaboradores (2006) con los registros de 141 países han logrado identificar 62 grupos de espoligotipos, a los cuales nombraron linajes y sublinajes o familias. Las familias con el mayor número de aislados a nivel mundial son: Haarlem, CAS, LAM, MANU, S, T, X, EAI y Beijing; algunas de ellas estuvieron presentes sólo en determinadas regiones del mundo, aunque otras como la “T” están presentes en todos los continentes. Al analizar la proporción de estas familias mayoritarias por regiones del mundo existen diferencias importantes, por ejemplo, en Centroamérica se tiene una gran proporción de las familias T, X, LAM y Haarlem; en el caso particular de México son abundantes las familias Haarlem, *M. bovis* y LAM (Brudey *et al.* 2006).

#### III.7.4 MIRU-VNTR

La tipificación por medio de Repetidos en Tándem de Número Variable de Unidades Repetitivas Interespaciadas de Micobacterias (MIRU-VNTR) permite la clasificación de los miembros del MTBC en genotipos o familias. Las secuencias MIRU son repetidos en tándem que se encuentran hasta en 41 *loci* distribuidos en todo el genoma de la micobacteria y constan de una secuencias con longitud entre los 40 y 100 pb. La función de las MIRU no es del todo clara aún, pero se propone que tienen una función estructural y de regulación de la expresión de genes adyacentes (Sun *et al.* 2015). La técnica de tipificación MIRU-VNTR fue utilizada previamente por otros autores, pero Supply y colaboradores (2006) estandarizaron el método y lograron definir los genotipos/familias que correspondían con los linajes del MTBC. Esta técnica realiza una amplificación por PCR empleando oligonucleótidos específicos para la región flanqueante de cada uno de los MIRU, posteriormente el tamaño de cada uno de los amplicones resultantes se obtiene con electroforesis en gel de agarosa, determinando así el número de repetidos en cada *locus* que se convierte en un patrón numérico el cual permite asignar un genotipo o familia a las cepas de estudio mediante la comparación de éste en la

base de datos miruvnrplus.org (Supply *et al.* 2006). El número de *loci* MIRU que se analizan es variable, se han utilizado grupos de 9, 12, 15 y 24 MIRU, pero se ha determinado que para estudios epidemiológicos y la obtención de una discriminación adecuada entre aislados el set de 15 *loci* es el más informativo. El nombre que reciben estos genotipos corresponden en su mayoría con los nombres de familias de espoligotipos descritas anteriormente, a excepción de la familia T que no tiene un homólogo bajo la tipificación MIRU-VNTR (Supply *et al.* 2006).

### III.7.5 Polimorfismos de secuencia larga (LPS)

Los polimorfismos de secuencia larga (LSPs, por su nombre en inglés), también conocidos como regiones de diferencia, son eliminaciones de ADN en el genoma de la bacteria. Se ha comprobado que estas eliminaciones son polimorfismos resultado de un único evento, por lo que son confiables para realizar estudios de carácter filogenético; además de que una vez identificados su presencia se puede determinar con un ensayo de PCR. Por medio de este marcador molecular se han logrado identificar linajes dentro del MTBC (Alland *et al.* 2007; Gagneux *et al.* 2006).

### III.7.6 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

Con el desarrollo de nuevas herramientas genómicas y el análisis de un mayor número de genomas aislados de *M. tuberculosis* se han logrado reconocer Polimorfismos de un Solo Nucleótido que son linaje-específicos. Varios estudios importantes se han realizado con esta metodología, utilizando diferentes sets de SNPs e intentando buscar el menor número de SNPs o genes necesarios para lograr que esta técnica sea aplicable a la epidemiología molecular de manera rutinaria.

Uno de los primeros estudios que se enfocaron en la clasificación de miembros del MTBC en el cual a las agrupaciones derivadas se les reconoció como linajes, fue el realizado por Gutacker y colaboradores (2002). En el estudio se utilizaron las secuencias de los dos únicos genomas de *M. tuberculosis*

disponibles a la fecha, pertenecientes a los aislados H37Rv y CDC1551, pero se incluyeron adicionalmente secuencia genómicas parciales del denominado aislado 210 y de *M. bovis* AF2122/97. Con dichos genomas se realizó un alineamiento en el que se identificaron los SNPs sinónimos, considerados buenos marcadores moleculares debido a que son neutrales y no presentan evidencia de eventos de homoplasia. Una vez que se identificaron los SNPs sinónimos (sSNPs) entre dichas secuencias se realizó una búsqueda de su presencia en una colección de 120 aislados representativos de las especies del MTBC, logrando distinguir 8 linajes. Estos linajes obtenidos correspondieron con los grupos genéticos principales, es decir, los aislados de un grupo genético principal permanecían dentro de los mismos linajes; caso contrario ocurrió cuando se analizaron los patrones de RFLP-IS6110, ya que los patrones derivados de RFLP no correlacionaron con el linaje (Gutacker *et al.* 2002).

Posteriormente el estudio realizado por Filliol y colaboradores (2006) buscó un mayor número de SNPs para llevar a cabo el análisis, tomando en cuenta la procedencia de los aislados. Se analizaron 156 sSNPs en 212 aislados y los siete grupos que se definieron en base a estos SNPs se denominaron SNP cluster groups (SCGs). Seis de estos SCGs se conformaron únicamente por los aislados de la especie *M. tuberculosis* y un séptimo SCG se formó exclusivamente por aislados de *M. bovis*. Posteriormente se buscaron los SNPs más informativos para que esta técnica pudiera ser transferible a laboratorios con la finalidad de analizar aislados de manera rutinaria, desarrollando un set de 16 SNPs que lograba definir las mismas agrupaciones (Filliol *et al.* 2006).

En el año 2007 Hersberg y colaboradores realizaron un trabajo más con el fin de evidenciar la diversidad dentro de la especie *M. tuberculosis*, que a la fecha se seguía considerando poco diversa. En dicho estudio se analizaron 108 aislados seleccionados de una colección mundial, 99 de ellos pertenecían a aislados recuperados de humanos y 7 aislados más adaptados a otras especies de mamíferos, que incluían a *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis* BCG, así como un aislado de *M. canetti* que es considerada la especie más distante dentro del MTBC. Se secuenciaron 89 genes de cada aislado lo que

representó una cobertura de aproximadamente 66,000 pb o el 1.5 % del genoma de cada aislado. Al elaborar un árbol filogenético con las secuencias concatenadas de los 89 genes secuenciados de cada aislado se encontró que estos se dividían perfectamente entre ancestrales y modernas. Se determinó que los aislados ancestrales cuentan con la presencia de la región TbD1, que es conocida como región de diferencia 1 y consta del gen *mmpS6*, mientras que los aislados modernos carecen de ella, y además se observó el agrupamiento por linajes. Lo más relevante de este estudio fue el hallazgo de que la diferencia entre el linaje adaptado a otros mamíferos es igual a la que se encuentra entre linajes adaptados a humanos, algo que no se esperaba por tratarse de una especie distinta. Esto sorprende más aún al considerar que el linaje que agrupa a los aislados adaptados a otros mamíferos está compuesto por aislados adaptados a cuatro diferentes especies animales (Hershberg *et al.* 2008).

Se han realizado variantes de estos estudios, en los que se han definido los linajes del MTBC utilizando diversos sets de SNPs, los cuales buscan una tipificación en la que se puedan agrupar sublinajes cada vez más específicos o utilizar el menor número de genes, además de estudios comparativos entre métodos no basados en la secuenciación y los basados en SNPs para conocer la exactitud de estas metodologías.

Uno de estos estudios comparativos fue el realizado por Comas y colaboradores (2009), en el cual compararon las técnicas de spoligotipo y MIRU-VNTR con una clasificación basada en SNPs. Dicho estudio mostró que el spoligotipo no logra definir de manera monofilética 5 de los 7 linajes del MTBC, lo que permite concluir que el spoligotipo no es un buen método para análisis filogenéticos. En cambio, la tipificación mediante MIRU-VNTR mostró una mejor correspondencia con el análisis basado en SNPs, pero esto dependiendo del número de *loci* utilizados, ya que al incluir 24 *loci* se obtenían mejores resultados, pero aun así, 3 de los linajes no se definieron como grupos monofiléticos. La diferencia entre los resultados obtenidos con SNPs contra los obtenidos por MIRU-VNTR y spoligotipo puede deberse a que éstos dos últimos pueden presentar eventos de homoplasia en menor o mayor medida, además de que en dichos



marcadores moleculares la ganancia o pérdida de varios repetidos no puede reconocerse si es resultado de varios o de un único evento; en cambio existe muy poca evidencia de eventos de homoplasia en SNPs (Comas *et al.* 2009).

Una vez establecido que los métodos basados en SNPs generan filogenias más robustas y de mejor resolución, los nuevos métodos de estudio se han enfocado en encontrar nuevas regiones genéticas para encontrar SNPs informativos, así como en determinar el menor número de SNPs necesarios que permitan obtener una discriminación fina y una clasificación adecuada de los miembros del MTBC con la técnica más sencilla posible. En ese sentido, Homolka y colaboradores (2012) analizaron 26 genes que no habían sido estudiados previamente, obteniendo su secuencia a partir de 68 aislados representativos de los principales linajes identificados hasta el momento. A partir del análisis de secuencias se seleccionaron 11 genes que resultaron ser más variables y se probaron en una nueva población proveniente de los aislamientos realizados en el transcurso de un año en Hamburgo, Alemania. Con los datos obtenidos se logró diseñar un algoritmo para el diagnóstico de aislados basado en secuencia que permite clasificar en 17 grupos filogenéticos de manera sencilla, a bajo costo y muy específicamente utilizando únicamente cinco genes (Homolka *et al.* 2012).

La importancia de la vigilancia epidemiológica del MTBC por medio de herramientas genético- moleculares, así como de la realización de nuevos estudios filogenéticos la muestra el estudio realizado por Firdessa y colaboradores (2013), en el cual se realizó el genotipado de aislados clínicos por las técnicas de Spoligotyping y MIRU-VNTR, encontrando que varios aislados no lograban agruparse con ninguno de los seis linajes identificados hasta el momento, mostrando patrones desconocidos. Una vez identificados los aislados de estudio, se realizó un análisis filogenético a partir de las secuencias completas de sus genomas en el que se incluyeron miembros representativos de cada uno de los linajes. Sorpresivamente, se encontró que estos aislados formaban parte de un linaje nuevo que se ubicaba entre los linajes “antiguos” y “modernos”, al que se le designó como linaje 7, por ser el séptimo linaje descrito hasta el momento. Aparentemente este linaje es endémico en Etiopía y muestra una distribución

limitada (Firdessa *et al.* 2013). Este hallazgo demuestra la importancia de la tipificación genético-molecular aplicada a distintas regiones geográficas y de manera rutinaria, ya que variantes endémicas pueden existir y permanecer aún desconocidas.

### **III.8 LINAJES DEL MTBC**

Como se comentó anteriormente, en un inicio se identificaron seis linajes principales del MTBC a los que posteriormente se les sumó un séptimo, de los cuales los linajes 1, 5 y 6 son considerados como “antiguos”, mientras que los linajes del 2-4 como “modernos” y el linaje 7 fue descubierto en Etiopía, el cual parece estar posicionado en la transición entre los linajes antiguos y los modernos (Coll *et al.* 2014). En la actualidad la disponibilidad de tecnologías de secuenciación genómica ha permitido evidenciar no sólo la diversidad genética y la presencia de linajes dentro de los miembros del MTBC, también se ha logrado identificar que estos linajes comparten características como su adaptación a ciertas poblaciones de hospederos. Además, se ha reforzado la hipótesis de que el bacilo participa de manera importante en la diversidad de cuadros clínicos y progresión de la enfermedad que se pueden observar (Warner *et al.* 2015). A continuación se presentan algunas características de los linajes del complejo derivadas del empleo de dichas herramientas.

#### **III.8.1 Linaje 1 (Indo-Oceánico)**

Este linaje es considerado como uno de los linajes “antiguos” y está formado exclusivamente por la familia Este Africo-Indio (EAI), que aunque corresponde con el nombre del linaje 3 (Linaje Este Africo- Indio) no deben de ser asociados. Este linaje se encuentra distribuido en todo el mundo pero es más abundante en el Sureste de Asia, India y Este de África (Azevedo *et al.* 2017).

### III.8.2 Linaje 2 (Este-Asiático)

El principal representante de este linaje es la familia Beijing, de la que se estima comenzó a dispersarse por el mundo a través de los movimientos demográficos humanos hace tan sólo 200 años. En la actualidad dicha familia puede encontrarse prácticamente en cualquier lugar del mundo, por lo que representa el caso más exitoso de dispersión de miembros del MTBC (Merker *et al.* 2015). A la Beijing se le considera una de las familias a la que mayor vigilancia epidemiológica debe prestarse, ya que se le atribuye una gran facilidad de transmisión, hipervirulencia, hipermutabilidad, mayor frecuencia de progresión a enfermedad una vez establecida la infección y una tendencia al desarrollo de cepas MDR (Merker *et al.* 2015). En estudios realizados en la Republica de Sudáfrica con cepas extensamente resistentes y totalmente resistentes a antibióticos, se encontró que el 84% de los aislados MDR se concentraban en tres de las familias de espoligotipo: Beijing, LAM3 y LAM4 (LAM3 y LAM4 pertenecientes al linaje 4), de los cuales el 69% pertenecían al linaje Beijing (Klopper *et al.* 2013). Otro estudio realizado en Sudáfrica donde se hizo un seguimiento del tratamiento de pacientes con TB menciona que las personas que estaban infectadas con bacterias pertenecientes al linaje Beijing tenían un mayor riesgo de tener una recaída que aquellas infectadas con otros genotipos (Nahid *et al.* 2010).

### III.8.3 Linaje 3 (Este Africo-Indio)

El linaje 3 ha sido reportado como el más abundante en el Sudeste Asiático Malasia, Filipinas, Singapur, Myanmar, Tailandia, Bangladesh y Sri Lanka (Ismail *et al.* 2014). Dentro de las familias de espoligotipo que pertenecen a este linaje se encuentra a la familia Deli/Asia Central (CAS). A este linaje se le han asignado características como baja transmisibilidad en comparación con otros linajes, mostrando también asociación con hospederos de distribución geográfica común y natural. En cuanto a la presencia de resistencia a antibióticos, se menciona que posee las mismas facultades para desarrollar resistencia que los demás. En relación a las características de la enfermedad, los pacientes con infección por

este linaje muestran mayor presencia de linfadenitis y mayor desarrollo de TB extrapulmonar, además de menor pérdida de peso (Albanna *et al.* 2011).

#### III.8.4 Linaje 4 (Euro-Americano)

El linaje Euro-Americano está formado por diversas familias de espoligotipo o MIRU-VNTR de distribución geográfica amplia, aunque se pueden encontrar principalmente en Europa y América, con genotipos particulares presentes en África y Este medio (Brudey *et al.* 2006). Entre los miembros que conforman este linaje se encuentra a las familias de espoligotipo Latino Americano-Mediterránea (LAM), Haarlem (H), S, X, Cameroon, Uganda I, Uganda II y T, todas estas caracterizadas por la ausencia de los espaciadores 33-36 de la región DR (Kato-Maeda *et al.* 2011; Rindi, Lari *et al.* 2012). Un estudio en el que se analizaron todos los datos disponibles en las bases de datos de aislados tipificados por espoligotipo y MIRU-VNTR, encontró que de los aislados pertenecientes a América (21,183 aislados tipificados por espoligotipo), el 80.8% pertenecían al linaje 4, lo que lo sitúa como el linaje más representativo para este continente (Reynaud *et al.* 2015).

Diversos autores han relacionado diferentes características a este linaje, entre ellas mencionan que en pruebas radiológicas se puede observar con mayor facilidad la consolidación pulmonar en pacientes infectados con este linaje. La consolidación pulmonar es causada por la ocupación de los espacios de aire por células inflamatorias y exudado, por lo tanto puede estar reflejando una respuesta inflamatoria diferencial para este genotipo (Thwaites *et al.* 2008). En un estudio realizado en Vietnam con pacientes con comorbilidad de SIDA/VIH, se encontró que los aislados pertenecientes al linaje Euro-Americano presentaron un 34% de resistencia a antibióticos, así como la capacidad de causar TB del tipo meníngeo, porcentajes por debajo de los del linaje 2 (Este-Asiático) que presenta los mayores valores de resistencia a antibióticos y se considera el principal agente causal de la TB meníngeo (Thwaites *et al.* 2008). En pacientes de EUA, Brasil, Canadá, España, Sudáfrica y Uganda se encontró que la TB causada por cepas del linaje

Euro-Americano presentaban una mayor carga de bacilos en muestras clínicas (Nahid *et al.* 2010).

### III.8.5 Familia LAM

La familia predominante del linaje Euro-Americano es la familia Latino Americana Mediterránea (LAM), que presenta la mayor diversidad de aislados y es la de distribución más amplia a nivel mundial que las pertenecientes al linaje 4. De un total de 21,183 aislados tipificados por espoligotipo disponibles en las bases de datos originarios de América, se encontró que un 30% pertenecen a la familia LAM (Reynaud *et al.* 2015). A su vez, la familia LAM se divide en diversas subfamilias, de las cuales la subfamilia LAM9 por si sola representa el 10.5% de las muestras analizadas para el continente americano. México no es la excepción, ya que las subfamilias LAM9 y LAM3 son las más representadas (Reynaud *et al.* 2015). En Brasil los aislados pertenecientes a la familia LAM presentaron diferencia significativa en la velocidad de crecimiento en medio de cultivo, característica que se relaciona con la capacidad de reproducción de la bacteria y un metabolismo más activo, lo que genera una mayor carga de bacilos en los pacientes infectados con este genotipo, pudiendo ésto promover una mayor dispersión de dicha familia (Von Groll *et al.* 2010).

### III.8.6 Familia Haarlem

Esta familia es también una de las consideradas más ampliamente distribuidas a nivel mundial, ya que se puede encontrar en todos los continentes. En Europa representa el 25% de los aislados, al igual que para la región de Centroamérica y el Caribe, mientras que en Sudamérica provoca hasta el 50% de los casos y en África es una de las tres familias más abundantes (junto con LAM y T). También se le puede encontrar en Norteamérica, lo que muestra su presencia a lo largo de todo el continente americano (Brudey *et al.* 2006). Yimer y colaboradores (2015) analizaron cepas provenientes de Etiopía, encontrando que los aislados pertenecientes a esta familia presentaron el mayor porcentaje de resistencia a

estreptomycin que los aislados de cualquier otra familia. Esto podría indicar que estos aislados presentan una mayor tasa de transmisión que otras familias (Yimer *et al.* 2016).

### III.8.7 Linaje 5 (*Mycobacterium africanum* I, MAF1) y Linaje 6 (*Mycobacterium africanum* II, MAFII)

De los miembros del MTBC, únicamente las especies *M. tuberculosis* y *M. africanum* son específicas o adaptadas a humanos, aunque existen otras especies que pueden provocar una TB zoonótica como es el caso de *M. bovis*. La identificación de esta especie por lo general se realiza por pruebas bioquímicas, pero se ha encontrado que exhiben gran variedad de perfiles metabólicos que pueden llegar a complicar la correcta identificación de la bacteria. Por medio de pruebas genético- moleculares se ha encontrado que la especie se subdivide en dos grupos filogenéticos, que son el linaje 5 (*M. africanum* I, MAF1) y el linaje 6 (*M. africanum* II, MAFII). A pesar de pertenecer a la misma especie, se ha calculado que la distancia entre ambos linajes es igual que la existente con los linajes pertenecientes a la especie *M. tuberculosis* (Hershberg *et al.* 2008). En cuanto a su distribución, la especie *M. africanum* es la principal causa de TB en África, aunque se ha observado que la distribución de ambos linajes es diferente, mientras que el linaje 5 se encuentra principalmente en la parte oriental de África Occidental, el linaje 6 se encuentra en la parte occidental de África Occidental, y sólo en pocos países como el caso de Ghana y Costa de Marfil coexisten ambos linajes. El por qué estos linajes se encuentran tan limitados en cuanto a distribución es algo aún no elucidado, pero existen reportes de que están estrechamente asociados a la etnicidad de sus hospederos. Así, se ha reportado asociación con la etnia Ewe sobre todo para el caso del linaje 5. Se han reportados casos de Tb causada por *M. africanum* en otros países como Armenia, Inglaterra, EUA, Francia y España, pero en casi todas las ocasiones el hospedero era de origen africano (Asante-Poku *et al.* 2016; de Jong *et al.* 2010).

En general, para la especie *M. africanum* no se reportan características de elevada patogenicidad, ya que la mayoría de los casos provocados por cepas de

esta especie no muestran diferencias en cuanto a la presencia de resistencia a antibióticos. Incluso, en Mali el linaje MAF2 presenta menor tasa de resistencia a antibióticos respecto de *M. tuberculosis*, así como un mayor tiempo de crecimiento en los cultivos, lo que se ha relacionado con el largo periodo de tiempo que este linaje tarda en pasar de la infección a enfermedad. Los aislados del linaje MAF2 (linaje 6) han sido catalogados como fenotipos atenuados, de hecho se reporta asociación con pacientes con VIH/SIDA y con pacientes de la tercera edad, por lo que se le ha considerado más como un linaje oportunista. A pesar de esto, su permanencia como agente infeccioso se atribuye al hecho de ser el linaje filogenéticamente más cercano a los linajes adaptados a animales, que se han reportado un reservorio importante para esta especie bacteriana (Asante-Poku *et al.* 2016; de Jong *et al.* 2010).

### III.8.8 Linaje 7 (Etiopía)

El linaje 7 es el de más reciente descripción, identificado apenas en el año 2013 por Firdessaa y colaboradores (2013) en un estudio realizado en diferentes regiones de Etiopía, en el que de un total de 2,151 pacientes, 36 estaban infectados con este genotipo. Es un caso muy particular ya que filogenéticamente se sitúa entre los linajes conocidos como “modernos” y los “antiguos” (Firdessa *et al.* 2013). Estudios realizados para este linaje han encontrado como característica clínica que los pacientes infectados por lo general tardan mayor tiempo en asistir por ayuda médica, posiblemente porque presentan a menudos síntomas más leves que los que producen otros genotipos. Esto se ha explicado por medio de características fisiológicas de la bacteria, ya que los miembros del linaje 7 crecen con mayor lentitud, y se ha observado que las colonias tienden a ser de menor diámetro, además se menciona que presentan una virulencia disminuida (Yimer *et al.* 2016).

### III.8.9 Linaje *M. bovis*

Éste linaje está conformado exclusivamente por la especie *M. bovis*, especie que tiene la capacidad de provocar TB en muchas especies de mamíferos, incluido el humano, aunque el principal hospedero son los bovinos. La principal vía de contagio al humano es por el consumo de productos lácteos contaminados no pasteurizados, esta hipótesis se apoya en el hecho de que los casos de TB extrapulmonar por *M. bovis* son localizados en la zona abdominal; aunque también se cuenta con algunos reportes de la transmisión de *M. bovis* persona a persona (Gallivan *et al.* 2015). *M. bovis* es resistente de manera natural a pirazinamida, uno de los fármacos antituberculosos más empleados en los tratamientos estandarizados en México y el mundo (Mathema *et al.* 2006). Por otra parte, *M. bovis* tiene mayor propensión a diseminarse en el organismo, ya que en un estudio realizado en Holanda de 213 pacientes a los que se les detectó TB causada por *M. bovis*, el 59% presentó la enfermedad de manera extrapulmonar y otro 12% una combinación de pulmonar y extrapulmonar (Majoor *et al.* 2011). Otras razones por las que se debe distinguir un caso provocado por *M. bovis* es que se presenta un mayor porcentaje de muertes en los pacientes con TB zoonótica, además de ser un indicativo de alimentos contaminados con *M. bovis* y de regiones de alta TB bovina (Majoor *et al.* 2011).



## IV. ANTECEDENTES

### IV.1 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TB EN MÉXICO

En México se han realizado algunos trabajos de epidemiología de TB utilizando técnicas de biología molecular, principalmente empleando herramientas de espigotipado y en menor medida utilizando MIRU-VNTR, así como algunos con IS6110-RFLP y RAPD.

El primer trabajo de epidemiología molecular realizado en México fue elaborado por Ramaswamy y colaboradores (2004), quienes analizaron 50 aislados clínicos de TB en la ciudad de Monterrey, de los cuales 37 eran MDR y fueron tipificados por IS6110-RFLP con el objetivo de encontrar asociación entre la resistencia a antibióticos y el genotipo. Se obtuvieron 24 patrones distintos de RFLP y no se encontró correlación entre el genotipo y la resistencia. Además, se analizaron mutaciones en genes asociados a la resistencia a antibióticos, encontrando correlación entre la presencia de mutaciones en dichos genes y la presencia de resistencia a antibióticos en los aislados (Ramaswamy *et al.* 2004).

Para el estado de Nuevo León se llevó a cabo un trabajo con 180 muestras aisladas de casos clínicos en la ciudad de Monterrey entre los años 1998 y 2005, (Molina-Torres *et al.*, 2010), encontrando que el 48% de las cepas analizadas eran sensibles a antibióticos, 19% monorresistentes (a isoniazida o rifampicina) y 33% MDR. El análisis por espigotipo mostró como familia principal la T (29%) y como segunda más abundante a X (22%), además, la presencia de LAM (6%), H (2%), BOV (1 aislado) y S (5%) (Molina-Torres *et al.* 2010).

Al analizar 90 aislados clínicos de casos pediátricos en epidemiología molecular Macías-Parra y colaboradores (2011), encontraron como Familias principales a LAM (27.8 %), seguido por H y T. También se encontraron las familias Beijing, Manu y bovis (Macías-Parra *et al.* 2011).

Uno de los estudios de epidemiología genético- molecular más representativos de la situación de la TB en México fue el realizado por Martínez-Guarneros y colaboradores (2013), quienes incluyeron en un estudio 109 aislados

resistentes a antibióticos de 23 estados del país, los cuales se analizaron con espigotipo y MIRU-VNTR. Se encontraron 41 patrones de espigotipo diferentes, como familias principales a T y LAM, y en menor proporción las familias Beijing, EAI, X y Haarlem, así como varios aislados con patrones de espigotipo no registrados en las bases de datos (Martinez-Guarneros *et al.*, 2013). En cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Tamaulipas realizado por Bocanegra-García y colaboradores (2014), 19 de 72 aislados pertenecían a la familia LAM9, 13 a la T, 19 Haarlem 3, 6 fueron H37Rv, otros 6 de X1, 5 de Beijing, 4 a la familia 34, 3 a la Haarlem1, 2 a EAI1, 2 a LAM y un aislado a cada una de las familias 33, 36, EAI2, LAM1, LAM3, LAM8, T2 y X2 (Bocanegra-García *et al.* 2014).

En una revisión bibliográfica que conjunta los trabajos realizados en México de tipificación molecular, se encontró que por la técnica de espigotipo se han encontrado como principales familias a H, LAM, X y T, aunque también se ha encontrado en abundancia a EAI, todas del linaje Euro-Americano (Flores-Treviño *et al.* 2014).

## **IV.2 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR EN MICHOACÁN Y QUERÉTARO**

El primer estudio epidemiológico de tuberculosis humana para el estado de Michoacán fue el realizado por Vázquez-Marrufo y colaboradores (2008), utilizando la técnica de RAPD (Ampliación aleatoria de ADN polimórfico) se analizaron 46 muestras clínicas de esputo de pacientes con diagnóstico de TB. En este estudio se utilizaron tres oligonucleótidos diferentes, produciendo un total de 34 amplicones distintos, con estos patrones de amplificación para cada aislado se realizó un dendrograma encontrando 3 grupos de aislados distintos, evidenciando una alta diversidad genética en las muestras analizadas. Además en este estudio se confirmó por PCR la presencia de un aislado de *M. bovis* causando TB zoonótica; este fue el primer reporte de TB en humanos causado por *M. bovis* en Michoacán (Vázquez-Marrufo *et al.* 2008). En el mismo año se publicó un estudio de epidemiología molecular para el estado de Querétaro donde se analizaron 255 muestras provenientes de pacientes con síntomas de tuberculosis,

a los que se les realizó una tinción BAAR para la búsqueda de bacilos en las muestras de esputo. Se empleó PCR anidada con los oligonucleótidos para el gen MPB70 para confirmar la presencia de bacterias del MTBC en las muestras, además del cultivo en medio Lowestein-Jensen con glicerol y Stonebrink con piruvato para favorecer el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, y por último espigotipo para los cultivos positivos. Un total de 94 muestras fueron positivas al realizar la PCR o el aislamiento, encontrando que 66 (70%) pertenecían a *M. tuberculosis* y 13 (13.8%) a *M. bovis* (Pérez-Guerrero *et al.* 2008).

Utilizando el mismo marcador molecular, en el estado de Michoacán se analizaron 33 aislados obtenidos en los años de 2007 a 2009, que en el dendrograma generado se distribuyeron en 3 grupos. El índice de diversidad de Shannon evidenció una diversidad alta entre los aislados de estudio, y además se encontró que los aislados no presentaban relación con el sitio de aislamiento o la ubicación de la enfermedad en el paciente, lo que dejó claro la necesidad de un mayor análisis para conocer la verdadera diversidad dentro de este estado (Guillen-Nepita *et al.* 2013).

Se han realizado dos trabajos más para el estado de Michoacán utilizando la técnica de Spoligotyping y MIRU-VNTR, en uno se analizaron 41 aislados clínicos (Guillén-Nepita, 2014) obtenidos en los años 2007-2009 y en el otro 25 obtenidos en los años 2011-2014. En el primero se encontró que en el estado de Michoacán la familia principal por espigotipo fue X (22%), seguida por T (19.4%) y LAM (16.7%); también se encontró a las familias H, Beijing y EAI, lo que correlacionó con lo obtenido por MIRU-VNTR (Guillén-Nepita, 2014). De la misma manera, se encontraron genotipos a los que no se logró asignar familia por la falta de relación con aquellos genotipos reportados en las bases de datos internacionales. En el segundo trabajo por MIRU-VNTR se encontró como familia más abundante a la Haarlem (26%), seguida de LAM (18%) y en tercer lugar la S (8%), además se documentó la presencia de las familias X, EAI, Uganda I y Uganda II, Cameroon, NEW-1, Beijing y Ghana, así como varios genotipos que no se lograron definir por no estar reportados en las bases de datos internacionales (Vázquez-Heredia, 2014).

## V. JUSTIFICACIÓN

Tomando en consideración el tamaño poblacional y la complejidad geográfica y socioeconómica de México, a la fecha son pocos los estudios de epidemiología genético-molecular del MTBC realizados en el país. La mayoría de dichos estudios se han enfocado exclusivamente en identificar y caracterizar a aislados MDR, por lo que se excluye una gran parte de la diversidad del patógeno existente en el país. La técnica más utilizada para la tipificación del MTBC en México es el espoligotipo, sin embargo, en todos los estudios realizados con dicha técnica se encuentran genotipos no reportados, por lo que el respaldo de un segundo método como MIRU-VNTR posibilita una caracterización con un poder de resolución más robusto, lo que provee de información epidemiológica relevante para entender la dinámica de transmisión del patógeno.

Por otra parte, no se han realizado estudios comparativos de aislados obtenidos de regiones geográficas adyacentes. Se ha documentado que el movimiento de poblaciones humanas permite la dispersión de cepas de *M. tuberculosis* de las mismas familias o linajes en sitios muy alejados de su centro de origen, lo que enfatiza la necesidad de conocer el dinamismo en los genotipos presentes en el estado de Michoacán, para determinar de manera regional patrones que ayuden a plantear estrategias de control en la dispersión de cepas de *M. tuberculosis* (Wirth *et al.* 2008, Hershberg *et al.* 2008). Para ello es indispensable el análisis de las regiones cercanas y de mayor intercambio socioeconómico. Michoacán tiene como estados vecinos a Colima, Jalisco, Guanajuato, Estado de México, Guerrero y Querétaro; de los cuales este último ha iniciado hace algunos años el aislamiento de cepas de *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas para realizar análisis epidemiológicos con herramientas genético-moleculares, lo que permite una comparación epidemiológica entre dicha entidad federativa y Michoacán. Es por ello que en este trabajo se seleccionó a los dos estados para llevar a cabo un estudio donde se comparan los genotipos presentes en dos estados en nuestro país.

## **VI. HIPÓTESIS**

Los estados de Michoacán y Querétaro presentan una composición diferente de especies, familias y genotipos de *Mycobacterium tuberculosis*, compartiendo las familias y genotipos mayoritarios.

## **VII. OBJETIVOS**

### **VII.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar un análisis epidemiológico molecular que permita comparar los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* en distinto nivel de resolución presentes en los estados de Michoacán y Querétaro.

### **VII.2 Objetivos particulares**

1. Determinar las especies presentes del MTBC en los casos de tuberculosis humana en los estados de Michoacán y Querétaro.
2. Definir las familias y genotipos de *M. tuberculosis* presentes en los estados de Michoacán y Querétaro.
3. Evaluar y comparar la estructura de la población del complejo *M. tuberculosis* en los estados de interés.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VIII.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se analizaron 25 aislados del MTBC obtenidos del estado de Michoacán por medio del Laboratorio Estatal de Salud Pública, y 21 del estado de Querétaro donados por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Querétaro. En ambas entidades los aislados fueron obtenidos de muestras clínicas de esputo de pacientes con sospecha de TB, la presencia de bacilos en las muestras confirmaron la localización pulmonar de la enfermedad.

### VIII.2 EXTRACCIÓN DE ADN

La obtención del ADN de las cepas del estudio se realizó por el método fenol-cloroformo, previa inactivación de la viabilidad de los bacilos a 80°C por una hora (Allix-Béguec *et al.* 2008).

### VIII.3 ENSAYOS DE PCR DEL PANEL DE TIPIFICACIÓN DEL MTBC

Una vez obtenido el ADN de las muestras, este se utilizó para realizar ensayos de PCR para la determinación de especie de acuerdo a la técnica descrita por Huard y colaboradores (Huard *et al.* 2006), llamado panel de tipificación del MTBC, en el que se utiliza un set de 8 oligonucleótidos. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada una de las regiones, así como los patrones correspondientes a cada especie del complejo para este análisis se encuentran en la cuadros 1 y 2, respectivamente. Las reacciones de amplificación se prepararon con Tris-HCl pH 8.4 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, dNTPs 0.2 mM, 1 µM de cada oligonucleótido, 0.75U de *Taq* DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen®, USA), DMSO al 4% y 30 ng de ADN blanco. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 5 min de desnaturalización inicial a 95°C, 25 ciclos con una etapa de desnaturalización de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C (Huard *et al.* 2003). La visualización de los amplicones obtenidos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al

2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio en una concentración de 0.5 µg/mL. Una vez observados los patrones de amplificación se compararon con los patrones establecidos que se muestran a continuación junto con los oligonucleótidos utilizados.

#### VIII.4 CONFIRMACIÓN DE LA ELIMINACIÓN RD<sup>RÍO</sup> PARA AISLADOS CON AUSENCIA DE LA REGIÓN /S1561'

Se utilizaron los iniciadores diseñados por Lazzarini *et al.* (2007), y las condiciones de amplificación mediante PCR descritas en dicho trabajo.

**Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de tipificación del MTBC para la determinación de especie de los aislados de estudio.**

Uso	Región	Clave	Secuencia(5' – 3')	Referencias
Tipificación a nivel de especie	16S rRNA	16SrRNAF	ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C	Huard <i>et al.</i> 2003; Huard <i>et al.</i> 2006.
		16SrRNAR	TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A	
	Rv0577	Rv0577F	ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA	
		Rv0577R	CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA	
	IS1561' (MiD3)	IS1561'F	GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT	
		IS1561'R	AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCACCA TTG ACT	
	Rv1510	Rv1510F	GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC	
		Rv1510R	TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C	
	Rv1970	Rv1970R	GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC	
		Rv1970F	CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG	
	Rv3877/8	Rv3877/8F	CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC	
		Rv3877/8R	CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C	
	Rv2073c	Rv2073cF	TCG CCG CTG CCA GAT GAG TC	
		Rv2073cR	TTT GGG AGC CGC CGG TGG TGA TGA	
	Rv3120	Rv3120F	GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT	
		Rv3120R	GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T	

**Cuadro 2. Patrón de amplificación de las especies del MTBC<sup>1</sup> reportadas por Huard.**

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

<sup>1</sup>Modificada (Huard *et al.* 2003; Huard *et al.* 2006).

<sup>2</sup>MOTT, *Mycobacterium other than tuberculosis*, es decir una micobacteria que no pertenece al MTBC.

## VIII.5 TIPIFICACIÓN MEDIANTE SPOLIGOTYPING

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

Para obtener múltiples copias de la región DR se utilizaron los oligonucleótidos previamente descritos, DRa y DRb (Cuadro 3). La mezcla de reacción fue la siguiente: Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.02 mM de cada dNTP, 0.08 µM de DRa, 0.08 µM de DRb, 0.5U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen®, USA), 4 ng/µL de ADN y agua desionizada estéril hasta un volumen final de 50 µL. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador TGRADIENT (Biometra, Germany), mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C por 4 min; 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 5 min, con una extensión final a 72°C por 5 min (Kamerbeek *et al.* 1997).



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

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

## VIII.6 TIPIFICACIÓN POR MIRU-VNTR

Para este análisis se realizaron amplificaciones mediante PCR de 15 regiones del genoma correspondientes a secuencias repetitivas en tándem, para las que se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Supply *et al.* (2006) mostrados en el cuadro 3. La mezcla de reacción fue la siguiente: Tris pH 8.4 20 mM, KCl 50 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.4  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0.4U de *Taq* ADN Polimerasa Recombinante (Invitrogen®, USA), DMSO 4% y de 20 a 50 ng de ADN templado. La concentración de MgCl<sub>2</sub> varió según el *locus* amplificado, siendo de 3.0 mM para MIRU4, MIRU26, MIRU40, Mtub30m Mtub39 y QUB4156; de 2.0 mM para MIRU10, MIRU16 y MIRU31; y de 1.5 mM para Mtub04, ETRC, ETRA, QUB11b, Mtub21 y QUB56. En todos los casos el programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 59°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min; y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio en una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL. El número de repetidos presente en cada *locus* se llevó a cabo con la ayuda del software QuantityOne® de BIORAD® (USA) y sus herramientas Bands, BandsMatching y Variable Number of Tandem Repeats.

Con los patrones de amplificación obtenidos se creó una matriz de datos donde se indicaron los *loci* utilizados y el número de repetidos en cada uno de ellos, el archivo se exportó a la base de datos MIRU-VNTRplus (mirus-vntrplus.org) donde se seleccionaron los 15 *loci* utilizados. Se utilizó la herramienta *Identification by similarity search* utilizando una distancia genética máxima de 0.26, asignando al aislado el genotipo que presentara un menor valor de distancia, de igual manera se asignó el genotipo por medio de la herramienta *identification by phylogenetic tree*, determinando el genotipo con que se mostró mejor agrupación (Allix-Béguec *et al.* 2008).

**Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de tipificación del MTBC por MIRU-VNTR.**

Uso	Región	Clave	Secuencia(5' – 3')	Referencias
Tipificación por spoligotyping	Repetidos directos	DRa DRb	Biotina-GGT TTT GGG TCT GAC GAC CCG AGA GGG GAC GGA AAC	Kamerbeek <i>et al.</i> 1997
Tipificación por MIRU-VNTR	MIRU4	MIRU4F	GCG CGA GAG CCC GAA CTG C	Supply <i>et al.</i> 2006.
		MIRU4R	GCG CAG CAG AAA CGT CAG C	
	MIRU26	MIRU26F	TAG GTC TAC CGT CGA AAT CTG TGA C	
		MIRU26R	CAT AGG CGA CCA GGC GAA TAG	
	MIRU40	MIRU40F	GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T	
		MIRU40R	GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA	
	MIRU10	MIRU10F	GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC	
		MIRU10R	GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT	
	MIRU16	MIRU16F	TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A	
		MIRU16R	CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC	
	MIRU31	MIRU31F	ACT GAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA	
		MIRU31R	GTG CCG ACG TGG TCT TGA T	
	Mtub04	Mtub04F	CTT GGC CGG CAT CAA GCG CAT TAT T	
		Mtub04R	GGC AGC AGA GCC CGG GAT TCT TC	
	ETRC	ETRCF	CGA GAG TGG CAG TGG CGG TTA TCT	
		ETRCR	AAT GAC TTG AAC GCG CAA ATT GTG A	
	ETRA	ETRAF	AAA TCG GTC CCA TCA CCT TCT TAT	
		ETRAR	CGA AGC CTG GGG TGC CCG CGATTT	
	Mtub30	Mtub30F	CTT GAA GCC CCG GTC TCA TCT GT	
		Mtub30R	ACT TGA ACC CCC ACG CCC ATT AGT A	
	Mtub39	Mtub39F	CGG TGG AGG CGA TGA ACG TCT TC	
		Mtub39R	TAG AGC GGC ACG GGG GAA AGC TTA G	
	QUB4156	QUB4156F	TGA CCA CGG ATT GCT CTA GT	
		QUB4156R	GCC GGC GTC CAT GTT	
	QUB11b	QUB11bF	CGT AAG GGG GAT GCG GGA AAT AGG	
		QUB11bR	CGA AGT GAA TGG TGG CAT	
	Mtub21F	Mtub21F	AGA TCC CAG TTG TCG TCG TC	
		Mtub21R	CAA CAT CGC CTG GTT CTG TA	
	QUB26	QUB26F	AAC GCT CAG CTG TCG GAT	
		QUB26R	CGG CCG TGC CGG CCA GGT CCT TCC CGA T	

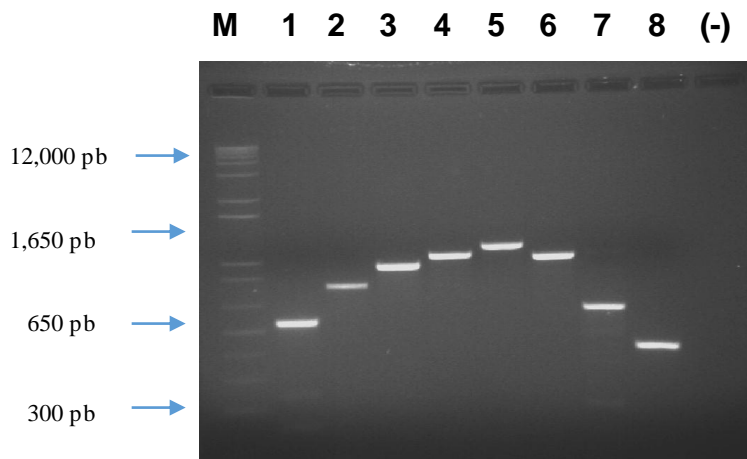
## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IX.1 TIPIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

Con el ADN obtenido se realizaron los ensayos de PCR en los que se amplificaron las 8 regiones genéticas descritas por Huard *et al.* (2006) para la identificación de especies del MTBC (Cuadro 2). Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) con el objetivo de confirmar la identidad taxonómica de cada una de las cepas de estudio.

En la mayoría de los aislados, tanto del estado de Michoacán como del estado de Querétaro se obtuvieron amplicones para todos los *loci* analizados (Figura 1), con lo que se confirmó la especie *M. tuberculosis* dentro del MTBC. Esto corresponde con lo esperado, dado que la principal especie encontrada en TB humana es *M. tuberculosis*.

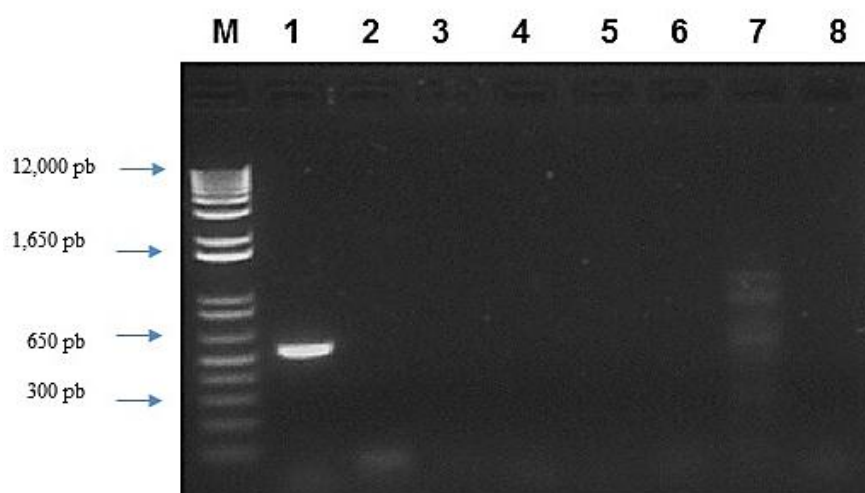
Por otra parte, también se registraron patrones de amplificación distintos a los de dicha especie y otros en los que no se pudo determinar la identidad taxonómica con precisión, ya que no han sido reportados previamente (Cuadro 3).



**Figura 1. Patrón de amplificación de la especie *M. tuberculosis* en el ensayo del Panel de Huard.** Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con Bromuro de etidio que muestra el patrón de amplificación característico de la especie *M. tuberculosis* obtenido para la mayoría de los aislados. Carril M, marcador de tamaño molecular de 1 kb (Invitrogen, USA) las flechas indican el peso molecular. Carriles 1, 16S rRNA; 2, Rv0577; 3, IS1561'; 4, Rv1510; 5, Rv1970; 6, Rv3877/8; 7, Rv2073c y 8, Rv3120.

## IX.2 AISLADOS CON PATRONES PARTICULARES

Los aislados MYC070, MYC071 y MYC118 mostraron patrones de amplificación que no han sido reportados previamente, por lo que no se pudo asignar una especie. En el caso de los aislados MYC070 y MYC071, el amplicón no encontrado corresponde al *locus* Rv1970 (Cuadro 4), el cual se ubica dentro de la región de diferencia (RD) 7 descrita por Brosch *et al.* (2002) y que corresponde a una eliminación de 12.7 kb que involucra a 13 genes. Posteriormente se realizó un análisis de esta región (Figura 4) para la confirmación de la eliminación utilizando los iniciadores reportados en la literatura (Brosch *et al.* 2002).



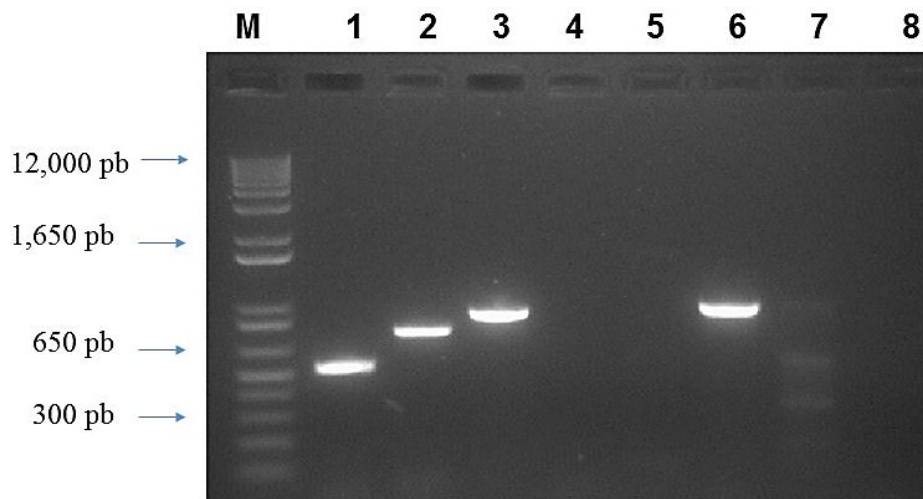
**Figura 2. Patrón de amplificación de micobacterias no pertenecientes al MTBC en el ensayo del Panel de Huard.** Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio que muestra el patrón de amplificación característico para Micobacterias no pertenecientes al MTBC. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen, USA) las flechas indican el peso molecular. Carriles 1, 16S rRNA; 2, Rv0577; 3, IS1561'; 4, Rv1510; 5, Rv1970; 6, Rv3877/8; 7, Rv2073c y 8, Rv3120.

**Cuadro 4. Patrones de amplificación de Huard de aislados distintos a *M. tuberculosis*.**

Estado	Aislados	Patrón de amplificación <sup>1</sup>
Michoacán	MYC070, MYC071	11110111
	MYC080, MYC086	11011111
	MYC083, MYC084	10000000
Querétaro	MYC104, MYC110, MYC114	11100100
	MYC105	10000000
	MYC118	11111100

<sup>1</sup> Se muestra el patrón de amplificación de Panel de Huard indicado con un 1 la presencia de la banda esperada y con un 0 su ausencia. El orden de los 8 dígitos corresponde a la numeración de las regiones genéticas amplificadas 1, 16S rRNA; 2, Rv0577; 3, IS1561'; 4, Rv1510; 5, Rv1970; 6, Rv3877/8; 7, Rv2073c y 8, Rv3120.

Los aislados MYC083, MYC084 y MYC105 presentaron un patrón de amplificación característico de cepas del género *Mycobacterium* (Figura 2), pero no corresponde a ninguna micobacteria del MTBC. Se ha reportado previamente que micobacterias no pertenecientes al MTBC pueden encontrarse causando tuberculosis con frecuencia, sobre todo en personas que tienen un sistema inmune comprometido, normalmente estos casos son agrupados y nombrados como micobacteriosis (Katoch, 2004). En los estudios que se han realizado en México para otros estados no se ha reportado la presencia de micobacterias no pertenecientes al MTBC en aislados clínicos, debido tal vez a que son muy pocos los casos en los que se lleva a cabo la identificación a nivel de especie dentro del MTBC. Sin embargo, para el estado de Michoacán se han reportado previamente este tipo de micobacterias ocasionando la enfermedad (Guillén-Nepita 2014, datos no publicados). Este tipo de hallazgos refuerza la necesidad de realizar estudios de determinación de especie.

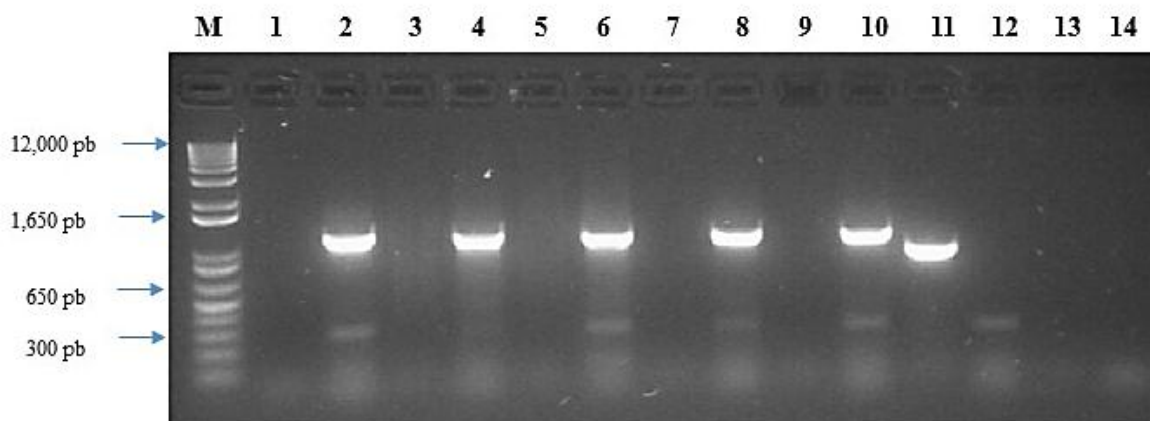


**Figura 3. Patrón de amplificación de la especie *M. bovis* en el ensayo del Panel de Huard.** Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio que muestra el patrón de amplificación característico de la especie *M. bovis*. Carril M, Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, USA) las flechas indican el tamaño molecular. Carriles 1, 16S rRNA; 2, Rv0577; 3, IS1561; 4, Rv1510; 5, Rv1970; 6, Rv3877/8; 7, Rv2073c y 8, Rv3120.

Los aislados MYC104, MYC110 y MYC114, todos ellos pertenecientes al estado de Querétaro, tienen un patrón que corresponde a la especie *M. bovis* (Figura 3), por lo que se sugiere que son casos de tuberculosis zoonótica. Estos resultados son congruentes con un estudio previo realizado en dicha entidad, en el cual se documentó que de 74 aislados analizados cinco mostraron patrones de Spoligotyping que correspondían a la especie *M. bovis*, demostrando que los casos de zoonosis en el estado son frecuentes (Pérez-Guerrero *et al.* 2008). En otro estudio realizado en la ciudad de Querétaro, con aislados provenientes de muestras clínicas de pacientes con sospecha de TB en los años 2013 y 2014 la especie *M. bovis* representó el 9% de los casos positivos de TB (Perea-Razo *et al.*; 2017). En contraste, en el Estado de Michoacán, de los estudios genético moleculares realizados en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la UMSNH únicamente se ha encontrado un aislado perteneciente a *M. bovis* en 132 aislados analizados hasta el momento (Vázquez-Marrufo *et al.* 2008). La diferencia de la presencia de TB zoonótica entre dichas entidades puede estar ligada a las actividades ganaderas de cada estado; ya que en Michoacán la crianza de ganado es principalmente para la producción de carne, mientras que en Querétaro es destinado para la producción de leche. En el año 2010 la producción de cabezas de ganado para carne en Michoacán fue de 1,772,812 y en Querétaro de 226,783 ; a pesar de esta diferencia el estado de Querétaro supera a Michoacán en la producción de leche. Esto es importante debido a que la incidencia de TB en hatos lecheros es de hasta 17% (Rubio-Lozano *et al.* 2013). Por otra parte Michoacán cuenta con 6 Municipios acreditados como zonas de baja incidencia de TB bovina, mientras que el estado de Querétaro no cuenta con acreditaciones de este tipo, esto indica menores valores de TB bovina en Michoacán ([https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/182824/REGIONES\\_ACREDITADAS\\_18ENE2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/182824/REGIONES_ACREDITADAS_18ENE2017.pdf)).

En el caso de los aislados MYC080 y MYC086 pertenecientes al estado de Michoacán, el patrón obtenido no corresponde a ninguna de las especies del MTBC. La pérdida de la región 'IS1561' que se observa en estos aislados ya se ha reportado previamente, tanto en del estado de Michoacán (Guillén-Nepita, 2013;

Vázquez-Heredia, 2014), como en otros países de América, principalmente en Brasil, donde fue reportada por primera vez, siendo el genotipo mayoritario causante de TB en la ciudad de Río de Janeiro. La eliminación de la región *IS1561'* denominada RD<sup>Río</sup> descrita por Lazzarini *et al.* (2007) abarca una región de 26,317 pb dentro de la cual se encuentran 10 genes, entre ellos 2 pertenecientes a la familia PPE y otros dos genes que codifican para proteínas putativas integrales de membrana. Esta eliminación se atribuye a la recombinación homóloga entre dos genes que flanquean la región, denominados Rv3346c y Rv3355c (Lazzarini *et al.* 2007). Para confirmar que la ausencia del amplicón esperado en estas cepas se trataba de la eliminación correspondiente a las cepas RD<sup>Río</sup>, se realizó la amplificación por PCR con iniciadores específicos que flanquean la región descritos por Lazzarini *et al.* (2007).



**Figura 4. Confirmación de la eliminación RD<sup>Río</sup> mediante la amplificación de la región *IS1561'*.** Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio que muestra la ausencia de la región *IS1561'* y la presencia de la eliminación RD<sup>Río</sup>. Carriles: M, Marcador de peso molecular, 1 kb (Invitrogen, USA) las flechas indican el tamaño molecular; 1, 3, 5, 7 y 9, amplificación mediante PCR para la región *IS1561'* eliminada de los aislados MYC055, MYC061, MYC065, MYC080 y MYC086 respectivamente; 2,4,6,8,10 amplicón que confirma la eliminación RD<sup>Río</sup> en los mismos aislados, respectivamente; 11, amplicón obtenido para la cepa de referencia H37Rv de la región *IS1561'*; 12, ausencia de la eliminación RD<sup>Río</sup> en la cepa H37Rv, 13 y 14 controles negativos para *IS1561'* y RD<sup>Río</sup>.

Se obtuvo el amplicón esperado, lo que indica que se trata de la eliminación RD<sup>Río</sup> (Figura 4). La detección de este genotipo particular en Michoacán es interesante, ya que no se encontró en los aislados de Querétaro analizados, con un número de muestras similar. En otros estados del país no se ha reportado



tampoco la presencia de dicho genotipo, debido principalmente a que el único sistema de tipificación que se utiliza es el spoligotipo. Así, estos resultados muestran la relevancia de utilizar el sistema de tipificación del Panel de Huard, el cual es complementario al spoligotipo y genera información epidemiológica adicional, incluida la identificación de la especie dentro del MTBC y la presencia de genotipos particulares. El genotipo RD<sup>Río</sup> tiene relevancia en salud pública debido a las características clínicas de los pacientes que lo portan. Análisis en pacientes que fueron diagnosticados con TB causada por esta variedad genética mostraron una mayor pérdida de peso en el caso de la TB pulmonar; en cuanto al análisis de muestras de esputo, se encontró que presentaban una mayor carga de bacilos que los genotipos que no presentan la eliminación, así como una mayor asociación con hemoptosis en las muestras (Lazzarini *et al.* 2007).

### **IX.3 Genotipificación por *Spoligotyping***

La determinación de familias por medio de Spoligotyping se realizó según lo reportado por Kamerbeek *et al.* (1997), obteniendo los patrones de presencia o ausencia para cada espaciador para 40 aislados que se analizaron por esta técnica. Se descartaron los aislados pertenecientes a micobacterias atípicas, así como el aislado MYC081 por falta de ADN, se incluyeron como controles las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5 (Figura 5).



**Cuadro 5. Familias obtenidas por Spoligotyping y MIRU-VNTR para los aislados analizados.**

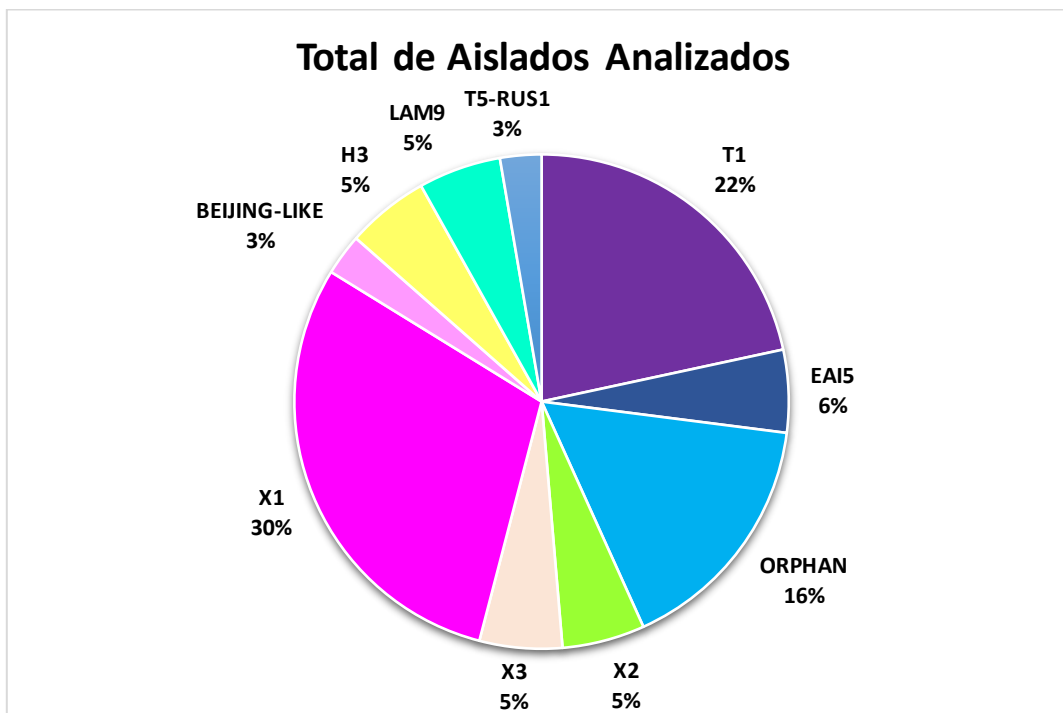
MYC	Especie	Familia	
		Spoligotyping	MIRU-VNTR
066	<i>M. tuberculosis</i>	T1	Haarlem*
069	<i>M. tuberculosis</i>	T1	Haarlem
070	<i>M. tuberculosis</i>	SS	EAI
071	<i>M. tuberculosis</i>	EAI5	EAI
073	<i>M. tuberculosis</i>	Huérfano	Uganda I*
076	<i>M. tuberculosis</i>	X2	X*
079	<i>M. tuberculosis</i>	X3	Haarlem*
080	<i>M. tuberculosis</i>	Huérfano	LAM*
081	<i>M. tuberculosis</i>	SS	Cameroon*
082	<i>M. tuberculosis</i>	T1	Cameroon*
086	<i>M. tuberculosis</i>	Huérfano	LAM*
087	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
088	<i>M. tuberculosis</i>	Huérfano	H37Rv*
089	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
090	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
091	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
092	<i>M. tuberculosis</i>	T1	S*
093	<i>M. tuberculosis</i>	X2	X*
094	<i>M. tuberculosis</i>	BEIJING-LIKE	Beijing
095	<i>M. tuberculosis</i>	Huérfano	S
096	<i>M. tuberculosis</i>	H3	Haarlem
097	<i>M. tuberculosis</i>	X1	X
098	<i>M. tuberculosis</i>	X3	X*
099	<i>M. tuberculosis</i>	LAM9	LAM*
100	<i>M. tuberculosis</i>	Huérfano	LAM
102	<i>M. tuberculosis</i>	H3	Haarlem
103	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
104	<i>M. bovis</i>	SS	Bovis*
106	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
107	<i>M. tuberculosis</i>	T1	S
108	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem*
109	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
110	<i>M. bovis</i>	SS	Bovis*
111	<i>M. tuberculosis</i>	T1	Haarlem*
112	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
113	<i>M. tuberculosis</i>	EAI5 or EAI3	EAI*
114	<i>M. bovis</i>	SS	Bovis*
115	<i>M. tuberculosis</i>	LAM9	LAM*
116	<i>M. tuberculosis</i>	X1	Haarlem
117	<i>M. tuberculosis</i>	T1	S
119	<i>M. tuberculosis</i>	T5_RUS1	Cameroon*
120	<i>M. tuberculosis</i>	T1	S

\*: Aislados que se determinó familia por árbol filogenético en la base de datos.

Se asignó la familia por Spoligotyping para los aislados analizados, a excepción del aislado MYC081 por no contar con el ADN suficiente para el ensayo. En el caso de los aislados MYC104, MYC110 y MYC114, no obstante contar con la cantidad de ADN adecuada para el ensayo, no se observó ningún

patrón, posiblemente la calidad del ADN no permitió el análisis de estas muestras. Estos aislados fueron identificados como *M. bovis* tanto en el ensayo de tipificación del MTBC, como por MIRU-VNTR que se muestra en el cuadro 5. También se encontraron aislados que no correspondieron con los patrones reportados en las bases de datos, a los que se les identifica como “Huérfanos”. Los patrones huérfanos con frecuencia son reportados en los estudios realizados por espoligotipo en México, esto puede estar influenciado por la falta de estudios genético-moleculares en el país, ya que la mayoría de patrones en las bases de datos son entradas provenientes de otros países.

Posteriormente se calcularon los porcentajes de las familias identificadas en los 40 aislados analizados por Spoligotipyn, esto se hizo de manera conjunta y para cada uno de los estados del estudio (Figura 6).

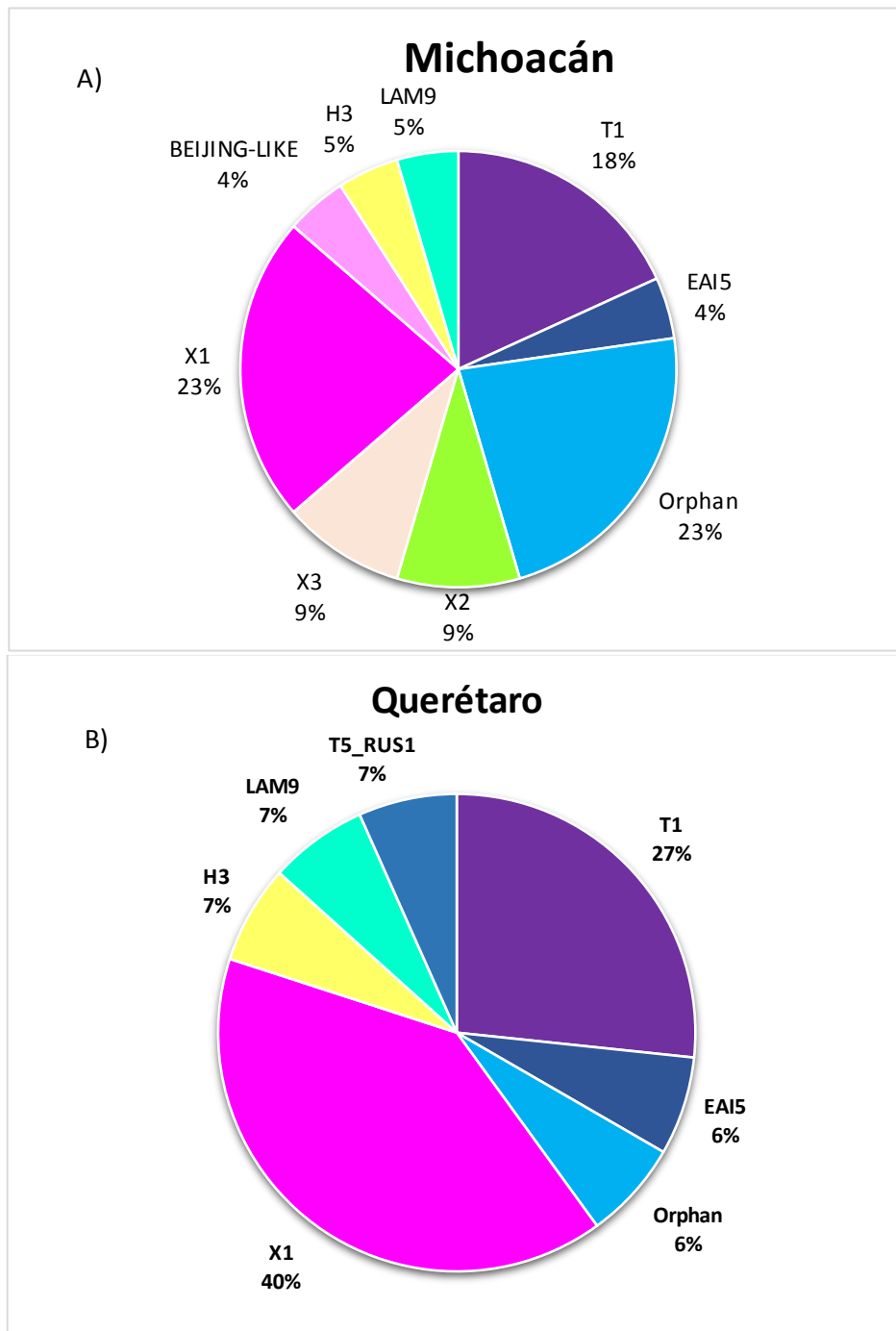


**Figura 6. Porcentajes de familias identificadas por espoligotipo.** El gráfico muestra el porcentaje de cada una de las familias encontradas en los 40 aislados analizados por spoligotyping.

A partir de la comparación con las bases de datos, se pudieron asignar los aislados de estudio a un total de 9 familias distintas. La familia más abundante fue X1 (30%), seguida de T1 (22%), un 16% de los aislados se reportaron como huérfanos por no corresponder con los reportados en la base de datos por lo tanto no se logró asignar la familia. Además, se encontraron con un 6% la familia EAI5, un porcentaje del 5% para las familias LAM9, H3, X3, X2 y un 3% para las familias Beijing-LIKE y T5-RUS1.

Las familias aquí encontradas coinciden en general con lo reportado por Martínez-Guarneros *et al.* (2013), aunque con algunas diferencias en los porcentajes de abundancia, ya que mientras en dicho estudio se documenta la presencia de la familia T1 como la más abundante (33%), seguida de la familia LAM, en el presente trabajo, ésta última no se encuentra entre las mayoritarias. En el mismo estudio previo se reporta la presencia de las familias X1, X3, H3, EAI5 y LAM9, también en el presente trabajo. Por otra parte, en la revisión sobre los estudios genético-moleculares de *M. tuberculosis* realizados en México, Flores-Treviño *et al.* 2014 reportan a X1 y T1 como unas de las familias más representativas del país, en concordancia con los resultados aquí presentados. Los porcentajes obtenidos en el presente trabajo muestran una concordancia significativa con la abundancia de familias de *M. tuberculosis* reportadas para el estado de México, en donde la familia X1 fue la más representada con un 30%, seguida de la familia T (20%), lo cual puede estar estrechamente relacionado con la cercanía geográfica entre ambos estados, los cuales comparten fronteras (Zenteno-Cuevas *et al.* 2015). En resumen, la presencia y abundancia de la mayoría de estas familias encontradas en Michoacán y Querétaro corresponde con lo esperado para el país, en particular, la mayoría de estas pertenecen al linaje 4 (Euro-Americano), el principal linaje asociado a TB en América, incluyendo a México (Comas *et al.* 2009).

En el análisis por entidades se puede encontrar diferencia en cuanto a las familias encontradas y la abundancia de las mismas. Así, del total de 22 aislados analizados por Spoligotyping para el estado de Michoacán se identificaron 8 familias diferentes, mientras que de los 15 aislados analizados para el estado de Querétaro, ya que en los 3 aislados *M. bovis* no se obtuvo patrón de spoligotyping, se identificaron 6 familias distintas, en ambos casos se encontraron aislados huérfanos. Para el estado de Querétaro las familias X1 (40%) y T1 (20%) fueron las mayoritarias, con H3, LAM9, T5-RUS1, EAI5 y huérfanos presentando un aislado cada una (Figura 8). Mientras que para Michoacán se reportaron las familias X1 y aislados huérfanos en un 23% para cada caso, seguido de T1 (18%), X3 y X2 (9%), y un aislado para las familias Beijing-LIKE, H3, LAM9 y EAI5 (Figura 7).



**Figura 7. Familias del MTBC identificadas por spoligotyping en Michoacán y Querétaro.** Muestra las familias de espoligotipo encontradas para Querétaro en el panel A, para Michoacán panel B.

En el estado de Michoacán se encontró un mayor número de familias, aunque esto puede estar influenciado por el número de aislados analizados en

cada entidad. En ambos casos la familia mayoritaria fue X1 seguido de T1. En el estado de Querétaro se identificó la familia T5-RUS1, que no se reportó en Michoacán. Mientras que en Michoacán se identificaron las familias Beijing-LIKE, X2 y X3, que no se encontraron en Querétaro. La familia T5-RUS1 ha sido reportada en EUA, Brasil y Argentina según lo reportado por la base de datos SITVIT, por lo que su presencia indica una amplia distribución en el continente Americano. En cuanto a las familias encontradas en Michoacán, estas habían sido reportadas previamente para el estado en el estudio realizado por Guillén-Nepita (2014), a excepción de las familias Beijing-LIKE y H3, que son nuevos reportes. A su vez en dicho trabajo previo se reportaron las familias Beijing, T2 y H1, las cuales no se encontraron en el presente estudio (Guillén-Nepita, 2014, datos no publicados).

#### **VII.4 Genotipificación de las cepas del MTBC mediante MIRU-VNTR**

Para la determinación de genotipos se analizaron las regiones MIRU-VNTR descritas por Supply y colaboradores (2006), utilizando el esquema de 15 *loci*. Se amplificaron mediante PCR cada uno de los 15 *loci* antes mencionados para todos los aislados del estudio, excepto aquellos provenientes de micobacterias no tuberculosas, que carecen de las regiones MIRU-VNTR. Posteriormente se analizó el tamaño de los amplicones obtenidos, logrando determinar el número de repetidos en cada uno de los *loci*, y con el número de repetidos de cada aislado se elaboró una matriz de datos. La matriz de datos resultante se sometió a la base de datos MIRU-VNTRplus ([miru-vntrplus.org](http://miru-vntrplus.org)) para asignar el genotipo, utilizando dos métodos. El primero de ellos se realizó con la herramienta “*Identification by similarity search*”, que busca en la base de datos de referencia el genotipo con el código numérico más parecido a cada uno de los aislados en cuestión, de esta manera se logró asignar genotipo únicamente a 19 aislados de los 43 sometidos a dicho análisis. El segundo análisis se realizó utilizando la misma base de datos con la herramienta “*Identification by phylogenetic tree*”, mediante el cual se construye un árbol filogenético con el algoritmo de *Neighbor Joining* agrupando a



los aislados de estudio con los aislados de referencia con mayor similitud dentro de la base de datos. Con esta estrategia se asignó el genotipo a cada uno de los aislados analizados. Los resultados obtenidos de dicho análisis se muestran en el cuadro 5 y se identifican con un asterisco en la parte superior derecha. Los aislados con código MYC que tienen un número menor a 100 pertenecen al estado de Michoacán, mientras aquellos con códigos MYC con números mayores 100 pertenecen al estado de Querétaro.

Al igual que para las familias obtenidas por espoligotipo, se calcularon los porcentajes obtenidos en el total de aislados y por entidad. En este caso, la familia con mayor número de aislados fue Haarlem (38%), seguida por LAM y S (12%); en menor proporción se encontraron las familias X (10%) EAI, Bovis y Cameroon (7%) y por último Beijing, H37Rv y Uganda I con 1 aislado cada una (Figura 8).

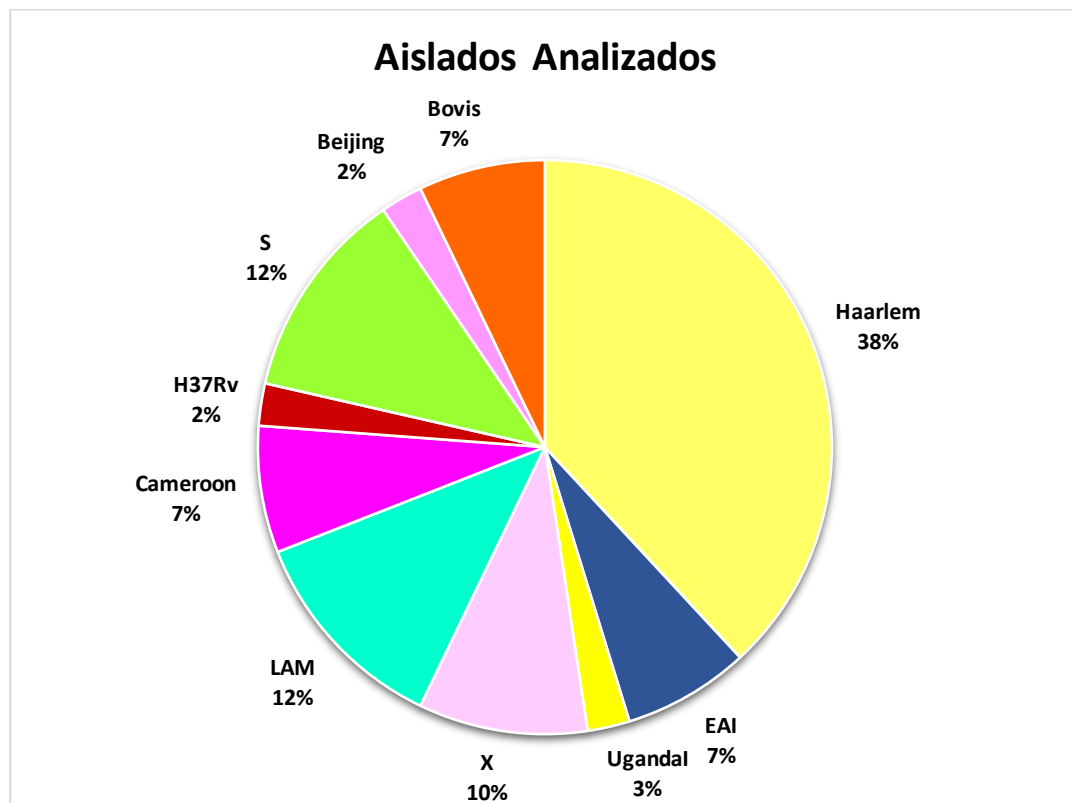


Figura 8. Porcentajes de familias encontradas por MIRU-VNTR en los aislados de estudio.

En México son pocos los estudios que emplean la herramienta MIRU-VNTR para la genotipificación de cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de muestras

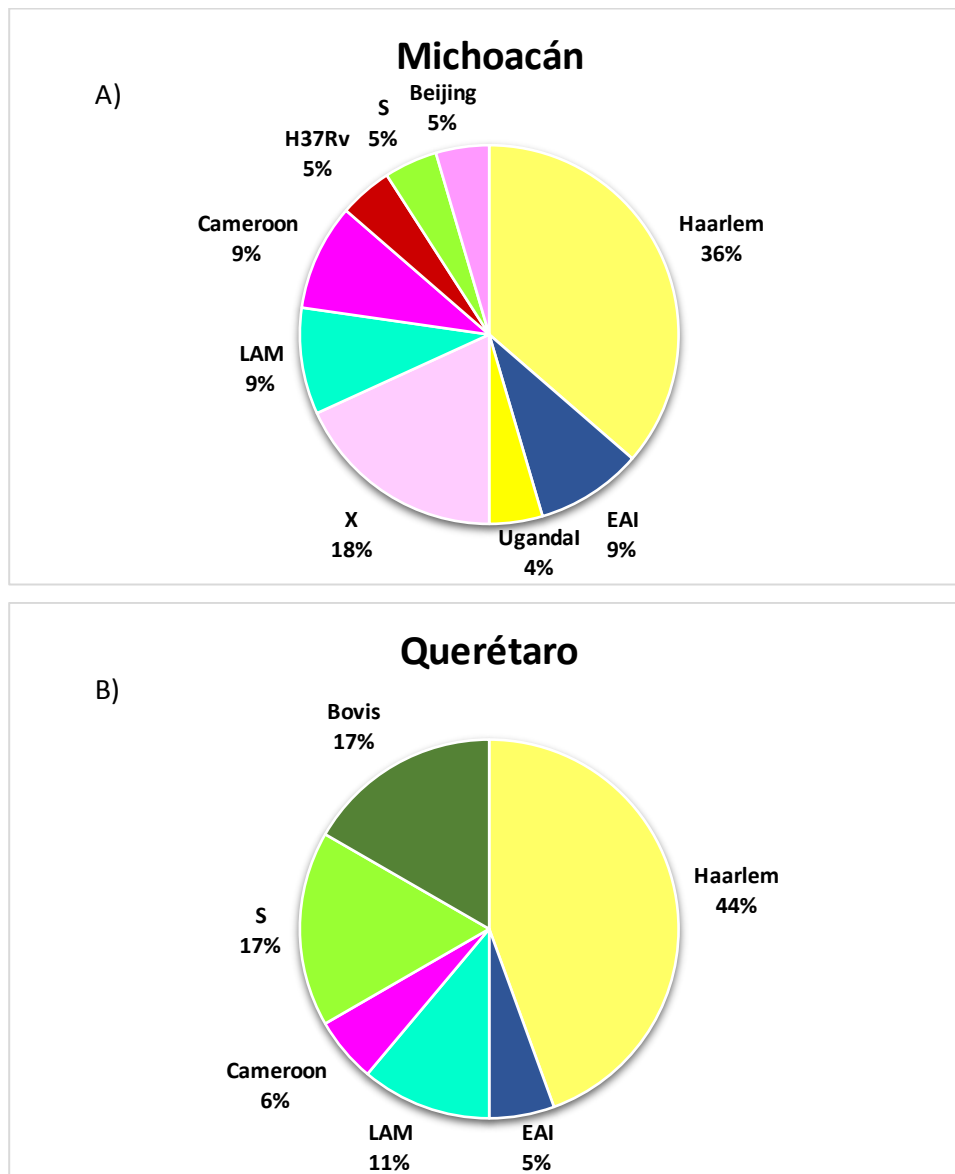
clínicas de humanos. Además, la mayoría de reportes en los que se incluye dicho análisis utilizan el set de 12 *loci*, sin reportar ni analizar las familias encontradas. El único estudio con dicha técnica para el país que permite comparar nuestros datos es el de Flores-Lopez *et al.* (2016) realizado en Baja California, en el cual se encontró como familias principales a LAM (19.3%) y Haarlem (14.3%). En menor proporción se encontró la presencia de las familias S (13%), Cameroon (5.7%), Uganda I (5%), Beijing (4.3%), EAI (2.1%) y Ghana (0.7%). Aunque se presenta una diferencia en el orden de abundancia, esto concuerda con el hecho de que en el presente trabajo la familia más representada resultó ser Haarlem seguida de LAM, además se comparte la mayoría de familias encontradas en ambos casos, incluyendo a Haarlem, LAM, S, Cameroon, Uganda I, Beijing y EAI. Esto sugiere que la tendencia cualitativa y cuantitativa de familias del MTBC es común a lo largo del país (Flores-Lopez *et al.* 2016).

Al comparar los resultados aquí obtenidos con los reportados para otros países del continente Americano, se encuentra que en el caso de Perú las familias principales encontradas en cepas obtenidas de muestras clínicas son la Haarlem (47%), seguida por LAM (29%) y Beijing (22%), con X (1.5%), S (0.5%) y Ghana (0.16%) en menor proporción (Barletta *et al.* 2015). Así, Haarlem y LAM parecen ser las familias que mayor prevalencia tienen desde México hasta Sudamérica, un fenómeno epidemiológico que debe de ser evaluado con mayor detalle para identificar las causas asociadas a esto.

## **IX.5 Comparación de familias por entidades y análisis filogenético**

Para comparar las abundancias de familias del MTBC identificadas por MIRU-VNTR por estado se calcularon los porcentajes por separado para cada entidad. Estos resultados se pueden observar en la Figura 9. Los resultados de este análisis mostraron diferencias cualitativas y cuantitativas en las familias del complejo *M. tuberculosis* entre los estados analizados. Para Michoacán (36%) y Querétaro (44%) la familia predominante fue Haarlem, pero la segunda familia en abundancia fue diferente, ya que para Michoacán fue X (18%) y en el caso de

Querétaro fueron en la misma proporción Bovis y S (17%). Entre las familias que fueron únicas por estado, se identificó a X, Uganda I, Beijing y H37Rv para Michoacán, y Bovis para Querétaro. Por último, las familias que se compartieron entre ambas entidades fueron Haarlem, LAM, S y EAI. En Querétaro se encontró un menor número de familias, lo que como ya se comentó, puede deberse a la diferencia en el tamaño de la muestra, ya que para Michoacán se incluyeron 24 aislados y para Querétaro 19.



**Figura 9.** Porcentajes de familias identificadas por MIRU-VNTR en Michoacán y Querétaro. Familias identificadas por MIRU-VNTR para Michoacán panel A, para Querétaro panel B.

En el caso de Michoacán se contaba con datos previos en los que se tipificaron aislados de los años 2010-2014 (Guillén-Nepita, 2014; Vazquez-Heredia, 2014; datos no publicados). En dicho análisis previo se reporta la presencia de aislados de las familias de MTBC que se encontraron en el presente trabajo, identificándose en el trabajo actual un menor número de familias (Figura 10), atribuible al menor número de cepas aquí analizadas. Al comparar los resultados de ambos grupos de cepas, la familia mayoritaria sigue siendo la Haarlem. Sin embargo, la segunda familia en orden de abundancia difiere, ya que en las descripciones previas es la LAM y en el presente trabajo es la X. Las familias previamente encontradas que no se presentaron en este estudio son NEW-1, Uganda II y Ghana. Esta variación en la frecuencia de las familias presentes en aislados de distintos años muestra la relevancia de realizar una vigilancia epidemiológica de la tuberculosis que sea sostenida en el espacio y en el tiempo. Diferencias en características clínico-epidemiológicas como la susceptibilidad a antibióticos, virulencia y capacidad de dispersión, entre cepas pertenecientes a distintas familias y genotipos (ver más adelante), implica que las estrategias de prevención, contención y tratamiento tampoco deben estar evaluándose continuamente con la finalidad de ser eficaces. Así, los estudios de genotipificación como los realizados en el presente trabajo constituyen herramientas para una orientación adecuada de políticas de salud pública, identificando variantes endémicas, asociadas a brotes o a fallos en el tratamiento. En otras entidades del país se han realizado estudios de diversidad del MTBC con MIRU-VNTR cuyos resultados muestran diferencias en relación a la proporción de familias reportadas (Cuadro 6).

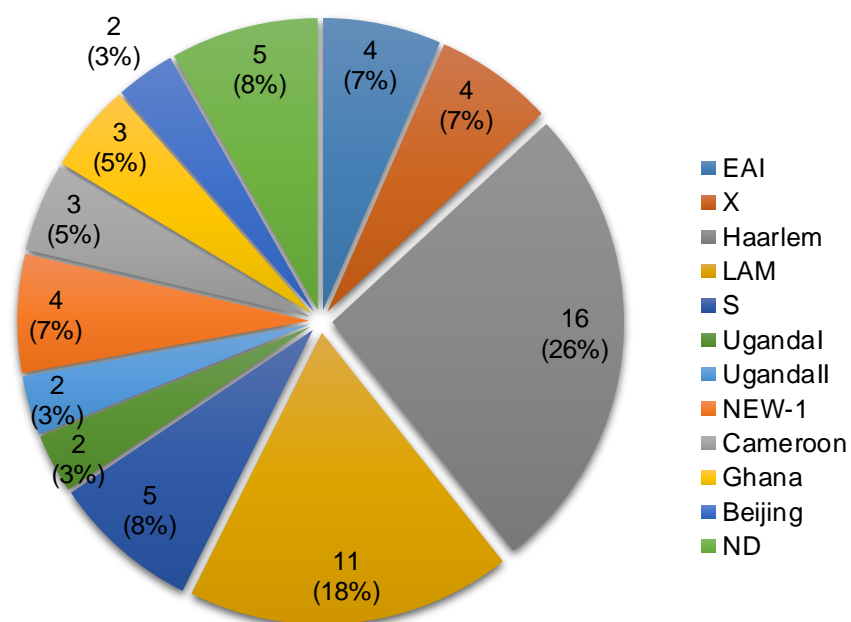


Figura 10. Frecuencia de familias reportadas previamente para Michoacán. Número y porcentaje, entre paréntesis, de aislados asignado a cada familia por medio la técnica MIRU-VNTR.

	Michoacán	Querétaro	Veracruz	Baja California
Haarlem	36%	44%	8%	14%
X	18%	-	-	-
LAM	9%	11%	11%	19%
EAI	9%	5%	9%	2%
Cameroon	9%	6%	-	6%
Beijing	5%	-	-	4%
S	5%	17%	4%	14%
Uganda I	4%	-	-	5%
H37RV	5%	-	-	-
Ghana	-	-	1%	1%
Bovis	-	17%	-	-
Canetti	-	-	1%	-
TUR	-	-	2%	-

En la comparación por estudios con tipificación mediante MIRU-VNTR se observaron diferencias en la presencia de familias entre las entidades estudiadas. Por ejemplo, únicamente en Michoacán se reporta la familia X y H37Rv, mientras

que para Querétaro la familia Bovis y para Veracruz las familias *M. canetti* y TUR, también resultaron exclusivas de dichas entidades. Los porcentajes de cada familia entre Estados también muestran variaciones importantes, quizá en parte asociadas al hecho de que para Veracruz y Baja California se reportaron gran cantidad de aislados como huérfanos (Almaraz-Velasco *et al.* 2017; Flores-Lopez *et al.* 2016). La presencia de la familia X como exclusiva de Michoacán puede sugerir una ruta de ingreso y dispersión particular para el estado, algo que solo estudios posteriores en México y aquí permitirá ir elucidando.

El análisis con MIRU-VNTR permitió además la confirmación de su pertenencia a la especie *M. bovis* para los aislados MYC104, MYC110 y MYC114, de los cuales no se obtuvieron resultados por Spoligotyping. En el caso de Querétaro este genotipo ya había sido reportado previamente causando TB en humanos, correspondiendo a un 14% de la muestra analizada (Pérez-Guerrero *et al.* 2008), porcentaje cercano al 17% dentro de la muestra aquí analizada. Los estudios previos y los resultados del presente trabajo indican claramente que el ganado bovino es un reservorio importante y fuente de contagio de *M. bovis* hacia el humano para dicho Estado, y que hay cadenas de contagio independientes con dicha especie, ya que los aislados analizados mostraron distinto patrón de MIRU-VNTR. Alternativamente, *M. bovis* puede estar variando muy rápido en el Estado de Querétaro, y a partir de una misma fuente de contagio se generan variantes genéticas asociadas al hospedero. En un estudio realizado en México donde se tipificaron 6 aislados de *M. bovis* de casos clínicos en humanos y 48 aislados provenientes de ganado, se encontró que en particular 2 aislados asociados a humano, uno de Chiapas y otro Yucatán, presentaban una gran similitud tanto por Espoligotipo como por MIRU-VNTR, llegando a formar inclusive un clado propio dentro de los análisis filogenéticos de dicho estudio, que si bien no confirma una relación epidemiológica, la diversificación puede estar ocurriendo (Vázquez-Chacón *et al.* 2015). Para el caso de Michoacán los aislados MYC070 y MYC071 que habían presentado patrones no reportados por el panel de tipificación del MTBC se identificaron como EAI, mientras que para los aislados MYC080 y MYC086, que habían presentado la eliminación RD<sup>Rio</sup> se confirmó su pertenencia

a la familia LAM de acuerdo a lo reportado para dicho genotipo (Lazzarini *et al.* 2007). Dichos datos confirman la hipótesis de la presencia de esta familia en el estado de Michoacán y constituyen la primera evidencia de la presencia del genotipo RD<sup>Río</sup> en el país.

Es importante destacar la relevancia clínico- epidemiológica de la presencia de ciertas familias y genotipos en los Estados analizados. Por ejemplo, en el caso de la familia Beijing se ha descrito su facilidad para la adquisición de mutaciones relacionadas con la resistencia a antibióticos (Merker *et al.* 2015), así como una alta propensión al desarrollo de la enfermedad una vez establecida la infección, por lo que es de mayor riesgo en salud pública que otras familias (Nahid *et al.* 2010). En el caso de la familia Haarlem se ha demostrado que tiene una gran capacidad de dispersión y una alta tasa de resistencia a estreptomocina, uno de los antibióticos de primera línea utilizados en el tratamiento de la TB (Yimer *et al.* 2016). Así mismo, en la familia LAM se ha encontrado una mayor tasa de replicación del bacilo en cultivo, lo que está ligado a un metabolismo más activo, y también se ha registrado que las muestras clínicas de pacientes infectados con esta familia presentaron una mayor carga de bacilos, lo que promueve la mayor facilidad de dispersión de este genotipo (Von Groll *et al.* 2010). Por su parte *M. bovis* se sabe posee diferencias en el gen *pncA* que le confiere una resistencia intrínseca a pirazinamida, uno de los fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la TB, por lo que es de interés el reconocimiento de esta especie para ser considerado en el tratamiento del paciente (Vázquez-Chacón *et al.* 2015).

Se pueden observar inconsistencias importantes en los resultados obtenidos entre la tipificación de los aislados por spoligotyping y MIRU-VNTR. En la familia X que resultó la mayoritaria por spoligotyping se identificaron 9 aislados como Haarlem y uno como X, mientras que en la familia T1, que no tiene familia homóloga en MIRU-VNTR 4 aislados fueron asignados a la familia S, 3 a Haarlem y uno a Cameroon. En la Cuadro 6 se muestran todas las inconsistencias encontradas entre familias por Spoligotyping y por MIRU-VNTR, entre paréntesis se encuentra el número de aislados para cada familia. Por otra parte, también se encontró una correlación perfecta en la asignación de cepas a las otras familias

minoritarias, tal fue el caso de EAI5, Beijing-LIKE, LAM9, H y X2 de que mostraron total relación con las familias obtenidas por MIRU-VNTR.

**Cuadro 7. Inconsistencias de familias obtenidas por Spoligotyping vs. familias por MIRU-VNTR.**

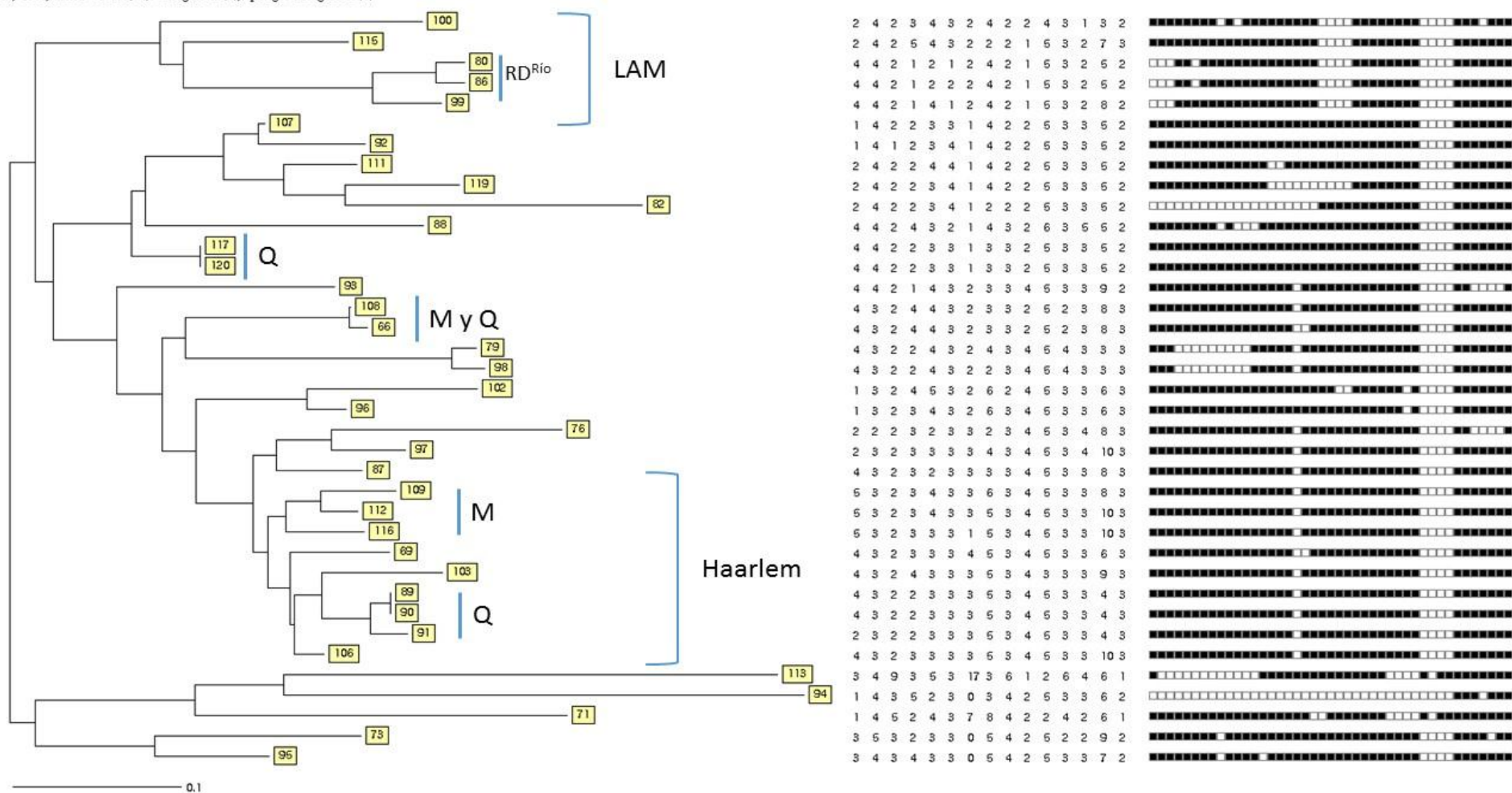
	Familias por Spoligotyping				
	T1	X1	X3	T5-RUS1	Orphan
<b>Familias por MIRU-VNTR</b>	(4) S (3) Haarlem (1) Cameroon	(9) Haarlem (1) X	(1) Haarlem	(1) Cameroon	(3) LAM (1) S (1) Uganda I (1) H37Rv

Cuadro que muestra las inconsistencias encontradas en la tipificación por espoligotipo frente a las encontradas por MIRU-VNTR, dentro de cada recuadro se enlistan las familias por MIRU-VNTR dentro de cada familia de espoligotipo.

Para reconocer la cercanía de los aislados analizados en ambas entidades, se realizó un árbol filogenético en el que se incluyeron los resultados obtenidos con ambos marcadores moleculares (Figura 11). En dendrograma obtenido el clado que mostró la mejor agrupación fue el de la familia Haarlem, en el que la gran mayoría se agruparon formando dos subgrupos que contienen cada uno a los aislados de Michoacán (MYC089, MYC090 y MYC091) y de Querétaro (MYC109, MYC112 y MYC116). Esto muestra claramente individuos genéticos únicos de cada entidad, lo que puede indicar cadenas de transmisión independientes en cada Estado, asociadas a dicha familia. Nuevamente, de forma alternativa puede sugerir que si provienen de la misma fuente de contagio, los procesos de diversificación de la familia Haarlem dentro de cada entidad son distintos. En el caso de los aislados MYC080 y MYC086 que presentaron la eliminación RD<sup>Rio</sup>, estos salen agrupados junto con el resto de miembros de la familia LAM de acuerdo a lo esperado, en un grupo altamente robusto que muestra claramente la identidad de todos sus miembros.



NJ-Tree, MIRU-VNTR (15): Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)



**Figura 11. Árbol filogenético de los aislados del MTBC analizados.** En esta figura se muestra un árbol filogenético que incluye a todos los aislados analizados en el estudio que se tipificaron por Spoligotyping y MIRU-VNTR. Se muestran con corchete los clados que pertenecieron a la misma familia. Cada aislado muestra su número asignado dentro de la colección. Los aislados de Michoacán presentan las numeraciones menores al cien, mientras que los del estado de Querétaro mayor al número cien. El patrón de agrupamiento se generó mediante el criterio *Neighbor Joining* empleando la herramienta *calculate phylogenetic tree* del sitio [miru-vntrplus.org](http://miru-vntrplus.org). A la derecha del dendrograma se indica el número de copias de cada *locus* MIRU-VNTR en el siguiente orden: Mtub04, ETRC, MIRU4, MIRU40, MIRU10, 3 MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU34, Mtub39, QUB26 y QUB4156. A la extrema derecha se muestra el patrón de espoligotipo. M, estados provenientes de Michoacán; Q, aislados de Querétaro. RD<sup>Río</sup> para los aislados que presentaron dicha eliminación.



Los aislados MYC066 y MYC108 mostraron exactamente el mismo patrón de MIRU-VNTR, presentando una única diferencia en un espaciador de espoligotipo. El agrupamiento de dichos aislados en el dendrograma generado es interesante ya que provienen de cada uno de los Estados analizados, lo que a diferencia de los otros grupos genéticos previamente comentados, podría estar indicando la misma cadena de transmisión entre ambas entidades. En otros casos se presentaron agrupamientos de aislados de diferentes entidades, como los aislados MYC082 y MYC119, pero ambos pertenecen a la familia Cameroon, lo que explica la cercanía.

La realización de este tipo de trabajos permite la comparación con mayor seguridad y la identificación de aislados compartidos entre áreas geográficas, cadenas de transmisión o similitudes de cada una de las regiones que se analizan.

## X. CONCLUSIONES

Los resultados permiten aceptar la hipótesis planteada.

Aun siendo pequeña la cantidad de aislados analizada, los resultados obtenidos muestran que los estados de Michoacán y Querétaro presentan diferencias epidemiológicas importantes. En el estado de Querétaro se presentan aislados de *M. bovis*, destacando que es una problemática en dicho estado, mientras que esta especie no se encontró en los pacientes con TB de Michoacán. En éste último caso se encontraron genotipos RD<sup>Río</sup> no presentes en el primer estado.

En la genotipificación por Spoligotyping se determinó que las dos familias más abundantes para ambos estados correspondieron, pero se pueden observar familias específicas para cada una de las regiones, demostrando así la diferencia en las poblaciones analizadas.

En el análisis de genotipificación mediante MIRU-VNTR se demostró que ambas entidades comparten los genotipos mayoritarios, pero también se observan genotipos particulares de cada entidad, dando soporte a la hipótesis planteada.

La comparación filogenética de los aislados del estudio permitió detectar la presencia de un mismo patrón MIRU-VNTR en aislados de diferente estado, abriendo la posibilidad de un intercambio de genotipos entre ambas entidades, además se puede observar que dichos aislados sólo difieren en un espaciador de Spoligotyping, reforzando así la relación genética de ambos aislados. También se pueden identificar agrupaciones de aislados pertenecientes a un mismo estado dentro de cada una de las familias, lo que puede indicar la adaptación y diversificación de aislados de manera independiente en cada entidad.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Albanna, Amr S., Michael B. Reed, Kimberley V. Kotar, Ashley Fallow, Fiona A. McIntosh, Marcel A. Behr, and Dick Menzies. 2011. "Reduced Transmissibility of East African Indian Strains of *Mycobacterium tuberculosis*." *PLoS ONE* 6 (9). doi:10.1371/journal.pone.0025075.
- Alland, David, David W. Lacher, Manzour Hernando Hazbón, Alifiya S. Motiwala, Weihong Qi, Robert D. Fleischmann, and Thomas S. Whittam. 2007. "Role of Large Sequence Polymorphisms (LSPs) in Generating Genomic Diversity among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the Utility of LSPs in Phylogenetic Analysis." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (1): 39–46. doi:10.1128/JCM.02483-05.
- Allix-Béguec, Caroline, Dag Harmsen, Thomas Weniger, Philip Supply, and Stefan Niemann. 2008. "Evaluation and Strategy for Use of MIRU-VNTRplus, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping Data and Phylogenetic Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates." *Journal of Clinical Microbiology* 46 (8): 2692–99. doi:10.1128/JCM.00540-08.
- Almaraz-Velasco, Raquel, Daniela Munro-Rojas, Javier Fuentes-Domínguez, Raquel Muñiz-Salazar, María Angélica Ibarra-Estela, Alma Delia Guevara-Méndez, Rosalcela Chaparro-Martinez, Monserrat Perez-Navarro, and Roberto Zenteno-Cuevas. 2017. "A First Insight into the Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Veracruz, Mexico." *The International Journal of Mycobacteriology* 6 (1): 14. doi:10.4103/2212-5531.201886.
- Asante-Poku, Adwoa, Isaac Darko Otchere, Stephen Osei-Wusu, Esther Sarpong, Akosua Baddoo, Audrey Forson, Clement Laryea, et al. 2016. "Molecular Epidemiology of *Mycobacterium africanum* in Ghana." *BMC Infectious Diseases* 16 (1). BMC Infectious Diseases: 385. doi:10.1186/s12879-016-1725-6.
- Azevedo, Tonya, Joilda Silva, Neio Boechat, Susan Martins, Vera Simonsen, Martha Oliveira, Maria Gabriela, et al. 2017. "A Systematic Review of East African-Indian Family of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil." *Journal of Infectious Diseases* 21 (3): 1–8. doi:10.1016/j.bjid.2017.01.005.
- Barletta, Francesca, Larissa Otero, Bouke C. De Jong, Tomotada Iwamoto, Kentaro Arikawa, Patrick Van Der Stuyft, Stefan Niemann, et al. 2015. "Predominant *Mycobacterium tuberculosis* Families and High Rates of Recent Transmission among New Cases Are Not Associated with Primary Multidrug Resistance in Lima, Peru." *Journal of Clinical Microbiology* 53 (6): 1854–63. doi:10.1128/JCM.03585-14.
- Bocanegra-García, Virgilio, Elvira Garza-Gonzalez, Wendy Lizeth Cruz-Pulido, Yahaira Lizeth Guevara-Molina, and Gloria M Gonzalez. 2014. "Molecular Assessment , Drug-Resistant

- Profile , and Spacer Oligonucleotide Typing ( Spoligotyping ) of *Mycobacterium tuberculosis* Strains From Tamaulipas , M Exico.” *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 103 (September 2012): 97–103. doi:10.1002/jcla.21650.
- Boritsch, E V A C, and Roland Brosch. 2016. “Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: New Insights into Pathogenicity and Drug Resistance.” *Microbiology Spectrum* 4 (5): 1–20. doi:10.1128/microbiolspec.TB2-0020-2016.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, et al. 2002. “A New Evolutionary Scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (6): 3684–89. doi:10.1073/pnas.052548299.
- Brudey, Karine, Jeffrey R Driscoll, Leen Rigouts, Wolfgang M Proding, Andrea Gori, Sahal A Al-hajoj, Caroline Allix, et al. 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. doi:10.1186/1471-2180-6-23.
- Coll, Francesc, Ruth McNerney, José Afonso Guerra-Assunção, Judith R Glynn, João Perdigão, Miguel Viveiros, Isabel Portugal, Arnab Pain, Nigel Martin, and Taane G Clark. 2014. “A Robust SNP Barcode for Typing *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains.” *Nature Communications* 5: 4812. doi:10.1038/ncomms5812.
- Comas, Iñaki, Susanne Homolka, Stefan Niemann, and Sebastien Gagneux. 2009. “Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies.” *PLoS One* 4 (11): e7815. doi:10.1371/journal.pone.0007815.
- Coscolla, Mireia, Astrid Lewin, Sonja Metzger, Kerstin Maetz-rennsing, Sébastien Calvignac-spencer, Andreas Nitsche, Pjotr Wojtek Dabrowski, et al. 2013. “Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolate from a Wild Chimpanzee” 19 (6): 969–76.
- Dale, J W, D Brittain, A A Cataldi, D Cousins, J T Crawford, J Driscoll, H Heersma, et al. 2001. “Spacer Oligonucleotide Typing of Bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Recommendations for Standardised Nomenclature.” *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.
- de Jong, Bouke C., Martin Antonio, and Sebastien Gagneux. 2010. “*Mycobacterium Africanum*- Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (9). doi:10.1371/journal.pntd.0000744.
- Filliol, Ingrid, As Motiwala, and Magali Cavatore. 2006. “Global Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis: Insights into Tuberculosis Evolution, Phylogenetic Accuracy.” *Journal of ...* 188 (2): 759–72. doi:10.1128/JB.188.2.759.

- Firdessa, Rebuma, Stefan Berg, Elena Hailu, Esther Schelling, Balako Gumi, Girume Erenso, Endalamaw Gadisa, et al. 2013. "Mycobacterial Lineages Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis, Ethiopia." *Emerging Infectious Diseases* 19 (3): 460–63. doi:10.3201/eid1903.120256.
- Flores-Lopez, Carlos A., Roberto Zenteno-Cuevas, Rafael Laniado-Laboron, Yann Reynaud, Rosa Alejandra Garcia-Ortiz, Jorge A. Gonzalez-Y-Merchand, Sandra Rivera, et al. 2016. "Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Baja California, Mexico: A Result of Human Migration?" *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.meegid.2016.07.001.
- Flores-Treviño, Samantha, Soraya Mendoza-Olazarán, and Elvira Garza-González. 2014. "Drug Resistance and Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico: A Systematic Review." *Salud Publica de Mexico* 56 (1): 63–77.
- Gagneux, Sebastien, Kathryn DeRiemer, Tran Van, Midori Kato-Maeda, Bouke C de Jong, Sujatha Narayanan, Mark Nicol, et al. 2006. "Variable Host-Pathogen Compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2869–73. doi:10.1073/pnas.0511240103.
- Gallivan, Mark, Neha Shah, and Jennifer Flood. 2015. "Epidemiology of Human *Mycobacterium Bovis* Disease, California, USA, 2003-2011." *Emerging Infectious Diseases* 21 (3): 2003–11.
- Guillen-Nepita, Ana Laura, Gerardo Vazquez-Marrufo, Frank T. Blanco-Guillot, Gloria Alicia Figueroa-Aguilar, and Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas. 2013. "RAPD Discloses High Molecular Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Michoacán, Mexico." *New Microbiologica*. 36: 413–18.
- Guillén-Nepita AL. Epidemiología de la Tuberculosis Humana y Tipificación Genético Molecular del Agente Causal en el Estado de Michoacán (Tesis doctoral). Morelia, Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 2014.
- Gutacker, Michaela M, James C Smoot, Cristi A Lux Migliaccio, Stacy M Ricklefs, Su Hua, Debby V Cousins, Edward A Graviss, Elena Shashkina, Barry N Kreiswirth, and James M Musser. 2002. "Genome-Wide Analysis of Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms: Resolution of Genetic Relationships Among Closely Related Microbial Strains." *Genetics* 1543 (December): 1533–43.
- Hershberg, Ruth, Mikhail Lipatov, Peter M Small, Hadar Sheffer, Stefan Niemann, Susanne Homolka, Jared C Roach, et al. 2008. "High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography." *PLoS Biology* 6 (12): e311. doi:10.1371/journal.pbio.0060311.
- Homolka, Susanne, Michaela Projahn, Silke Feuerriegel, Tanja Ubben, Roland Diel, Ulrich Nübel, and Stefan Niemann. 2012. "High Resolution Discrimination of Clinical *Mycobacterium*

- tuberculosis* Complex Strains Based on Single Nucleotide Polymorphisms.” *PLoS Medicine* 7 (7). doi:10.1371/journal.pone.0039855.
- Huard, Richard C., Michel Fabre, Petra De Haas, Luiz Claudio Oliveira Lazzarini, Dick Van Soolingen, Debby Cousins, and John L. Ho. 2006. “Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex.” *Journal of Bacteriology* 188 (12): 4271–87. doi:10.1128/JB.01783-05.
- Huard, Richard C, Luiz Claudio, De Oliveira Lazzarini, W Ray Butler, Dick Van Soolingen, and John L Ho. 2003. “PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the.” *Society* 41 (4): 1637–50. doi:10.1128/JCM.41.4.1637.
- Ismail, Fazli, David Couvin, Izzah Farakhin, and Zaidah Abdul Rahman. 2014. “Study of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genotypic Diversity in Malaysia Reveals a Predominance of Ancestral East- African-Indian Lineage with a Malaysia- Specific Signature.” *Plos One* 9 (12): 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0114832.
- Kamerbeek, Judith, L E O Schouls, Arend Kolk, Sjoukje Kuijper, Annelies Bunschoten, Henri Molhuizen, Rory Shaw, and Madhu Goyal. 1997. “Simultaneous Detection and Strain Differentiation of.” *Microbiology* 35 (4): 907–14.
- Kato-Maeda, Midori, S. Gagneux, L. L. Flores, E. Y. Kim, P. M. Small, E. P. Desmond, and P. C. Hopewell. 2011. “Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis*: Congruence between Large Sequence Polymorphisms and Spoligotypes.” *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 15 (1): 131–33.
- Katoch, V.M. 2004. “Infections due to Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM).” *Pharmacological Research* 61: 101–101. doi:10.1016/j.phrs.2009.12.004.
- Klopper, Marisa, Robin Mark Warren, Cindy Hayes, Nicolaas Claudius Gey van Pittius, Elizabeth Maria Streicher, Borna Müller, Frederick Adriaan Sirgel, et al. 2013. “Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa.” *Emerging Infectious Diseases* 19 (3): 449–55. doi:10.3201/eid1903.120246.
- Lazzarini, Luiz Claudio Oliveira, Richard C. Huard, Neio L. Boechat, Harrison M. Gomes, Maranibia C. Oelemann, Natalia Kurepina, Elena Shashkina, et al. 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. doi:10.1128/JCM.01394-07.
- Macías-Parra, Mercedes, Jesús Kumate Rodríguez, José Luís Arredondo García, Yolanda López-Vidal, Mauricio Castañón-Arreola, Susana Balandrano, Nalin Rastogi, and Pedro Gutiérrez-Castrellón. 2011. “*Mycobacterium tuberculosis* Complex Genotype Diversity and Drug Resistance Profiles in a Pediatric Population in Mexico.” *Tuberculosis Research and Treatment* 2011: 1–9. doi:10.1155/2011/239042.
- Majoer, Christof J, Cecile Magis-escurra, Jakko Van Ingen, Martin J Boeree, and Dick Van Soolingen. 2011. “Epidemiology of *Mycobacterium Bovis* Disease in Humans, the



- Netherlands, 1993-2007.” *Emerging Infectious Diseases* 17 (3). doi:10.3201/eid1703.101111.
- Martinez-Guarneros, Armando, Nalin Rastogi, David Couvin, Alejandro Escobar-gutierrez, Livia Maria, Gonçalves Rossi, Carlos A Vazquez-chacon, et al. 2013. “Infection, Genetics and Evolution Genetic Diversity among Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Mexico.” *Infection, Genetics and Evolution* 14: 434–43. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.024.
- Mathema, Barun, Natalia E Kurepina, Pablo J Bifani, and Barry N Kreiswirth. 2006. “Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights.” *Clinical Microbiology Reviews*. doi:10.1128/CMR.00061-05.
- Merker, Matthias, Camille Blin, Stefano Mona, Nicolas Duforet-Frebourg, Sophie Lecher, Eve Willery, Michael G B Blum, et al. 2015. “Evolutionary History and Global Spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Lineage.” *Nature Genetics* 47: 242–49. doi:10.1038/ng.3195.
- Molina-Torres, Carmen A, Elisa Moreno-Torres, Jorge Ocampo-Candiani, Adrian Rendon, Kym Blackwood, Kristin Kremer, Nalin Rastogi, Oliverio Welsh, and Lucio Vera-cabrera. 2010. “*Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes in Monterrey , Mexico □.” *Journal of Clinical Microbiology* 48 (2): 448–55. doi:10.1128/JCM.01894-09.
- Nahid, Payam, Erin E. Bliven, Elizabeth Y. Kim, William R. Mac Kenzie, Jason E. Stout, Lois Diem, John L. Johnson, Sebastien Gagneux, Philip C. Hopewell, and Midori Kato-Maeda. 2010. “Influence of M. Tuberculosis Lineage Variability within a Clinical Trial for Pulmonary Tuberculosis.” *PLoS ONE* 5 (5): 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0010753.
- O ’garra, Anne, Paul S Redford, Finlay W Mcnab, Chloe I Bloom, Robert J Wilkinson, and Matthew P R Berry. 2013. “The Immune Response in Tuberculosis.” *Annu. Rev. Immunol* 4 (31): 475527. doi:10.1146/annurevimmunol032712095939.
- Pai, Madhukar, Marcel A. Behr, David Dowdy, Keertan Dheda, Maziar Divangahi, Catharina C. Boehme, Ann Ginsberg, et al. 2016. “Tuberculosis.” *Nature Reviews Disease Primers* 2: 16076. doi:10.1038/nrdp.2016.76.
- Palomino, Juan Carlos Cardoso Leao, Sylvia, and Viviana. Ritaco. 2007. *Tuberculosis 2007: From Basic Science To Patient Care*. Edited by Viviana. Palomino, Juan Carlos; Cardoso Leao, Sylvia; Ritaco. *Tuberculosis 2007: From Basic Science To Patient Care*. Primera. Sao Paulo. [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com).
- Perea Razo, C. A., Milian Suazo, F., Reyes, I. B., Gallegos, S. S., Rodriguez Hernandez, E., Villalva, S. F., & Canto Alarcon, G. J. (2017). Whole Genome Sequencing for Detection of Zoonotic Tuberculosis in Queretaro, Mexico. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, 5(2). <http://doi.org/10.4172/2329-8731.1000158>
- Pérez-Guerrero, Laura, Feliciano Milán-Suazo, Camila Arriaga-Díaz, Cecilia Romero-Torres, and Minerva Escartín-Chávez. 2008. “Epidemiología Molecular de Las Tuberculosis Bovina Y

- Humana En Una Zona Endémica de Querétaro, México.” *Salud Pública de México* 50 (4): 2–7.
- Ramaswamy, Srinivas V, Shu-jun Dou, Adrian Rendon, Zhenhua Yang, M Donald Cave, and Edward A Graviss. 2004. “Genotypic Analysis of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Monterrey, Mexico.” *Journal of Medical Microbiology* 53 (Pt 2): 107–13. doi:10.1099/jmm.0.05343-0.
- Reynaud, Yann, Julie Millet, and Nalin Rastogi. 2015. “Genetic Structuration, Demography and Evolutionary History of *Mycobacterium tuberculosis* LAM9 Sublineage in the Americas as Two Distinct Subpopulations Revealed by Bayesian Analyses.” *PLoS ONE* 10 (10): 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0140911.
- Rindi, Laura, Nicoletta Lari, and Carlo Garzelli. 2012. “Large Sequence Polymorphisms of the Euro-American Lineage of *Mycobacterium tuberculosis*: A Phylogenetic Reconstruction and Evidence for Convergent Evolution in the DR Locus.” *Infection, Genetics and Evolution* 12 (7). Elsevier B.V.: 1551–57. doi:10.1016/j.meegid.2012.06.008.
- Rubio-Lozano, M. S., Braña-Varela, D., R.D., M.-M., & Delgado-Suárez, E. (2013). *Sistemas de Producción y Calidad de carne bovina*.
- Sakamoto, K. 2012. “The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection.” *Veterinary Pathology* 49 (3): 423–39. doi:10.1177/0300985811429313.
- Soilingen, Dick Van, Petra E W D E Haas, Peter W M Hermans, Peter M A Groenen, and J A N D A V A N Embdenl. 1995. “Comparison of Various Repetitive DNA Elements as Genetic Markers for Strain Differentiation and Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*” 31 (8): 1987–95.
- Sun, Zhaogang, Weimin Li, Shaofa Xu, and Hairong Huang. 2015. “The Discovery, Function and Development of the Variable Number Tandem Repeats in Different *Mycobacterium* Species.” *Critical Reviews in Microbiology* 0 (JUNE). Informa Healthcare USA, Inc: In Press. doi:10.3109/1040841X.2015.1022506.
- Supply, Philip, Caroline Allix, Sarah Lesjean, Mara Cardoso-Oelemann, Sabine Rüsche-Gerdes, Eve Willery, Evgueni Savine, et al. 2006. “Proposal for Standardization of Optimized *Mycobacterium tuberculosis* Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*.” *Journal of Clinical Microbiology* 44 (12): 4498–4510. doi:10.1128/JCM.01392-06.
- Thwaites, Guy, Maxine Caws, Tran Thi Hong Chau, Anthony D’Sa, Nguyen Thi Ngoc Lan, Mai Nguyet Thu Huyen, Sebastien Gagneux, et al. 2008. “Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* Genotype and the Clinical Phenotype of Pulmonary and Meningeal Tuberculosis.” *Journal of Clinical Microbiology* 46 (4): 1363–68. doi:10.1128/JCM.02180-07.
- Vallejo, Patricio, Juan Carlos Rodriguez D., Andrea Searle M, and Victoriano Fraga C. 2015. “Ensayo Xpert MTB / RIF En El Diagnóstico de Tuberculosis.” *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias* 31: 127–31.

- van Embden, J A N D. A., M Donald Cave, Jack T Crawford, Jeremy W Dale, Kathleen D Eisenach, Brigiyre Gicquel, Peter Hermans, et al. 1993. "Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology." *Journal of Clinical Microbiology* 31 (2): 406–9.
- Van Soolingen, D., P. W M Hermans, P. E W De Haas, D. R. Soll, and J. D A Van Embden. 1991. "Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis." *Journal of Clinical Microbiology* 29 (11): 2578–86.
- Vazquez-Chacon, Carlos A., Armando Martinez-Guarneros, David Couvin, Jorge A. Gonzalez-Y-Merchand, Sandra Rivera-Gutierrez, Alejandro Escobar-Gutierrez, Juan J. De-La-Cruz Lopez, et al. 2015. "Human Multidrug-Resistant *Mycobacterium Bovis* Infection in Mexico." *Tuberculosis* 95 (6): 802–9. doi:10.1016/j.tube.2015.07.010.
- Vázquez-Heredia, MR. Tipificación Genético-Molecular de Micobacterias Aisladas de Pacientes con Tuberculosis en el Periodo 2011-2014 (Tesis de Licenciatura). Morelia, Michoacán. UMSNH.2014.
- Vázquez-Marrufo, G, D Marín-Hernández, M G Zavala-Páramo, G Vázquez-Narvaez, C Alvarez-Aguilar, and M S Vázquez-Garcidueñas. 2008. "Genetic Diversity among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Mexican Patients." *Canadian Journal of Microbiology* 54 (8): 610–18. doi:10.1139/w08-051.
- Von Groll, Andrea, Anandi Martin, Carolina Felix, Pedro Fernandes Sanmartin Prata, Günther Honscha, Françoise Portaels, Peter Vandame, Pedro Eduardo Almeida da Silva, and Juan Carlos Palomino. 2010. "Fitness Study of the RD Rio Lineage and Latin the City of Rio Grande , Brazil IMMUNOLOGY & MEDICAL MICROBIOLOGY." *Immunology and Medical Microbiology* 58: 119–27. doi:10.1111/j.1574-695X.2009.00611.x.
- Warner, Digby F, Anastasia Koch, and Valerie Mizrahi. 2015. "Diversity and Disease Pathogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*." *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.tim.2014.10.005.
- Wirth, Thierry, Falk Hildebrand, Caroline Allix-Béguec, Florian Wölbeling, Tanja Kubica, Kristin Kremer, Dick Van Soolingen, et al. 2008. "Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex." *PLoS Pathogens* 4 (9). doi:10.1371/journal.ppat.1000160.
- Yimer, Solomon A, Hanna Nebenzahl-Guimaraes, Dick van Soolingen, Roland Brosch, Carol Holm-Hansen, and Jessica de Beer. 2016. "Genomic Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 7 and a Proposed Name: 'Aethiops Vetus.'" *Microbial Genomics* 2 (6): 1–8. doi:10.1099/mgen.0.000063.
- Zenteno-Cuevas, Roberto, Fabiola Mendoza-Damián, Irving Cansino Muñoz, Leonor Enciso-Moreno, Lucia Monserrat Pérez-Navarro, Ma Dolores Ramírez-Hernández, Karen Vázquez-Medina, Lorena Widrobo-García, Michael Lauzardo, and José Antonio Enciso-Moreno.

2015. "Description of the Population Structure and Genetic Diversity of Tuberculosis in Estado de México, a Low Prevalence Setting from Mexico." *APMIS* 123 (2): 116–22. doi:10.1111/apm.12312.