



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS AISLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR EN

ORIZABA, VERACRUZ

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. ORDAZ VÁZQUEZ ANABEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

COMITÉ TUTOR:

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA DE GUADALUPE SOUZA SALDÍVAR

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS AISLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR EN ORIZABA, VERACRUZ

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. ORDAZ VÁZQUEZ ANABEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

COMITÉ TUTOR:

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA DE GUADALUPE SOUZA SALDÍVAR

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1133/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de septiembre de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la estudiante ORDAZ VÁZQUEZ ANABEL con número de cuenta 513014569 con la tesis titulada "ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS AISLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR EN ORIZABA, VERACRUZ", realizada bajo la dirección de la DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
Vocal: DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN
Vocal: DRA. ARIADNNA DEL CARMEN CRUZ CÓRDOVA
Vocal: DRA. MARÍA ROSALÍA LIRA CARMONA
Secretario: DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA DE GUADALUPE SOUZA SALDÍVAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 24 de noviembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM) por brindarme todo lo necesario para mi formación académica. Al conocimiento compartido por la extraordinaria plantilla de profesores y la excelencia en la calidad de sus clases.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca (número de becario 280577) otorgada durante mi formación en el doctorado.

A mi tutora la Dra. Miriam Bobadilla del Valle con la cual estoy profundamente agradecida, por su paciencia para conmigo, por su amistad y por invertir interminables horas en mi formación.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Valeria Souza Saldívar y al Dr. Carlos Arturo Becerra Bracho por su excelente asesoría y sus muy atinados comentarios durante el desarrollo del trabajo, fueron increíbles.

Agradecimientos personales

Quiero agradecer a todas aquellas increíbles personas que me han brindado su apoyo, su amistad, su tiempo y su conocimiento.

Principalmente a la Dra. Miriam Bobadilla con quien estaré siempre agradecida por todo lo que me ha enseñado, por compartir conmigo su amor por las micobacterias y la ciencia. Al Dr. José Sifuentes y al Dr. Alfredo Ponce muchas gracias por abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y gracias por su confianza, los admiro por su capacidad de enseñanza.

También quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Microbiología Clínica, gracias por soportarme, por ayudarme siempre, por tomarme en cuenta y por permitirme robarles un poco de su inmenso conocimiento, no puedo mencionar a todos, pero de verdad muchas gracias.

Agradezco a Barbarita, Ivonne, Lula y al Sr. Luis porque han tenido especial cuidado de mi durante 10 años, gracias por sus palabras de aliento, por las muchas historias divertidas, por las risas y por compartir su sabiduría. Gracias a mis compinches del laboratorio Ayleen, Vero y Jaqueline simplemente son como agua fresca... de limón en un día caluroso, gracias por reír conmigo y de mí, por ayudarme con los sinónimos y con los ¿cómo suena mejor, tú que entiendes y cómo se dice en inglés?, definitivamente los días serían complicados sin ustedes. Gracias Dámaris por tu amistad, por las locuras, por la compañía, las cientos de historias sin sentido y las palabras de ánimo. ¡Ha sido un privilegio conocerlos a todos!

A los integrantes del jurado: Dra. Clara Inés Espitía Pinzón, Dr. Jorge Alberto Barrios Payán, Dra. Ariadna del Carmen Cruz Córdova y Dra. María Rosalia Lira Carmona, por su tiempo, por sus comentarios y observaciones las cuales enriquecieron el escrito.

Por sobre todo gracias a Dios porque ahora conozco el verdadero significado de la palabra: Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes Josué 1:9, porque siempre estuvo ahí.

Dedicatoria

A mis padres Alfonso Ordaz y Celina Vázquez, quienes siempre serán mis más grandes amores. Gracias por su amor y apoyo incondicional, por su ejemplo de perseverancia, por enseñarme que todo se gana con trabajo, gracias por cada peso invertido en mi educación, por la corrección que muchas veces fue merecida, por cada palabra de ánimo, por cada oración, por esperarme cada fin de semana con una sonrisa. Espero honrar con esto un poco de lo mucho que me han dado. ¡Gracias por haber decidido tener una más!

A mis hermanos Maruxa y Abraham a quienes amo entrañablemente y admiro por hacer las cosas buscando siempre la perfección y ser mejores todos los días. Son un gran ejemplo como hermanos, como hijos y como esposos, espero seguirles el paso. Deseo seguir haciendo buenos recuerdos juntos hasta que nuestras cabezas se tiñan de plata. Siempre estaré agradecida porque no estaría aquí si no fuera porque cuando era niña me hicieron la tarea un día, o tal vez dos, o tal vez tres...

A mis hermanos por elección Goyo y Nancy, muchas gracias por aparte de soportar a mis hermanos tener que aguantar mis extensas pláticas de tuberculosis, de epidemiología, de inmunología, de resistencia a fármacos, por escuchar las novelas del laboratorio, del metro y de mi San Petesburgo. Gracias por su respaldo, por sus palabras de apoyo, por esperarme hasta tarde, por alimentarme, en fin, son el mejor público por obligación que alguien como yo puede tener.

A los hombres de mi vida, todo esto es por ustedes y para ustedes. A mí amado Abraham de corazón tierno y sensible. A mí amado Israel quien es un soñador, un protector y un guerreo. A mí amado Caleb quien tiene las ideas más extraordinarias y nunca será conmovido. A mí amado Elieser de corazón valiente y de sentido ocurrente. A mí amado Asher quien nos llena de sonrisas e ilumina nuestras vidas. ¡Son una bendición y mi inspiración!

ÍNDICE

Páginas

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. Epidemiología de la Tuberculosis. | 3 |
| 1.2. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 4 |
| 1.3. Presentación clínica de la enfermedad. | 6 |
| 1.4. Factores de riesgo..... | 8 |
| 1.5. Características genéticas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 8 |
| 1.6. Mecanismos de resistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 10 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 12 |
| 2.1 Epidemiología molecular de la tuberculosis. | 12 |
| 2.2 Genotipificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por MIRU-VNTR..... | 13 |
| 2.3 Secuenciación de genoma completo (WGS) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 15 |
| 3. ANTECEDENTES | 17 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 5. HIPÓTESIS | 21 |
| 6. OBJETIVO GENERAL | 21 |
| 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 8. METODOLOGÍA | 22 |
| 8.1 Diseño del estudio. | 22 |
| 8.2 Población del estudio. | 22 |
| 8.3 Extracción de ADN. | 22 |
| 8.4 Tipificación por 24-loci MIRU-VNTR. | 22 |
| 8.5 Análisis de datos de genotipificación..... | 23 |
| 8.6 Determinación del índice de transmisión reciente..... | 23 |
| 8.7 Evaluación del método de tipificación y diversidad alélica. | 23 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 8.8 | Definiciones para el análisis de asociación entre sublinajes y características clínicas. | 24 |
| 8.9 | Análisis estadístico..... | 25 |
| 8.10 | Secuenciación de genoma completo (WGS) y análisis de secuencias. | 25 |
| 9. | RESULTADOS..... | 26 |
| 10. | DISCUSIÓN..... | 50 |
| 11. | CONCLUSIONES..... | 60 |
| 12. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 61 |
| 13. | ANEXO (Artículo requisito para la obtención del grado)..... | 73 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Lista de genes asociados con la resistencia a fármacos más comúnmente utilizados para el tratamiento contra TB..... | 11 |
| Tabla 2. Características de los pacientes con TB pulmonar de Orizaba, Veracruz..... | 27 |
| Tabla 3. Distribución de los aislados en conglomerado y tamaño del conglomerado de acuerdo a los sublinajes (n=755)..... | 30 |
| Tabla 4. Resultados entre la asociación de pertenecer a un conglomerado y la resistencia al menos a un fármaco..... | 32 |
| Tabla 5. Variables asociadas a la MDR-TB, estratificadas por pertenencia a conglomerados. | 33 |
| Tabla 6. Resultados de la diversidad alélica (<i>h</i>) para el panel de 24 <i>loci</i> MIRU-VNTR. | 35 |
| Tabla 7. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con TB pulmonar de la cohorte en Orizaba, Veracruz, de 1997-2010, según el sublinaje determinado por el panel 24- <i>loci</i> MIRU-VNTR. | 36 |
| Tabla 8. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con TBP en Orizaba, Veracruz, 1997-2010, analizadas por el sublinaje de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> obtenido por el panel 24- <i>loci</i> MIRU-VNTR. | 37 |
| Tabla 9. Resultados del desenlace al tratamiento en pacientes con TBP de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010, analizados por sublinaje determinado por el panel 24- <i>loci</i> MIRU-VNTR.... | 38 |
| Tabla 10. Resultados del desenlace del tratamiento de los pacientes con TBP de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010, analizado por el sublinaje determinado por el panel 24- <i>loci</i> MIRU-VNTR..... | 39 |
| Tabla 11. Resultados de las características clínicas y desenlace del tratamiento en pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010..... | 39 |
| Tabla 12. Características según cavitaciones en pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010 | 40 |
| Tabla 13. Características asociadas a fracaso a tratamiento en pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010. | 41 |
| Tabla 14. Características asociadas a presentar cavitaciones como hallazgo radiográfico. Orizaba, Veracruz, 1997-2010 (n=626)..... | 42 |
| Tabla 15. Características socio-demográficas y moleculares de los aislados secuenciados de pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, seleccionados para el análisis de WGS. (n=12)..... | 43 |
| Tabla 16. Características generales de las secuencias de <i>M. tuberculosis</i> (n=12)..... | 43 |
| Tabla 17. Resultados del análisis de las mutaciones en genes que confieren resistencia a fármacos obtenidas por la secuenciación de genoma completo de 12 aislados de <i>M. tuberculosis</i> seleccionados..... | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Principales causas de muerte e incidencia mundial de TB. | 4 |
| Figura 2. Estructura filogenética global del CMTB. | 5 |
| Figura 3. Cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> | 10 |
| Figura 4. Principio de la genotipificación por MIRU-VNTR. | 14 |
| Figura 5. Proporción global de cada sublinaje de <i>M. tuberculosis</i> | 28 |
| Figura 6. Árbol recubridor mínimo (Minimum spanning tree, MST)..... | 29 |
| Figura 7. Árbol construido con los resultados del sublinaje y perfil de resistencia de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> | 31 |
| Figura 8. Resultados de la distribución de resistencia primaria, resistencia adquirida y sublinajes asignados entre los aislados en conglomerados..... | 34 |
| Figura 9. Formación de conglomerados por WGS a partir de la diferencia de SNP entre los 12 aislados de <i>M. tuberculosis</i> de pacientes con TB pulmonar de Orizaba, Veracruz..... | 45 |
| Figura 10. Análisis comparativo de los genomas de <i>M. tuberculosis</i> | 47 |
| Figura 11. Mapa de la ciudad de Orizaba, Veracruz. Distribución geográfica de los 12 pacientes seleccionados con TB pulmonar | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| BAAR | Bacilo alcohol ácido resistente |
| CMTB | Complejo Mycobacterium tuberculosis |
| CRISPR | Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas espaciadoras |
| CTAB | Bromuro de cetil trimetil amonio |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DR | Directo repetido |
| DR-TB | Tuberculosis drogo-resistente |
| EMB | Etambutol |
| GC | Guanina-Citosina |
| HGDI | Índice de discriminación Hunter-Gaston |
| IC | Intervalo de confianza |
| IMC | Índice de masa corporal |
| INH | Isoniazida |
| IQR | Rango intercuartilar |
| IS | Secuencia de inserción |
| LSP | Polimorfismos de secuencias largas |
| MDR | Multi-drogo resistente |
| MGIT | Tubo indicador de crecimiento micobacteriano |
| MIRU-VNTR | Repeticiones en tándem de número variable, de las unidades repetitivas intercaladas micobacterianas |
| MST | Árbol recubridor mínimo –del inglés Minimum spanning tree |
| OADC | Ácido oleico, Albumina, Dextrosa y Catalasa |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OR | Razón de momio –del inglés odds ratio |
| P | Probabilidad |
| pb | pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PE | Motivos ricos en prolina-ácido glutámico |
| PPE | Motivos ricos en prolina-prolina-ácido glutámico |
| RD | Región de diferenciación |
| RIF | Rifampicina |
| RMa | Razón de momios ajustada |
| RR | Razón de riesgo |
| RTI | Índice de transmisión reciente |
| SNP | Polimorfismos de un solo nucleótido |
| STR | Estreptomina |
| TB | Tuberculosis |

| | |
|---------------|--|
| TBL | Tuberculosis latente |
| TB-MDR | Tuberculosis multidrogo resistente |
| TBP | Tuberculosis pulmonar |
| TNF | Factor de necrosis pulmonar |
| UPGMA | Agrupamiento de pares no ponderado utilizando media aritmética |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |
| WGS | Secuenciación de genoma completo |

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa con epidemiología compleja, la genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* ha desempeñado un papel importante desde el punto de vista de salud pública con énfasis en la búsqueda de la dinámica de la transmisión y la identificación de los factores subyacentes en los brotes de la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura poblacional de *M. tuberculosis* de una cohorte de pacientes con tuberculosis pulmonar en Orizaba, Veracruz. En este estudio se incluyeron 755 aislados de *M. tuberculosis* obtenidos durante el período de 1995 y 2010, los cuales fueron genotipificados por 24-*loci* MIRU-VNTR. Además, se determinó la susceptibilidad a fármacos de primera línea. Se realizaron modelos de regresión logística para identificar las variables asociadas con la resistencia a fármacos y transmisión, así como la asociación entre características clínicas y sublinajes de *M. tuberculosis*. Se calculó el índice de transmisión reciente, el índice de discriminación Hunter-Gaston para la prueba MIRU-VNTR. Se secuenciaron 12 aislados por secuenciación de genoma completo, los cuales fueron divididos en tres grupos de acuerdo con su patrón de MIRU-VNTR, y se determinaron las cadenas de transmisión por el número y posición de polimorfismos de un solo nucleótido entre los aislados. Además, se identificaron las mutaciones asociadas con resistencia a fármacos. Observamos que los sublinajes Haarlem y LAM fueron los más comunes en la población. Un total de 519 aislados se agruparon en 128 conglomerados. La tasa global de resistencia fue del 19% (116/612). La mono-resistencia a la isoniazida fue la más común con 10% (61/612) y el 3.2% (20/612) de los aislados fueron multidrogo-resistentes. Entre los 116 aislados resistentes al menos a un fármaco, las tasas de resistencia primaria y adquirida fueron del 81.9% (95/116) y el 18.1% (21/116) respectivamente. La resistencia primaria se asoció con la formación de conglomerados. La historia de tratamiento previo y el sublinaje de LAM se asociaron con multidrogo-resistencia. El índice de transmisión reciente fue de 51.7% y el índice de discriminación Hunter-Gaston para 24-*loci* MIRU-VNTR fue 0.98. El consumo de alcohol, la diabetes mellitus tipo 2, el grado de positividad de la baciloscopia (3+) y los aislados de sublinaje LAM se asociaron con la presencia de cavitaciones. La resistencia al menos a un fármaco y el hecho de tener aislados de sublinaje distintos a Haarlem y LAM se asociaron con fracaso a tratamiento. En un segundo modelo, la multidrogo-resistencia se asoció con fracaso a tratamiento. El número y posición de polimorfismos de un solo nucleótido fue <12 entre cuatro aislados con un patrón de MIRU-VNTR idéntico, lo que podría indicar transmisión reciente. Encontramos mutaciones en los genes *rpsL* (Lys88Arg) que confiere resistencia a estreptomina; en *rpoB* (Ser450Leu) resistencia a rifampicina y en los genes *katG*, *ahpC* y *fabG-inhA* que confieren resistencia a isoniazida. Conclusiones: los aislados de *M. tuberculosis* presentaron alto grado de diversidad genética. La genotipificación por MIRU-VNTR fue útil como método de escrutinio para el estudio de la transmisión de la tuberculosis. Encontramos alta transmisión de resistencia primaria en la población y se observaron importantes asociaciones entre sublinajes de *M. tuberculosis* con la presentación clínica de la enfermedad y la resistencia a fármacos. Con la secuenciación se observaron las mutaciones que confieren resistencia a fármacos y mostró la direccionalidad de las cadenas de transmisión, las cuales parecen ser el resultado de contactos casuales en la comunidad.

ABSTRACT

Tuberculosis is a contagious disease with a complex epidemiology; *Mycobacterium tuberculosis* genotyping has played an important role from a public health point of view with special emphasis in the transmission dynamics and identifying the factors underlying disease outbreaks. Therefore, the aim of this work was to study the population structure of a pulmonary tuberculosis patient's cohort in Orizaba, Veracruz. In this study a total of 755 *M. tuberculosis* isolates obtained from 1995 to 2010 were genotyped by 24-loci MIRU-VNTR. In addition, first line drug susceptibility was determined. Logistic regression models were constructed to identify variables associated with drug resistance and transmission, as well as the association between clinical characteristics and *M. tuberculosis* sublineages. Recent transmission index and Hunter-Gaston discrimination index for the MIRU-VNTR test were calculated. Twelve isolates were sequenced by whole genome sequencing, divided into three groups according to their MIRU-VNTR pattern, and transmission chains among isolates were determined by the number and position of single nucleotide polymorphisms. Mutations associated with drug resistance were identified. The Haarlem and LAM sublineages were the most common in the population. A total of 519 isolates were grouped into 128 clusters. The overall resistance rate was 19% (116/612). Mono-resistance to isoniazid was the most common in 10% (61/612) of the isolates, 3.2% (20/612) of isolates were multidrug-resistant. Among the 116 isolates resistant to at least one drug, the rates of primary and acquired resistance were 81.9% (95/116) and 18.1%, (21/116) respectively. Primary resistance was associated with belonging to a cluster. Previous treatment history and LAM sublineage were associated with multidrug-resistance. The recent transmission index was 51.7%, and the Hunter-Gaston discrimination index for 24-locus MIRU-VNTR was 0.98. Alcohol consumption, diabetes mellitus type 2, sputum smear positivity grade (3+) and LAM sublineage isolates were associated with the presence of cavitations. Resistance to at least one drug and having isolates other than Haarlem and LAM sublineages were associated with treatment failure. In a second model, multidrug-resistance was associated with treatment failure. The number and positions of single nucleotide polymorphism were <12 among four isolates with identical MIRU-VNTR pattern, indicating possible recent transmission. We found mutations in the *rpsL* (Lys88Arg) genes for streptomycin resistance, in *rpoB* (Ser450Leu) for rifampicin resistance and in several genes (*katG*, *ahpC* and *fabG-inhA*) conferring resistance to isoniazid. In conclusion, *M. tuberculosis* isolates presented a high degree of genetic diversity. MIRU-VNTR genotyping proved to be useful as a screening method for the study of tuberculosis transmission. High transmission of primary resistance was found in the population and significant associations between *M. tuberculosis* sublineages with clinical presentation of disease and drug resistance were observed. Whole genome sequencing use revealed mutations conferring drug resistance and evidenced the directionality of the transmission chains, which appear to be the result of casual contacts in the community.

1. INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* el cual típicamente afecta a los pulmones (tuberculosis pulmonar; TBP), pero también puede afectar otros sitios del cuerpo (tuberculosis extrapulmonar) (Global TB report, 2020). El bacilo de la TB es considerado como Gram positivo y tiene un tiempo promedio de generación de 18-24 horas, posee una envoltura celular rica en lípidos que además de tener una membrana interna, contiene una membrana externa formada por ácidos micólicos principalmente (Boritsch et al., 2014). *M. tuberculosis* no tiene reservorios ambientales conocidos siendo el humano el único reservorio (Pai et al., 2016).

1.1. Epidemiología de la Tuberculosis.

La transmisión continua de *M. tuberculosis* y la reactivación de la TB latente (TBL) son los mecanismos responsables de la carga de la enfermedad a nivel global (Pai et al., 2016). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB se encuentra dentro de las 10 principales causas de muerte en el mundo, con un cuarto de la población mundial infectada **Figura 1A**. Se estima que 10 millones de personas enfermaron y 1.4 millones murieron de TB en 2019. Del total de casos diagnosticados, se detectó multidrogo resistencia (MDR) en 3.3% de los casos nuevos de TB y 17.7% en casos previamente tratados (Global TB report, 2020).

En México, la incidencia de TB en 2019 fue de 23 casos por cada 100,000 habitantes con 24,448 casos notificados **Figura 1B**. La TBP se presentó en 81% de los casos, la población más afectada fueron los hombres en un 62% seguido de las mujeres en un 35%. En México, la incidencia de casos MDR y resistentes a rifampicina fue de 0.76 casos por cada 100,000 habitantes con 381 casos notificados los cuales se presentaron en 11% de casos previamente tratados y 2.6% en casos nuevos (<https://www.who.int/tb/data/en/>).

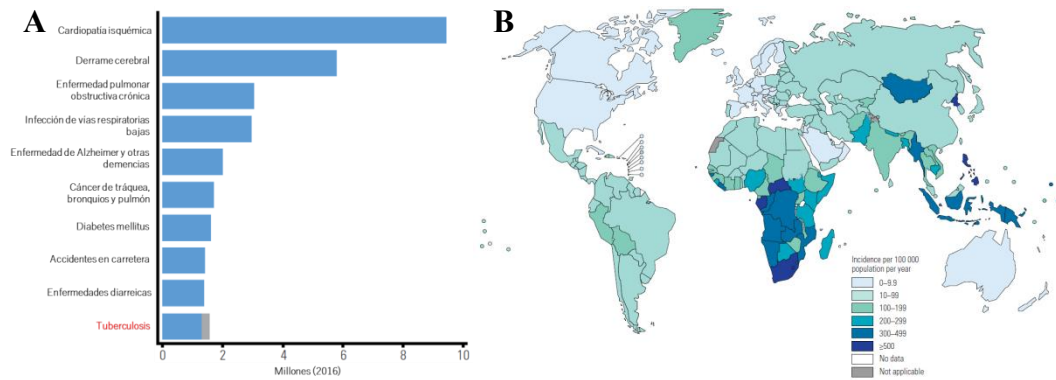


Figura 1. Principales causas de muerte e incidencia mundial de TB. A) Las 10 principales causas de muerte a nivel mundial, (datos 2016). B) Tasa estimada de la incidencia de TB a nivel mundial, datos 2019.

1.2. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular obligado y el miembro más conocido del complejo *M. tuberculosis* (CMTB). El CMTB incluye las especies *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungi* y *M. canettii*, este último es el ancestro común de todos los miembros del CMTB de acuerdo a estudios genéticos, aislado principalmente de casos de TB en humanos y su presencia se limita a países del Cuerno de África (**Figura 2**) (Gagneux and Small, 2007). Los análisis de secuenciación de genoma completo (WGS) y de genómica comparativa de aislados de humanos y animales han revelado que el CMTB está compuesto por múltiples linajes y sublinajes, los cuales se distinguen por una variedad de mutaciones específicas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones/deleciones (indels), regiones de diferencia (RD) y polimorfismos de secuencia largas (LSPs). *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* muestra una fuerte asociación geográfica con poblaciones humanas en diferentes regiones del mundo como se muestra en la **Figura 2** (Brosch et al., 2002; Niemann et al., 2016).

Basados en el análisis de WGS de *M. tuberculosis* se han descrito ocho linajes principales, el linaje 1 (Indo-Oceanic) predomina en la región de la India subcontinental y al sureste asiático en donde se estima causan entre 30-50% de los casos de TB, los aislados son conocidos como EAI. El linaje 2 (East-Asia) es más prevalente en el este de Asia, la gran mayoría de los aislados son conocidos como “Beijing”. El linaje 3 (East Africa and India) se encuentra principalmente distribuido al norte de la India y son conocidos como “Dehli/CAS”. El linaje 4 (Euro-American) es más prevalente en Europa y en América, sin

embargo han sido aislados en cada lugar habitable de la tierra por lo que se considera de distribución mundial, incluye los sublinajes Ghana, Haarlem, tipo X, Ural, TUR, tipo S, LAM, New1, tipo H37Rv, Cameroon y Uganda. *M. africanum* comprende los linajes 5 (West Africa I) y 6 (West Africa II) como su nombre lo indica estos linajes están restringidos a la región occidental de África, se desconoce el por qué no han migrado a otras partes del mundo como usualmente se observa con otros, en la actualidad los linajes 5 y 6 parecen haber sido superados y re-emplazados por otros linajes de *M. tuberculosis* en la región de origen. El linaje 7 (Etiopia) fue identificado en la región del cuerno de África (Boritsch et al., 2014; Coscolla and Gagneux, 2014). El linaje 8 es el más recientemente identificado descrito en la región de los grandes lagos de África (Ngabonziza et al., 2020).

Sin embargo, estos linajes no forman una unidad monofilética ya que no todos comparten el mismo ancestro común más reciente. Particularmente *M. africanum* linajes 5 y 6 comparten un ancestro común con los linajes adaptados a animales **Figura 2**. Los primeros en divergir de un ancestro común fueron el linaje 1 adaptado a humanos, el ancestro del cual evolucionaron los linajes 5 y 6 así como los linajes adaptados a animales (Coscolla and Gagneux, 2014).

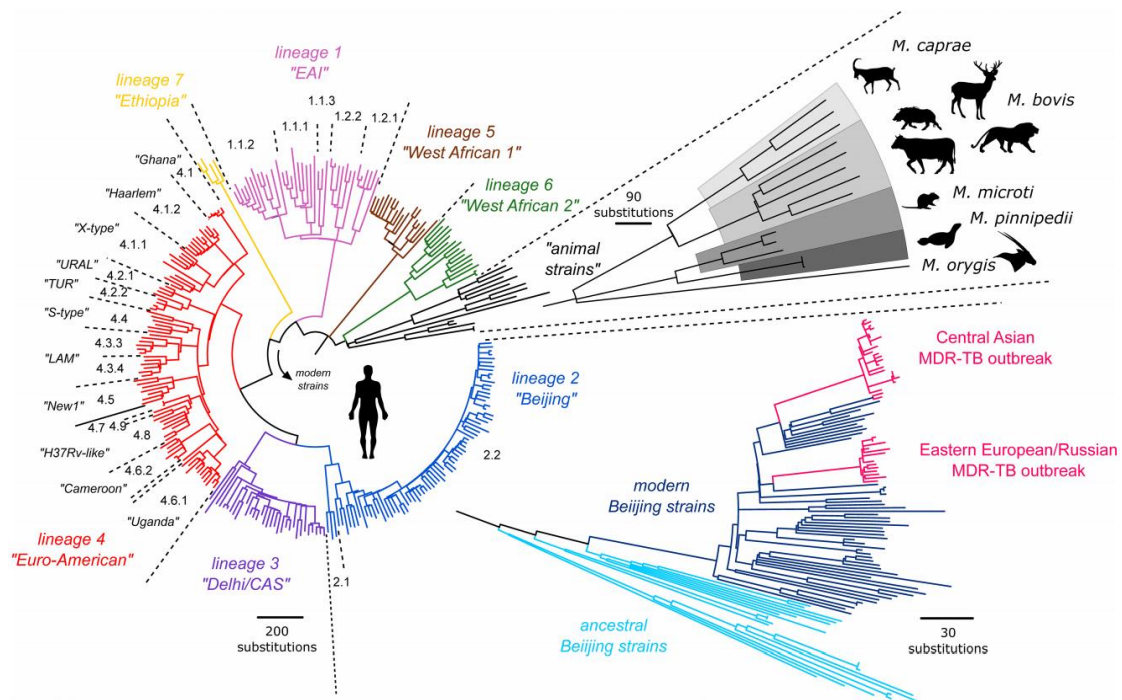


Figura 2. Estructura filogenética global del CMTB.

Los miembros del CMTB son altamente clonales y debido a que no realizan transferencia horizontal de genes, su principal fuente de variación genética está dada por la mutación, donde destacan las deleciones y la pérdida de genes (Brites and Gagneux, 2017). En promedio dos cepas de *M. tuberculosis* adaptadas a humanos difieren en alrededor de 1,200 a 2,000 SNP que corresponde al 0.03% del genoma excluyendo las regiones repetitivas. Algunos estudios han calculado la distancia promedio de SNP entre aislados del mismo y diferente linaje dentro del CMTB. El linaje 1 tuvo la mayor distancia con 730 SNP entre cepas del mismo linaje, la menor distancia la tuvo el linaje 7 con 230 SNP. Al comparar las distancias entre cepas de distintos linajes, la distancia promedio entre cepas de linaje 2/3/4 fue de 970 SNP y entre linaje 1/5/6 fueron más distantes con 1,500 SNP (Coscolla and Gagneux, 2014). *M. tuberculosis* es una de las bacterias con la evolución más lenta entre los patógenos que afectan al humano, presenta una tasa de sustitución en el orden de 10^{-8} sustituciones por sitio por año (5.39×10^{-8}) o ~ 0.3 SNP por año (Duchêne et al., 2016; Merker et al., 2017).

Además, los linajes pueden ser clasificados como ancestrales y modernos de acuerdo a la presencia o ausencia de un segmento genómico de 2,153 pares de bases (pb) definido como región de deleción 1 específica de *M. tuberculosis* que codifica para MmpS6/MmpL6 (TbD1). Los linajes “ancestrales” L1/L5/L6/L7 y *M. bovis* mantienen intacta la región TbD1+ y representan cepas endémicas restringidas a ciertas áreas geográficas. Los linajes “modernos” L2/L3/L4 presentan la deleción de la región TbD1– los cuales están asociados con una amplia distribución geográfica (Bottai et al., 2020).

1.3. Presentación clínica de la enfermedad.

La TBP es la forma más común de la enfermedad debido a que su vía de transmisión principal es aérea. En comparación con otros agentes patógenos *M. tuberculosis* no es considerado altamente infeccioso, en promedio un individuo con TBP activa puede infectar de 3-10 personas por año de los cuales una minoría (5-15%) progresará a TB activa, de los cuales aproximadamente el 50% mueren en ausencia de tratamiento (Pai et al., 2016).

De acuerdo a la historia natural de la enfermedad la infección se inicia, cuando una persona inhala los bacilos expulsados por un individuo con TBP activa al toser, estornudar, escupir o hablar (Global TB report, 2020). Una vez que el bacilo de *M. tuberculosis* es inhalado alcanza las vías respiratorias bajas y es fagocitado por macrófagos alveolares que migran hacia el parénquima pulmonar (Pai et al., 2016). El depósito de *M. tuberculosis* en los pulmones conduce a uno de cuatro resultados probables: (i) eliminación rápida del microorganismo, (ii) desarrollo de enfermedad primaria, (iii) desarrollo de infección latente y (iv) reactivación de la enfermedad después de muchos años. El desenlace de un individuo expuesto depende de muchos factores que incluyen: la carga bacteriana y su virulencia, factores del huésped como la respuesta inmune de las células T, la inmunidad retardada y el estado nutricional. Posteriormente, tanto células dendríticas como monocitos transportan el bacilo hacia ganglios linfáticos para la presentación de antígenos a células T. Este evento produce el reclutamiento de las células inmunes T y B hacia el parénquima pulmonar para formar un granuloma (Pai et al., 2016). Los contactos cercanos de un paciente con TBP activa tienen mayor riesgo de infectarse, sin embargo, se ha demostrado que la tasa de infección entre contactos cercanos varía de 25 a 50% incluso en condiciones de hacinamiento y deficientes (Reichler et al., 2018).

Desde la perspectiva clínica y de salud pública los pacientes con TB se clasifican en individuos con infección latente, enfermedad asintomática de estado no transmisible e individuos con enfermedad activa transmisible, esta última puede ser diagnosticada mediante diagnóstico molecular o microbiológico (Pai et al., 2016). El síntoma más evidente de la TBP activa es la tos persistente que se registra en el 95% de los casos. Sin embargo, los pacientes también experimentan fiebre (75%), sudores nocturnos (45%) y pérdida de peso (55%), fatiga progresiva y malestar general. Además, pueden observarse vetas de sangre en el esputo como resultado de la ruptura de vasos sanguíneos cavitarios en los pulmones (Knechel, 2009).

Una de las principales características inmuno-patológicas de la TBP activa es la formación de cavidades en pulmón. Estas estructuras tienden a albergar gran cantidad de bacilos y por ello es la forma más infecciosa de la enfermedad. En contraste, la TB extra-

pulmonar es generalmente no infecciosa y de menos prioridad para la salud pública (Gagneux, 2012).

1.4. Factores de riesgo.

Una pequeña proporción (5-10%) de los 2 billones de personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrollará TB activa en el transcurso de su vida. La magnitud de la transmisión dependerá del número de individuos con la forma activa de la enfermedad, el número de contactos susceptibles, la frecuencia y la proximidad de la interacción, así como las características biológicas de *M. tuberculosis* que afectan la transmisión (Mathema et al., 2017).

Algunos de los factores de riesgo socio-culturales y ambientales asociados a promover la transmisión de la TB incluyen: la pobreza, la sobrepoblación, la migración, la poca ventilación en las viviendas, la accesibilidad al diagnóstico, la capacidad de los sistemas de salud para identificar y tratar efectivamente individuos con la forma activa. Asimismo, factores como la desnutrición (riesgo relativo; RR 3.2), el alcoholismo (RR 3.3), el tabaquismo (RR 1.5), la edad, el uso de terapias inmunosupresoras como antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF) y corticosteroides, la presencia de comorbilidades como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los individuos infectados con VIH tienen un riesgo 18 veces mayor de desarrollar TB, la falla renal crónica, la silicosis y la diabetes mellitus (DM) (RR 1.5), aunque pueden variar entre poblaciones. Por lo tanto, es esencial considerar que la carga de TB varía en función de la presencia global del factor de riesgo asociado (Dheda et al., 2016; Global TB report, 2020).

1.5. Características genéticas de *Mycobacterium tuberculosis*.

La longitud del genoma de *M. tuberculosis* es de 4 411 532pb, es circular, carece de plásmidos y se trata de uno de los ejemplos más extremos de homogeneidad genética (Bañuls et al., 2015). Su genoma codifica aproximadamente poco más de 4,000 genes además de tener un alto contenido (65.6%) de guanina citosina (GC). Su característica más notable es la gran cantidad de genes (~233) asociados con la producción de enzimas involucradas en la lipogénesis y lipólisis. Así mismo, aproximadamente el 10% del genoma codifica para dos grandes familias de proteínas conocidas como PE/PPE, comprenden 99 y

69 miembros respectivamente. Estas familias de proteínas están caracterizadas por la presencia de patrones de plegamiento característico también conocidos como motivos ricos en prolina-ácido glutámico (PE) y prolina-prolina-ácido glutámico (PPE) en el dominio N-terminal altamente conservado entre sus miembros rica en glicina. Los dominios C-terminales de las familias de proteínas PE/PPE son muy variables tanto en tamaño como en secuencia y a menudo contienen secuencias repetitivas que difieren en número de copias entre los genes (Cole et al., 1998; McEvoy et al., 2012).

M. tuberculosis también presenta secuencias de inserción (IS, del inglés insertion sequences) que debido a su movilidad de transposición pueden dar lugar a diferencias en la expresión de genes (Safi et al., 2004). En el CMTB se han identificado un total de 29 elementos IS diferentes (Cole et al., 1998). Otra región repetitiva muy conservada dentro del cromosoma de *M. tuberculosis* es el locus de repetición directa (DR), un miembro de la familia de secuencias de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) (Brudey et al., 2006). Esta región consiste en una secuencia guía no codificante rica en adenina y timina (A/T) y un número variable de secuencias repetitivas idénticas de 36pb separadas por múltiples secuencias espaciadoras únicas de 35-43pb (Dale et al., 2001). También están presentes en el genoma varios loci que contienen diferentes secuencias repetidas en tándem descritas más adelante. Estas pequeñas diferencias en el genoma se han explorado intensamente en los últimos años y han servido de base para muchos métodos de tipificación del CMTB **Figura 3**.

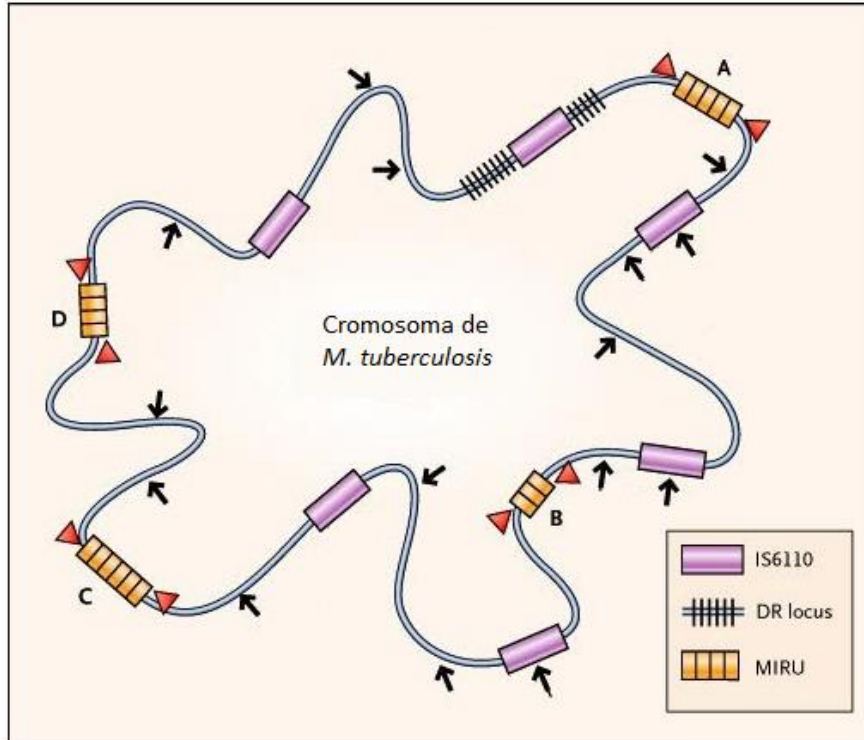


Figura 3. Cromosoma de *M. tuberculosis*. Se observan las secuencias de inserción, el locus de repetición directa y de secuencias repetidas en tándem. (Tomada y modificada de Barnes, 2003. N. Engl. J. Med.)

1.6. Mecanismos de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tuberculosis presenta resistencia intrínseca a un gran número de fármacos debido a mecanismos que incluyen una envoltura celular gruesa, cerosa e hidrofóbica, la presencia de enzimas que degradan y modifican fármacos, además de sistemas de eflujo que se han descrito se expresan bajo ciertas condiciones (Gygli et al., 2017).

En ausencia de transferencia horizontal de genes, plásmidos de resistencia u otros elementos genéticos móviles, el desarrollo de resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* es principalmente por mutaciones cromosómicas (Pai et al., 2016). Los principales mecanismos de resistencia son modificaciones o sobreexpresión del blanco de acción (una mutación en la RNA polimerasa que evita la afinidad de la rifampicina por el blanco), pueden reducir o abolir por completo la unión al fármaco. Así mismo, un defecto en la enzima encargada de convertir un pro-fármaco a un fármaco activo (por ejemplo, una catalasa bacteriana mutante que no activa la isoniazida) (Pai et al., 2016; Gygli et al., 2017).

A continuación, se muestra una lista de genes asociados con resistencia a fármacos anti-TB

Tabla 1.

Tabla 1. Lista de genes asociados con la resistencia a fármacos más comúnmente utilizados para el tratamiento contra TB.

| Drug | Gene(S) | Function of the gene | Mechanism of resistance |
|-----------------|-------------------|------------------------------------|---|
| Rifampin | <i>rpoB</i> | <i>B</i> subunit of RNA polymerase | Inhibition of RNA synthesis |
| Isoniazid | <i>katG</i> | Catalase-peroxidase | Reduces the ability to activate the prodrug isoniazid |
| | <i>inhA</i> | Enoyl ACP reductase | Reduces the binding of NADH to <i>inhA</i> and attack by isoniazid |
| | <i>ahpC</i> | alkyl hydroperoxide reductase | Overexpression of the antioxidant enzyme AhpC, that removes peroxide necessary for isoniazid activation |
| | <i>kasA</i> | B-ketoacyl ACP synthase | Overexpression of KasA, involved in fatty acid and mycolic acid synthesis |
| | <i>ndh</i> | NADH dehydrogenase | Increases the NADH/NAD ratio, competes with the binding of isoniazid-NAD to <i>inhA</i> |
| Ethambutol | <i>embB</i> | Arabinosyl transferase | Decreases the binding to ethambutol |
| Pyrazinamide | <i>pncA</i> | Pyrazinamidase | Lack of conversion of pyrazinamide to pyrazinoic acid |
| Streptomycin | <i>rpsL</i> | S12 ribosomal protein | Decreased binding of streptomycin to S12 ribosomal protein |
| | <i>rrs</i> | 16S rRNA | Decreased binding of aminoglycosides to 16S rRNA |
| Amikacin | | | |
| Kanamycin | <i>rrs</i> | 16S rRNA | Decreased binding of aminoglycosides to 16S rRNA |
| Capreomycin | <i>tlyA</i> | 2'-O-methyltransferase | |
| Fluoroquinolone | <i>gyrA, gyrB</i> | DNA gyrase | Inhibition of DNA gyrase |
| Ethionamide | <i>inhA</i> | Enoyl ACP reductase | Inhibition of mycolic acid synthesis |
| | | Flavin monooxygenase | |

ACP = acyl carrier protein; NADH = nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form

Tomado de: The management of tuberculosis: epidemiology, resistance and monitoring. Bang D. 2010. Dan Med Bull.

Conocer los mecanismos de resistencia se limita a pruebas de susceptibilidad fenotípica y genotípica. La interpretación de los resultados fenotípicos es dicotómica, susceptible o resistente y se encuentra estandarizada solo para algunos fármacos (estreptomycin, STR; isoniazid, INH; rifampicin, RIF y etambutol, EMB), además de ser una prueba lenta y costosa. Las pruebas genotípicas se fundamentan en predecir fenotipos de resistencia a través de la detección de mutaciones en genes que confieren resistencia a los antibióticos mediante la secuenciación genómica de los aislados de *M. tuberculosis*. Sin embargo, en algunos genes identificar una mutación no necesariamente es el resultado de resistencia fenotípica, por lo que las pruebas de susceptibilidad a partir del cultivo continúan siendo una herramienta fundamental (Pai et al., 2016).

La TB droga resistente (TB-DR) puede clasificarse como primaria o adquirida. La resistencia primaria se define como la presencia de resistencia a uno o más fármacos en aislados de *M. tuberculosis* en pacientes que previamente no habían recibido tratamiento anti-tuberculosis. La resistencia adquirida se define como la presencia de aislados resistentes a uno o más fármacos en pacientes que han recibido tratamiento previamente (Conaty et al., 2004).

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Epidemiología molecular de la tuberculosis.

La investigación de los brotes de TB, implica la evaluación de personas que han estado en contacto estrecho con un paciente con TBP activa para identificar los casos secundarios de TB e infección latente (estudio de contactos). Ha sido un componente integral de salud pública para el control de la TB durante décadas. A principios de los años 90's se introdujo la epidemiología molecular de *M. tuberculosis* como herramienta de investigación y como complemento al estudio de contactos (Kato-Maeda et al., 2011).

Estudios realizados en los 90's describieron sitios monomórficos y polimórficos en el genoma bacteriano, los cuales pueden ser divididos en tres grupos conocidos como: SNP, LSP, y polimorfismos de secuencias repetitivas, estos últimos a su vez pueden ser clasificados en a) elementos transponibles y b) repetidos en tándem. En comparación con los SNP y LSP, los polimorfismos en secuencias repetitivas tienden a evolucionar más rápidamente (Desikan and Narayanan, 2015). Las variaciones genéticas pueden detectarse mediante marcadores. Algunos de estos marcadores detectan variaciones que tuvieron lugar en un tiempo más o menos lejano y sirven para clasificar las cepas en linajes de interés filogenético. Otros marcadores detectan variaciones mucho más recientes y permiten tipificar las cepas para reconocer cadenas de transmisión, por lo tanto se ha implementado su uso en la investigación epidemiológica (Coll and García de Viedma, 2018).

La genotipificación no solo ayuda a entender aspectos epidemiológicos de la enfermedad, también es útil para el manejo clínico de los pacientes debido a la clasificación de cepas, en algunos casos se han observado importantes consecuencias clínicas como potencial resistencia a fármacos, falla a tratamiento o aumento en la transmisibilidad. El uso de herramientas moleculares en los programas contra la TB ayuda a monitorear las tendencias epidemiológicas, evaluar el desempeño de los programas e identificar contaminación cruzada de cultivos o definir la dinámica de la transmisión de organismos resistentes (Ei et al., 2016).

En epidemiología, una clona o grupo clonal hace referencia a un grupo de aislados relacionados por el hecho de descender de un ancestro común. Las cepas relacionadas

proviene de la expansión clonal de un precursor único, y poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superiores al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente. Para definir una clona es necesario medir su nivel de similitud tomando en cuenta el marcador utilizado y el tiempo de duración de la investigación (Coll and García de Viedma, 2018).

Medir la transmisión de la TB y estimar la importancia relativa de la transmisión reciente es sumamente difícil, dado que la infección progresará a enfermedad sólo en una minoría de personas y los períodos de latencia entre individuos son variables con un promedio generalmente descrito entre 3–9 meses sin sobrepasar los dos años (Mathema et al., 2017, Bher et al., 2018).

Se han diseñado varios marcadores genéticos que han sido utilizados para estudios de epidemiología molecular y estudios filogenéticos de *M. tuberculosis*. Sin embargo, el marcador ideal para el estudio de la dinámica de la transmisión de la TB deberá ser lo suficientemente polimórfico para distinguir entre aislados no relacionados, pero lo suficientemente estable como para establecer la conexión entre aislados que sí están relacionados (Kato-Maeda et al., 2011).

2.2 Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* por MIRU-VNTR.

Las repeticiones en tándem de número variable de las unidades repetitivas intercaladas micobacterianas (MIRU-VNTR) se encuentran dispersas a lo largo del cromosoma de *M. tuberculosis*. Las unidades repetitivas tienen una longitud de entre 40-100pb y son consideradas como minisatélites, se localizan en 41 loci en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Supply et al., 2000). La tipificación por MIRU-VNTR se basa en la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa; por sus siglas en inglés) de cada locus utilizando primers específicos complementarios a las regiones que flanquean el locus y el análisis del tamaño de los amplicones. El protocolo original incluye la visualización del producto de PCR en gel, sin embargo, la automatización del método incluye la amplificación por PCR con iniciadores marcados con fluorocromos y la determinación del tamaño de producto se realiza mediante electroforesis capilar. El tamaño de los amplicones está directamente relacionado con el número de locus repetidos. Por lo

tanto, el número de repeticiones es convertido en un código en el cual cada dígito representa el número de copias de cada locus, consecuentemente tendrán 12, 15 o 24 dígitos según el esquema utilizado **Figura 4**.

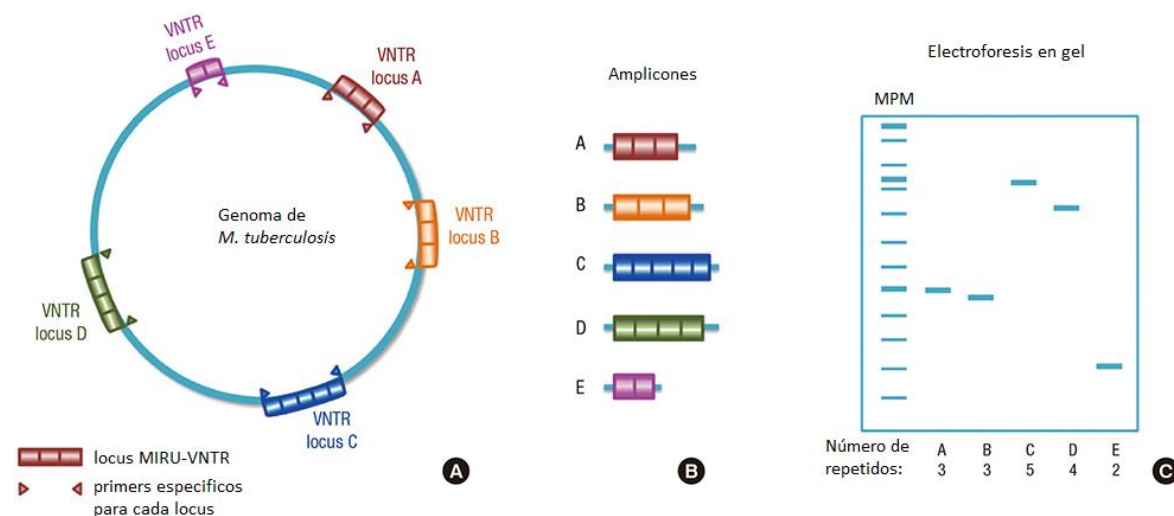


Figura 4. Principio de la genotipificación por MIRU-VNTR. A) Los loci MIRU-VNTR con diferente número de repetidos dispersos en el genoma de *M. tuberculosis*, son amplificados con primers específicos para cada locus. B) Amplicones de diferentes tamaños obtenidos por PCR. C) Después de la electroforesis en gel se observan amplicones de diferentes tamaños que reflejan el número repetitivo de cada locus VNTR.

Supply y cols., en 2006 definieron dos esquemas de MIRU-VNTR optimizados para el análisis. Se seleccionaron 15-loci MIRU-VNTR con las tasas de evolución más altas como el nuevo estándar para la tipificación de cepas, así como un conjunto de 24-loci MIRU-VNTR de alta resolución útil en estudios filogenéticos (Supply et al., 2006). La tipificación por MIRU-VNTR es rápida, fácil, altamente reproducible y discriminatoria, la cual ha reemplazado el uso de RFLP-*IS6110* como método de tipificación. Sus resultados expresados en código de 24 dígitos permiten comparar entre gran cantidad de datos, entre laboratorios y en bases de datos internacionales (<http://www.miru-vntrplus.org>) (Kato-Maeda et al., 2011; Coll and García de Viedma, 2018).

Los loci de MIRU-VNTR parecen ser estables y muestran una tasa baja de evolución ($7 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-2}$ por locus/año), sin embargo, debido a la homoplasia entre algunas cepas y las fuerzas de diferenciación especializadas de algunos locus el análisis MIRU-VNTR puede realizarse de forma dependiente del linaje. Además, ocasionalmente se observan diferencias en el número de copias y alelos dobles en un solo locus, y seguir

considerándose como una variante clonal de la misma cepa (Supply et al., 2006; Allix-Béguec et al., 2014; Merker et al., 2017).

Los métodos de tipificación “clásicos” para *M. tuberculosis* tienen la capacidad de identificar cadenas de transmisión recientes y abordar características clínicas como, distinguir entre reinfección, infecciones mixtas y recaída, además de ser una herramienta para evaluar los sistemas de vigilancia y control de la TB. Sin embargo, el uso de 24-loci MIRU-VNTR como el estándar de oro para la tipificación del CMTB interroga solo un conjunto de regiones altamente polimórficas que sirven como marcadores sustitutos para el perfil genético completo de aislados clínicos y sin relación genética, dicha limitación hace deseable el uso de técnicas más precisas como la secuenciación de genoma completo (Merker et al., 2017).

2.3 Secuenciación de genoma completo (WGS) de *Mycobacterium tuberculosis*.

El uso de WGS como herramienta para el estudio de la TB, facilita descifrar el contenido genómico de los aislados de *M. tuberculosis*, su clasificación en linajes y la inferencia de relaciones genéticas entre diferentes aislados; determinar brotes y definir las potenciales cadenas de transmisión, así como una visión detallada de la evolución de *M. tuberculosis*, además, es una herramienta útil para la detección de mutaciones asociadas con resistencia a fármacos, fitness y virulencia (Boritsch et al., 2014; Perdigão et al., 2014; Coll et al., 2015).

El concepto detrás de la epidemiología genómica es simple. Conforme *M. tuberculosis* se replica surgen mutaciones espontáneas. El análisis del reloj molecular se basa en la estimación del número de mutaciones a lo largo de todo el genoma de *M. tuberculosis* por unidad de tiempo, para establecer vínculos epidemiológicos entre casos, rastrear la fuente de infección y definir la dinámica de la transmisión de la TB (Roetzer et al., 2013; Walker et al., 2013). La estimación de la tasa de mutaciones puede verse afectada por las variaciones intracromosómicas, la diferencia de linaje y las etapas de la infección por ejemplo, TB activa Vs TB latente, ya que durante la infección latente *M. tuberculosis* se encuentra en un estado de dormancia con poca o nula actividad de replicación, en contraste con el estado activo de la enfermedad en el cual produce una continua multiplicación

clonal. Además, este cálculo puede complicarse por la presencia de regiones repetitivas muy variables propensas a mutaciones (por ejemplo, las familias PE-PGRS, PPE y ESX) y su posible omisión durante los análisis de datos genómicos (Barbier and Wirth, 2016).

Por lo que las mutaciones presentes en el genoma de un patógeno que infecta a la persona A, es probable que dicha mutación este también presente en el genoma de los aislados de todas las personas infectadas por A. Al analizar las secuencias de los aislados de cada caso en un brote, los patrones de mutaciones compartidas sugieren eventos de transmisión. Para demostrar la dinámica de la transmisión de la TB es necesario incluir datos de epidemiología clínica de los pacientes involucrados (Guthrie and Gardy, 2017).

Actualmente, realizar WGS implica costos elevados y limita su uso en investigación en países en desarrollo, sin embargo, se espera que en años siguientes el costo disminuya y sea adoptado como el nuevo estándar de oro para la tipificación de *M. tuberculosis* (Ei et al., 2016; Meehan et al., 2019). Otra limitación es la gran cantidad de datos generados, la falta de estandarización de pipelines para el análisis de datos, la capacidad computacional y el conocimiento en bioinformática (Ei et al., 2016; Amlerova et al., 2018; Meehan et al., 2019). Sin bien es posible superar las limitaciones, otros métodos de genotipificación pueden ser útiles en estudios preliminares y en escenarios con bajos recursos.

3. ANTECEDENTES.

En un estudio sobre la epidemiología molecular de la TB se describió la relación y la diversidad genética en 140 aislados de *M. tuberculosis* provenientes de diversas regiones de México, Estados Unidos y otros países de Latinoamérica mediante el uso de 24-*loci* MIRU-VNTR. Se encontraron nueve sublinajes diferentes siendo LAM (19.3%), Haarlem (14.3%) y S (13.6%) los más comunes. Además, al evaluar la relación genética entre los aislados los autores observaron que 41% de los aislados de Baja California, México se agrupa con aislados de San Diego y Sudamérica, 22% con aislados de otras regiones de México y el 25% concuerdan con una distribución cosmopolita. El trabajo concluye que la diversidad genética observada probablemente es el resultado de la migración (Flores-López et al., 2017).

En otro estudio, donde se caracterizaron 112 aislados de *M. tuberculosis* resistentes y MDR circulantes en todo el estado de Veracruz por medio de Spoligotyping y 24-*locus* MIRU-VNTR, encontraron alta diversidad genética con ocho sublinajes descritos, siendo T1 (24%), LAM (16%) y H (15%) los más frecuentes. Describen la asociación entre conglomerados, sublinajes y determinadas regiones geográficas dentro del estado. Además, el poder de discriminación de 24-*loci* MIRU-VNTR fue alto con un HGDI=0.99, en tanto que el alelo con menor discriminación fue MIRU04 (Munro-Rojas et al., 2018).

Uno de los primeros estudios a gran escala de un brote de TB, fue el realizado por Gardy *et al.*, en 2011 en Columbia Británica, Canadá. Identificaron por medio de MIRU-VNTR 32 casos de un posible brote de naturaleza clonal (MIRU-VNTR idéntico). Al utilizar WGS y análisis de redes sociales, mediante el cual identificaron los contactos de casos con TB, lugares de agregación social y comportamientos de alto riesgo que contribuyeron para describir la dinámica del brote, observaron dos clonas de *M. tuberculosis* genéticamente distintos, sugiriendo la ocurrencia de dos brotes simultáneos. La integración de los datos en redes sociales y análisis filogenéticos reveló varios eventos de transmisión y súper-transmisores (Gardy et al., 2011).

En 2012 Walker y *cols.*, secuenciaron 390 aislados de *M. tuberculosis* provenientes de 254 casos. Este trabajo proporcionó puntos de referencia importantes; establecieron una tasa de mutación de 0.5 SNP por año y proponen un umbral de cinco SNP como distancia

máxima entre casos vinculados epidemiológicamente y 12 SNP como umbral por encima del cual se puede descartar la transmisión (Walker et al., 2013).

Una limitante de las herramientas de tipificación “clásicas” es que no proporcionan información sobre las posibles mutaciones en genes asociados con la resistencia a fármacos lo que limita claramente su utilidad clínica (Merker et al., 2017). En un estudio llevado a cabo por Walker y cols. (2015), secuenciaron 2,099 genomas de *M. tuberculosis* entre 2010-2013 con el objetivo de identificar mutaciones que confieren resistencia. Al caracterizar las mutaciones encontraron 120 determinantes de resistencia con las cuales fue posible predecir el 89.2% de los fenotipos, con una sensibilidad de 92.3% (IC 95% 90.7–93.7) y especificidad de 98.4% (98.1–98.7). Los autores sugieren la integración de la secuenciación en el diagnóstico de TB y un catálogo más amplio de mutaciones determinantes de resistencia, las cuales remplazará las pruebas fenotípicas de susceptibilidad con resultados más confiables y rápidos.

4. JUSTIFICACIÓN.

En 1993 la OMS declaró la TB como una emergencia de salud a nivel mundial, siendo la principal causa de muerte por un agente infeccioso único. Los objetivos principales de la estrategia para terminar con la TB son reducir la incidencia, el número anual de muertes por TB y el porcentaje de hogares afectados que enfrentan gastos catastróficos debido a la enfermedad (Global TB report, 2020).

En 1995 se estableció el "Consortio Mexicano contra la Tuberculosis" integrado por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y el Instituto Nacional de Salud Pública (<https://www.consorciomexicanotb.com/>), con el propósito de implementar las recomendaciones internacionales para el control de la enfermedad enfocadas en la mejora de la prevención, diagnóstico y tratamiento. De 1995-2010 el consorcio realizó un estudio prospectivo de base poblacional en la jurisdicción sanitaria de Orizaba, Veracruz. En el estudio se incluyeron todas las personas residentes en el área, con tos de más de dos semanas de evolución y con baciloscopia o cultivo positivo de *M. tuberculosis* en expectoración, durante los años de estudio se han realizado múltiples mediciones en esta cohorte. En el primer estudio retrospectivo realizado entre 1991-1994, se indicó una tasa alta (42.6%) de TB y falla a tratamiento posiblemente resultados de DR-TB (García-García et al., 1999). Entre 1995-1996 se tipificaron los aislados de *M. tuberculosis* de la cohorte de pacientes por RFLP-*IS6110*, al analizar el conglomerado más grande se demostró la importancia de las redes sociales donde un grupo de individuos contribuyeron desproporcionadamente a la transmisión de la TB y la progresión rápida a enfermedad (García-García et al., 2000). También se ha estudiado el impacto de la DM sobre las tasas de TB en la población entre 1995-2003, los resultados indicaron que la tasa de TB incrementa en 6.8 (IC 95% 5.7-8.2, $P < 0.0001$) veces en pacientes con DM debido a reactivación y transmisión reciente de la enfermedad (Ponce-De-Leon et al., 2004).

Así mismo, se ha determinado el impacto de la DR-TB sobre el resultado clínico y transmisión de la TB, entre 1995-1999 los resultados evidenciaron que la cronicidad de la TB (OR 4.8, IC 95% 2.7-8.4, $P < 0.001$), la edad >40 años (OR 1.9, IC 95% 1.1-3.2, $P = 0.02$) y ser de origen indígena (OR 0.3, IC 95% 0.13-0.75, $P = 0.01$) fueron factores asociados con la resistencia, en tanto que la MDR (RR 2.5, IC 95% 1.02-6.16, $P = 0.04$) y la infección por VIH (RR 31.3, IC 95% 11.6-84.8, $P < 0.001$) estuvieron asociados con la

mortalidad, el trabajo concluye que la resistencia tiene un impacto negativo sobre el control de la TB (M. L. García-García et al., 2000).

Comprender la dinámica de la transmisión de la TB es clave para prevenir la propagación continua de la enfermedad. El uso de pruebas moleculares para la tipificación de *M. tuberculosis* como 24-loci MIRU-VNTR, aporta información sobre la diversidad genética que en combinación con datos epidemiológicos es posible establecer asociaciones entre sublinajes, resistencia y características clínicas; la detección de posibles brotes de TB, distinguir entre la reactivación de una infección latente adquirida históricamente y la TB resultante de una transmisión reciente. Más recientemente, el uso de la secuenciación genómica en poblaciones con aislados que comparten altos grados de parentesco genotípico permite mayor resolución sobre la dinámica de transmisión de la TB y la predicción *in silico* de la resistencia (Guthrie et al., 2019). Se ha descrito la utilidad de la búsqueda activa de casos tipificados con MIRU-VNTR junto con el análisis de WGS para identificar entornos de transmisión constante y emprender acciones de salud pública (Black et al., 2018).

5. HIPÓTESIS.

El análisis de la estructura poblacional mediante la identificación de las secuencias repetidas en tándem intercaladas y el número de SNP en el genoma de *M. tuberculosis* permitirán conocer la diversidad genética y la dinámica de la transmisión de los aislados de la cohorte de pacientes con TBP en Orizaba, Veracruz.

6. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la estructura poblacional de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* de una cohorte de pacientes con TBP.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Genotipificar los aislados de *M. tuberculosis* de una cohorte de base poblacional de pacientes con TBP con 24-loci MIRU-VNTR.
2. Determinar la prevalencia de los distintos sublinajes de *M. tuberculosis*, presentes en la población de pacientes con TBP.
3. Conocer la filogenia de *M. tuberculosis* mediante los resultados obtenidos con la genotipificación con 24-loci MIRU-VNTR.
4. Determinar la asociación entre sublinajes de *M. tuberculosis* y el perfil de resistencia.
5. Determinar la asociación entre sublinajes de *M. tuberculosis* y características clínicas de la población.
6. Evaluar la efectividad del método de genotipificación 24-loci MIRU-VNTR.
7. Identificar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).
8. Determinar la clonalidad de conglomerados.
9. Identificar las mutaciones asociadas a resistencia.
10. Trazar la dinámica de la transmisión de los aislados conglomerados por medio del número de los SNP observados.

8. METODOLOGÍA.

8.1 Diseño del estudio.

Retrospectivo y observacional.

8.2 Población del estudio.

Se analizaron 788 aislados de *M. tuberculosis* de pacientes reclutados de la cohorte poblacional de pacientes diagnosticados con TBP, en las 12 Jurisdicciones Sanitarias del municipio de Orizaba, en el estado de Veracruz, México durante el período del 1 de agosto de 1997 al 30 de abril de 2010.

Los aislados fueron obtenidos del banco de cepas del laboratorio de microbiología clínica del INCMNSZ. Los aislados fueron descongelados y cultivados en medio MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) en el equipo semiautomatizado Bactec MGIT 960[®] (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA), una vez que el equipo los detectó positivos se realizó la propagación del cultivo en 20mL de caldo Middlebrook 7H9 (BD) suplementado con Ácido Oleico, Albumina, Dextrosa y Catalasa (OADC, BD). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera al 7.5% de CO₂ durante 45 días. Se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen para verificar la pureza del cultivo.

8.3 Extracción de ADN.

El ADN se extrajo con el método de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio). Brevemente, 1.5mL del cultivo de propagación en crecimiento logarítmico fue inactivado a 80°C por 20 min. Posteriormente, se utilizó lisozima para lisar las células y se extrajo el ADN de alto peso molecular con fenol-cloroformo (van Soolingen et al., 2003).

8.4 Tipificación por 24-loci MIRU-VNTR.

La tipificación de los aislados de *M. tuberculosis* se realizó con el Kit de tipificación MIRU-VNTR (GenoScreen, Lille, Francia) según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos fueron separados por electroforesis capilar en un secuenciador ABI3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), se incluyó el estándar de tamaño GeneScan 1200 LIZ (Applied Biosystems) para determinar el peso de los fragmentos. El tamaño de

los fragmentos y el número de repetidos se determinó con el software GeneMapper versión 4.1 (Applied Biosystems).

8.5 Análisis de datos de genotipificación.

La genotipificación por *24-locus* MIRU-VNTR generó un patrón numérico para cada aislado, el cual fue comparado en la base de datos internacional www.miru-vntrplus.com. Esta base cuenta con 186 cepas de referencia que representan los principales linajes y sublinajes. Los sublinajes fueron asignados aplicando un valor de similitud de 0.37 que indica al menos 15/24 alelos iguales con respecto a la cepa de referencia. La asignación se verificó con la construcción de un filograma. Los patrones de MIRU-VNTR fueron analizados en el programa BioNumerics® v7.6 (Applied Maths, St-Martens-Latem, Belgica). Para confirmar la filogenia de los aislados, se realizó el método de agrupamiento de pares no ponderado con media aritmética (UPGMA) y un árbol recubridor mínimo (MST, por sus siglas en inglés).

8.6 Determinación del índice de transmisión reciente.

Se definió como conglomerado a los aislados con un patrón idéntico. Los aislados con ausencia de un alelo o alelos dobles se analizaron tomando en cuenta 23/24 marcadores. Se calculó el índice de transmisión reciente (RTI) con la fórmula $RTI_{n-1} = (nc - c)/n$, donde n es el número total de casos estudiados, nc es el número total de aislados en conglomerado y c es el número de genotipos representados por al menos dos casos.

8.7 Evaluación del método de tipificación y diversidad alélica.

Se determinó la variabilidad alélica para cada uno de los locus ($h = 1 - \sum x_i^2$). Además, se calculó el Índice de Discriminación Hunter-Gaston (HGDI), donde N es el número total de aislados en la muestra, s es el número total de tipos descritos, y n_j es el número de aislados que pertenecen j th tipo (Hunter and Gaston, 1988; Torkaman MR et al., 2014).

$$HGDI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

8.8 Definiciones para el análisis de asociación entre sublinajes y características clínicas.

Se consideraron las siguientes variables sociodemográficas: sexo, edad, escolaridad, vivienda con piso de tierra, localidad de residencia rural, distancia al centro de salud más cercano, acceso a seguridad social, consumo de alcohol, tabaco y drogas ilícitas. Comorbilidades como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e infección por VIH. La información sobre la presencia de Bacilos Alcohol Ácido Resistentes (BAAR) en muestras de expectoración, la cual se clasificó con una cruz (1-9 bacilos en 100 campos observados), dos cruces (1-9 bacilos en 10 campos observados) y tres cruces (1-9 bacilos por campo observado) (Standards, 2000). Las variables sobre la presentación clínica, fueron utilizadas cada una de manera dicotómica: fiebre, hemoptisis y presencia de cavitaciones. Índice de masa corporal (IMC) y días entre el inicio de síntomas y el inicio de tratamiento. Utilizamos las definiciones operativas del programa (NOM-006-SSA) para los resultados del tratamiento. *Curado*, caso que completó el tratamiento y desaparecieron los signos y síntomas, o que tiene baciloscopia o cultivo negativo al final del tratamiento. *Fracaso*, fue la persistencia de baciloscopia o cultivo positivo después de cinco o más meses de iniciado el tratamiento. *Término de tratamiento*, quien completó el esquema de tratamiento, desaparecieron signos clínicos y no se realizó baciloscopia o cultivo al finalizar tratamiento. Para quienes no terminaron el tratamiento fueron clasificados en las siguientes dos categorías: *Abandono*, quien interrumpió el tratamiento por dos meses consecutivos. *Defunción durante el tratamiento*, persona que falleció debido a cualquier otra causa durante el tratamiento.

La variable linaje de acuerdo a la genotipificación por MIRU-VNTR, se operacionalizó de manera desagregada, con cada uno de los sublinajes identificados más los desconocidos, y en tres categorías, de acuerdo a la frecuencia de cada uno. La variable desagregada considera las categorías: Beijing, Cameroon, EAI, Ghana, Haarlem, LAM, S, TUR, UgandaI, X y desconocido. La variable agregada considera las categorías: Haarlem, LAM y sublinajes distintos a Haarlem y LAM.

8.9 Análisis estadístico.

Utilizamos la prueba chi cuadrada de Pearson para variables dicotómicas, prueba binomial para variables categóricas y prueba de Kruskal-Wallis para variables cuantitativas. Se ajustaron modelos de regresión logística no condicionales para explicar el fracaso al tratamiento y la presencia de cavitaciones en radiografía. Para explicar el fracaso al tratamiento se realizaron dos modelos, uno incluyó la variable resistencia al menos a un fármaco y otro que incluyó MDR. Para incluir variables en un modelo multivariado se consideraron aquellas que en el análisis bivariado tuvieron valores de $p \leq 0.20$ y con plausibilidad biológica. Estimamos la razón de momios ajustada (RMA) y los intervalos de confianza (IC) del 95%, e identificamos las co-variables que se asociaron independientemente con cada resultado. Los análisis fueron realizados con el uso del programa estadístico STATA[®] v.15 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

8.10 Secuenciación de genoma completo (WGS) y análisis de secuencias.

Se secuenciados 12 aislados seleccionados de acuerdo al patrón de MIRU-VNTR, las librerías fueron preparadas utilizando el kit TrueSeq DNA PCR-Free (Illumina, San Diego, CA, USA) y corridas en el secuenciador Illumina NovaSeq 6000 (Illumina). Se generaron lecturas 2×150 pareadas con orientación forward-reverse (paired-end reads). El análisis de las secuencias se realizó mediante tres programas. 1. En el programa BioNumerics[®] v7.6 (Applied Maths), las lecturas se alinearon al genoma de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (GeneBank NC000962.3). Además, se llevó a cabo la detección de SNP y se realizó el análisis de conglomerados basados en la matriz de SNP relevantes, este programa incluye las regiones PE/PPE en el análisis. 2. Los genomas fueron analizados con MTBseq pipeline, brevemente: las lecturas fueron mapeadas con *M. tuberculosis* H37Rv (NC000962.3) y se extrajeron las variantes (SNP, inserciones y deleciones) con una cobertura mínima de cuatro lecturas en ambas orientaciones, con una puntuación Phred de ≥ 20 y una frecuencia de variantes mínima del 75%, este análisis excluye las regiones repetitivas del genoma y regiones PE/PPE. Los aislados se clasificaron en linajes basado en SNP filogenéticos (Merker et al., 2017). Asimismo, para determinar las cadenas de transmisión se realizó un análisis comparativo para el agrupamiento de muestras según el número y posición de SNP con un threshold de ≤ 12 SNP al miembro del grupo más cercano

(Kohl et al., 2018). 3. Finalmente, utilizamos ResFinder v4.0 para detectar y confirmar mutaciones que confieren resistencia a fármacos (Bortolaia et al., 2020).

9. RESULTADOS.

8.1 Características generales de la población.

Un total de 755 aislados de *M. tuberculosis* fueron recuperados y genotipificados por 24-*loci* MIRU-VNTR. En total, 442/755 (59%) fueron hombres con una media de edad de 45 años (rango intercuartilar [IQR] 32-59), 507 (67%) pacientes tenían más de seis años de educación formal y 174 (23%) habitaban en casas con piso de tierra. La co-morbilidad con DM2 se reportó en 250 (33%) pacientes. El estatus de VIH se conocía en 739/755 (98%) pacientes, de los cuales 13/739 (2%) fueron positivos. Además, 688/755 (91%) fueron reportados como casos nuevos de TB y un total de 66/755 (9%) fueron tratados por segunda vez. La resistencia a cualquier fármaco se presentó en 116/612 (19%) aislados y 20/612 (3.2%) fueron MDR. Los hallazgos clínicos más comunes fueron fiebre 531/752 (71%), hemoptisis 250/753 (33%) y cavitaciones en 282/626 (45%). La cura se registró en 532/755 (70%) pacientes **Tabla 2.**

Tabla 2. Características de los pacientes con TBP de Orizaba, Veracruz.

| Variable | Total de casos | Proporción de muestra |
|---|--------------------|-----------------------|
| | n/total (%) | n/total (%) |
| Hombre | 654/1132 (58.0) | 442/755 (59.0) |
| Edad (años) [mediana (RIQ)] | 47 (32-60) | 45 (32-59) |
| >6 años de educación formal | 789/1131 (70.0) | 507/754* (67.0) |
| Piso de tierra | 218/1132 (19.0) | 174/755 (23.0) |
| Localidad rural | 134/1002 (13.0) | 99/732* (14.0) |
| Distancia al centro de salud más cercano (metros) [mediana (RIQ)] | 698 (412-1,073) | 708 (414-1099) |
| Acceso a seguridad social | 400/1132 (35.0) | 254/755 (34.0) |
| Alguna vez ha consumido alcohol | 468/1130 (41.0) | 330/753* (44.0) |
| Alguna vez ha fumado | 222/1129 (20.0) | 164/753* (22.0) |
| Alguna vez ha consumido drogas ilícitas | 50/1131 (4.0) | 35/754* (5.0) |
| Sin hogar o residencia en instituciones | 33/1129 (3.0) | 20/754* (3.0) |
| Diabetes mellitus tipo 2 | 386/1132 (34.0) | 250/755 (33.0) |
| Infección por VIH | 19/1095 (2.0) | 13/739* (2.0) |
| Paciente nuevo | 934/1131 (83.0) | 688/754* (91.0) |
| Tres o más cruces vs menos de tres cruces primer BAAR o en el BAAR diagnóstico con mayor número de cruces | 281/1,132 (24.8) | 211/755* (28.0) |
| Resistencia a al menos un fármaco | 176/826 (21.0) | 116/612* (19.0) |
| MDR | 47/826 (6.0) | 20/612* (3.0) |
| Fiebre | 744/1129 (66.0) | 531/752* (71.0) |
| Hemoptisis | 352/1126 (31.0) | 250/753* (33.0) |
| Cavidades en rayos X | 398/927 (43.0) | 282/626* (45.0) |
| IMC [mediana (RIQ)] | 21.2 (18.6-24.0) | 20.9 (18.4-23.8) |
| Días entre el inicio de síntomas e inicio de tratamiento [mediana (RIQ)] | 104 (63-186) | 105 (67-182) |
| Resultado de tratamiento | | |
| Abandono | 86/1132 (8.0) | 49/755 (6.0) |
| Cura | 756/1132 (67.0) | 532/755 (70.0) |
| Término de tratamiento | 136/1132 (12.0) | 93/755 (12.0) |
| Fracaso | 26/1132 (2.0) | 20/755 (3.0) |
| Defunción durante tratamiento | 49/1132 (4.0) | 26/755 (3.0) |
| Sin información | 79/1132 (7.0) | 35/755 (5.0) |
| Fracaso al tratamiento | | |
| Fracaso | 26/918 (2.8) | 20/645* (3.1) |
| Cura o término de tratamiento | 892/918 (97.2) | 625/645* (96.9) |
| No éxito de tratamiento | | |
| Abandono, fracaso o defunción durante tratamiento | 161/1,053 (15.3) | 95/720* (13.2) |
| Cura o término de tratamiento | 892/1,053 (84.7) | 625/720* (86.8) |
| Muerte durante tratamiento | | |
| Muerte | 49/1,053 (4.7) | 26/720* (3.6) |
| Cura, término de tratamiento, abandono o fracaso | 1,004/1,053 (95.4) | 794/720* (96.4) |

Abreviaciones: RIQ- rango intercuartilar; VIH- Virus de la inmunodeficiencia humana; BAAR- bacilo alcohol ácido resistente; IMC- Índice de masa corporal.

* Algunos números no suman el total del grupo, debido a que algunos valores estuvieron ausentes para la característica de algunos pacientes.

8.2 Diversidad genética de *M. tuberculosis*.

Se definió el sublinaje en 747/755 (98.9%) aislados de *M. tuberculosis*. El sublinaje más frecuente fue, Haarlem 419 (55.5%), seguido de LAM 163 (21.6%), Cameroon 49 (6.5%), UgandaI 28 (3.7%), Ghana 23 (3%), S 18 (2.4%), X 15 (2%), EAI 15 (2%), TUR 15 (2%) y Beijing 2 (0.2%), no fue posible determinar el sublinaje en ocho aislados (1.1%) y por ello se consideraron como desconocidos **Figura 5**.

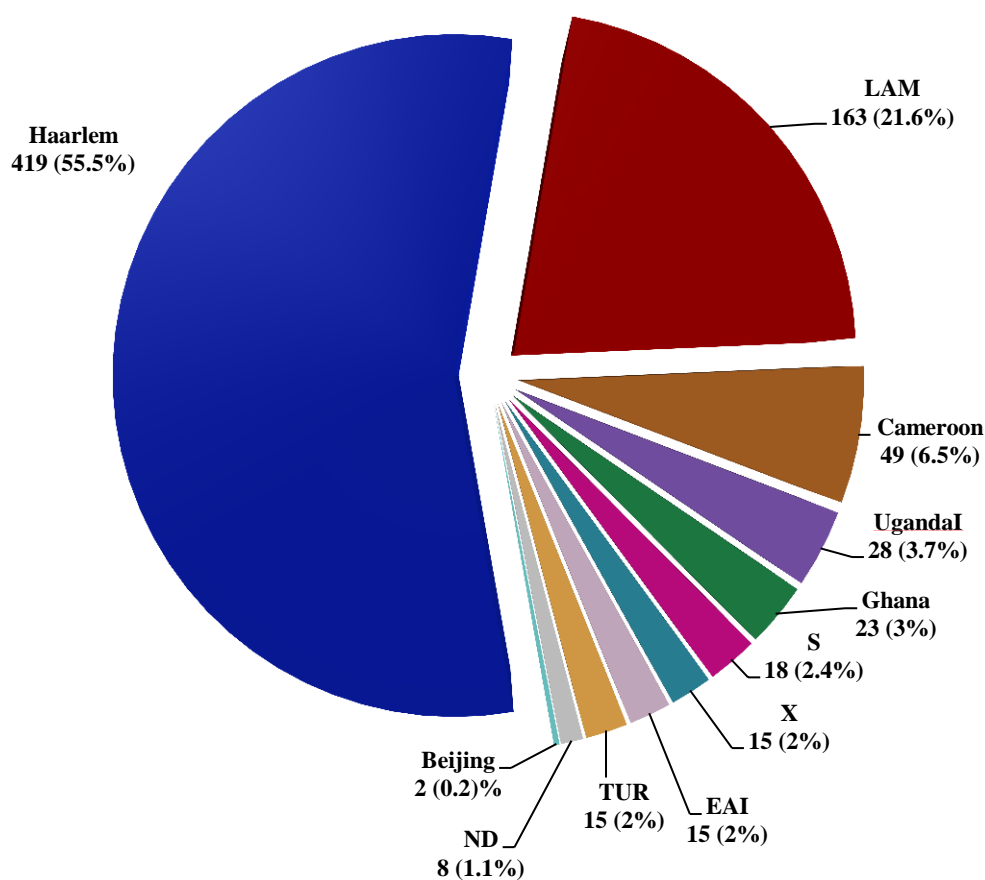


Figura 5. Proporción global de cada sublinaje de *M. tuberculosis*. Resultados del análisis de 755 aislados de *M. tuberculosis*, genotificados con el panel de 24-loci MIRU-VNTR. ND= no determinado.

En total 519/755 (68.7%) aislados se agruparon en 128 conglomerados y 236/755 (31.3%) mostraron patrones únicos **Figura 6**.

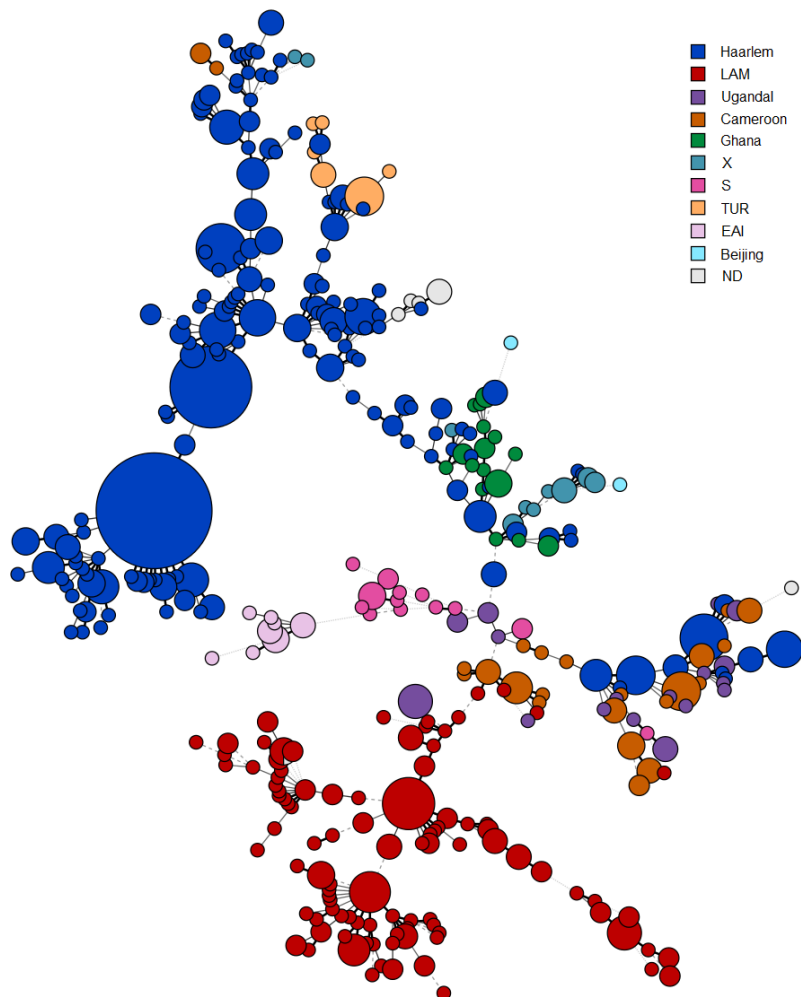


Figura 6. Árbol recubridor mínimo (Minimum spanning tree, MST). Árbol construido con los resultados de la genotipificación de los 755 aislados de *M. tuberculosis* de pacientes con TB pulmonar de Orizaba, Veracruz, con el panel de 24-loci MIRU-VNTR. El tamaño del nodo representa el número total de aislados con un mismo patrón de MIRU-VNTR. Los nodos más pequeños son aislados con patrones únicos, los nodos más grandes son aislados agrupados. El color del nodo indica el sublinaje al que pertenecen. La distribución de los sublinajes se realizó con el programa BioNumerics® v7.6.

La distribución de los sublinajes se muestra en la **Tabla 3**. El tamaño de los conglomerados tuvo un intervalo de 2-67 aislados con la siguiente distribución: conglomerados con 2 pacientes (n=63), con 3 (n=28), 4 (n=13), 5 (n=7), 6 (n=5), 7 (n=4), 8 (n=2), 9, 12, 13, 14, 33 y 67 (n=1).

Tabla 3. Distribución de los aislados en conglomerado y tamaño del conglomerado de acuerdo a los sublinajes (n=755).

| Linajes | Sublinajes | No. de aislados en conglomerado (%) | No. de conglomerados | Rango de tamaño de conglomerados | Patrones únicos |
|----------------|------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------------|-----------------|
| Euro-Americano | Haarlem | 318 (75.9) | 63 | 2 – 67 | 101 |
| | LAM | 95 (58.9) | 31 | 2 – 14 | 68 |
| | Cameroon | 36 (73.5) | 10 | 2 – 8 | 13 |
| | UgandaI | 17 (60.7) | 6 | 2 – 6 | 11 |
| | Ghana | 12 (52) | 5 | 2 – 4 | 11 |
| | S | 8 (44.4) | 3 | 2 – 4 | 10 |
| | X | 9 (60) | 4 | 2 – 3 | 6 |
| | Tur | 11 (73.3) | 2 | 3 – 8 | 4 |
| Indo-Oceánico | EAI | 10 (66.7) | 3 | 3 – 4 | 5 |
| Este de Asia | Beijing | 0 | 0 | 0 | 2 |
| No determinado | - | 3 (37.5) | 1 | 3 | 5 |
| Total | - | 519 | 128 | 2-67 | 236 |

El RTI durante el periodo de estudio, fue de 51.7%.

8.3 Perfil de resistencia.

En 612/755 (81%) de los aislados de *M. tuberculosis* se realizaron pruebas de susceptibilidad a STR, INH, RIF y EMB. Un total de 496/612 (81%) aislados fueron pansusceptibles. La resistencia global a uno o más fármacos probados fue de 19% (116/612). La resistencia a INH fue la más frecuente, encontrándose en 61/612 (10%) aislados, seguido de STR en 10/612 (1.6%), y RIF en 5/612 (0.8%). La polirresistencia (INH+STR) se presentó en 19/612 (3.1%) aislados. El perfil MDR (resistencia al menos a INH + RIF) se encontró en 20/612 (3.2%). Un solo aislado presentó resistencia a los cuatro fármacos estudiados.

8.4 Resistencia primaria y adquirida.

Encontramos 116 aislados resistentes al menos a un fármaco, 95/116 (81.9%) fueron casos de diagnóstico nuevo (resistencia primaria) y 21/116 (18.1%) casos con tratamiento previo (resistencia adquirida). Por otro lado, observamos que 83/116 (71.5%) aislados resistentes se encontraron en conglomerados, y 33/116 (28.4%) presentaron patrones

únicos. De los aislados en conglomerados, 73/83 (88%) fueron casos diagnosticados nuevos y 10/83 (12%) fueron pacientes con tratamiento previo. En los aislados con patrones únicos encontramos, 22/33 (66.7%) casos diagnosticados como nuevos y 11/33 (33.3%) fueron de pacientes tratados previamente **Figura 7**.

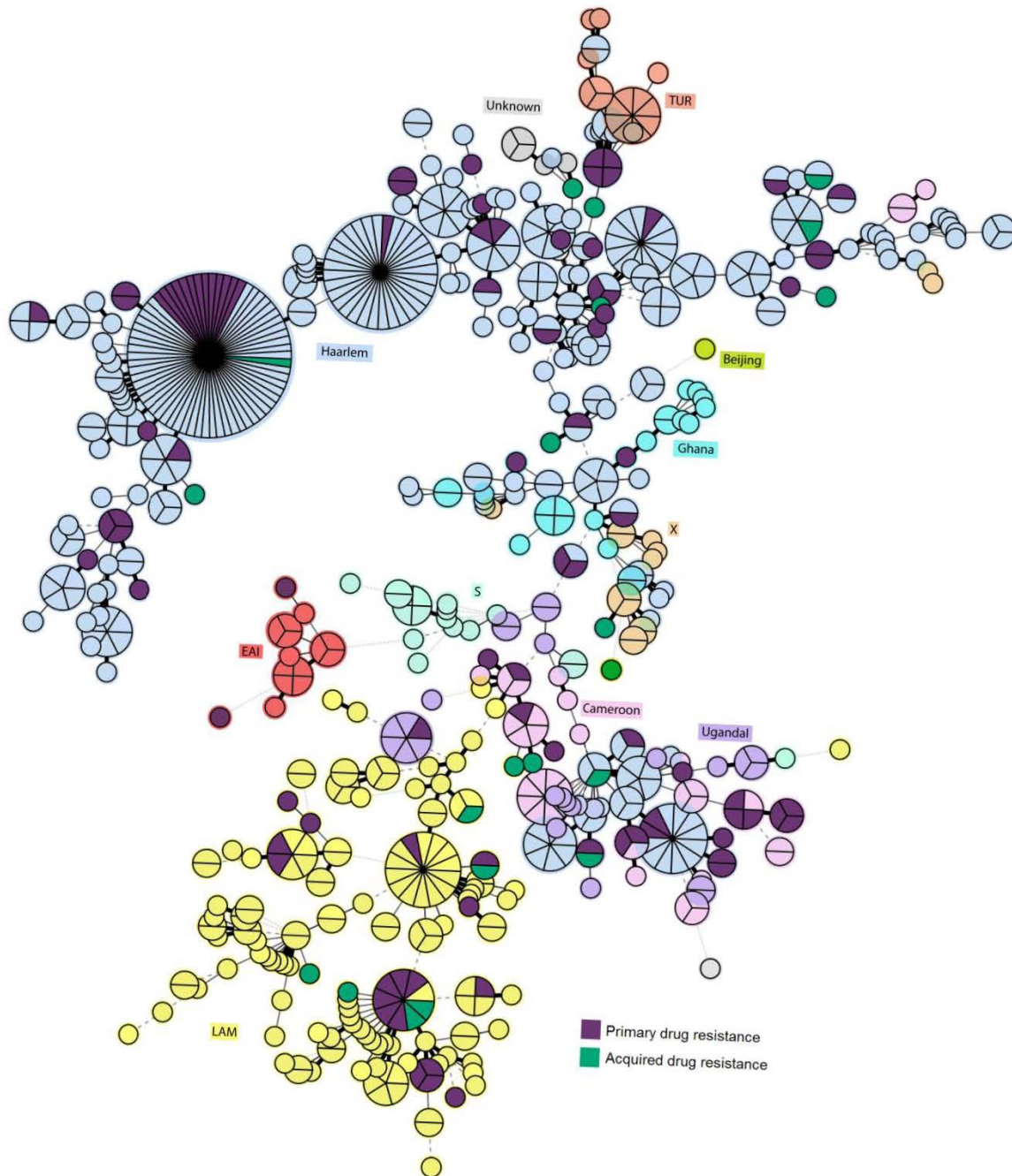


Figura 7. Árbol construido con los resultados del sublinaje y perfil de resistencia de los aislados de *M. tuberculosis*. La distribución de la resistencia primaria y adquirida se realizó con el programa BioNumerics® v7.6.

Mediante regresión logística ajustada no condicional se identificaron las variables asociadas a pertenecer a conglomerados, estratificamos por resistencia al menos a un fármaco anti-TB. Los modelos se ajustaron por el efecto de edad y sexo. Observamos que los pacientes con DR-TB quienes tenían diagnóstico nuevo tuvieron tres veces mayor probabilidad de pertenecer a conglomerados (RMa 4.05, IC 95% 1.5-11.2, p= 0.007) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Resultados entre la asociación de pertenecer a un conglomerado y la resistencia al menos a un fármaco.

| Variable | Todos (n= 755) | | Pansusceptibles (n= 496) | | DR-TB (n= 116) | |
|----------------|------------------|----------------|--------------------------|----------------|------------------------|----------------|
| | RMa (IC 95%) | Valor de p^* | RMa (IC 95%) | Valor de p^* | RMa (IC 95%) | Valor de p^* |
| Sexo (hombre) | 0.95 (0.7-1.3) | 0.726 | 1.18 (0.8-1.8) | 0.405 | 0.48 (0.2-1.2) | 0.123 |
| Edad (años) | 0.99 (0.97-0.99) | 0.001 | 0.99 (0.9-1.0) | 0.054 | 0.98 (0.9-1.0) | 0.260 |
| Paciente nuevo | 1.12 (0.6-1.9) | 0.686 | 0.66 (0.3-1.4) | 0.285 | 4.05 (1.5-11.2) | 0.007 |

* Regresión logística ajustada no condicional. $p < 0.05$ valor estadísticamente significativo
DR-TB= tuberculosis drogo resistente; RMa =razón de momios ajustada; IC= Intervalo de confianza.

8.5 Tuberculosis MDR y factores asociados.

Para identificar las variables asociadas con MDR-TB, se realizaron modelos de regresión logística ajustada no condicional, estratificado por la pertenencia a conglomerados. Observamos que los pacientes con tratamiento previo, mostraron ocho veces más probabilidad de presentar MDR-TB (RMa 9.05, IC 95% 3.6-22.5, $p < 0.001$); además, esta probabilidad se incrementó en pacientes con aislados únicos (RMa de 21.56, IC 95% 3.5-134.3, $p = 0.001$), también observamos que los pacientes con aislados en conglomerados y además tratamiento previo, tuvieron seis veces más riesgo de presentar MDR-TB (RMa 6.85, IC 95% 2.2-21.0, $p = 0.001$) ajustado por sexo, edad y sublinaje. Así mismo, los pacientes con aislados en conglomerados y que pertenecían al sublinaje LAM, mostraron tres veces mayor probabilidad de presentar MDR-TB en comparación con los otros sublinajes (RMa 4.25, IC 95% 1.4-12.7, $p = 0.010$) ajustado por sexo, edad y tratamiento previo (**Tabla 5**).

Tabla 5. Variables asociadas a la MDR-TB, estratificadas por pertenencia a conglomerados.

| Variable | Todos (n= 612) | | Únicos (n= 177) | | Conglomerados (n= 435) | |
|-------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| | RMa (IC 95%) | Valor de p* | RMa (IC 95%) | Valor de p* | RMa (IC 95%) | Valor de p* |
| Sexo (hombre) | 1.03 (0.4-2.6) | 0.947 | 0.63 (0.1-3.9) | 0.620 | 1.13 (0.4-3.5) | 0.835 |
| Edad (años) | 0.99 (0.9-1.0) | 0.364 | 0.97 (0.9-1.0) | 0.357 | 0.99 (0.9-1.0) | 0.799 |
| Tratamiento previo | 9.05 (3.6-22.5) | <0.001 | 21.56 (3.5-134.3) | 0.001 | 6.85 (2.2-21.0) | 0.001 |
| LAM Vs otros sublinajes | 2.18 (0.8-5.7) | 0.109 | 0.31 (0.028-3.4) | 0.340 | 4.25 (1.4-12.7) | 0.010 |

* Regresión logística ajustada no condicional. p<0.05 valor estadísticamente significativo
RMa =razón de momios ajustada; IC= Intervalo de confianza.

8.6 Distribución de la transmisión de resistencia primaria.

En la **Figura 8**, se observan los aislados resistentes en conglomerados. La clona 1, incluyó 14 aislados de sublinaje Haarlem con múltiples patrones de resistencia, nueve aislados resistentes a INH, diagnosticados entre 2001 y 2006, dos MDR diagnosticados en 2002, dos resistentes a STR diagnosticados en 1998 y un aislado polirresistente diagnosticado en 2006. La clona 2 incluyó ocho aislados de sublinaje LAM, seis de ellos presentaron resistencia a INH y dos fueron MDR-TB estos últimos pertenecían a pacientes con tratamiento previo y fueron aislados entre 1999-2009. La clona 3, incluyó tres aislados de sublinaje LAM, dos resistentes a INH y uno MDR-TB, fueron aislados entre 2001-2002. La clona 4, incluyó cuatro aislados de sublinaje Haarlem resistentes a INH, fueron aislados entre 1998-2009. La clona 5, incluyó tres aislados de sublinaje Haarlem con resistencia a STR+INH, aisladas en 1998 y 2008. La clona 6, incluyó tres aislados de sublinaje Cameroon con resistencia a INH, aislados entre 1999-2008. La clona 7 incluyó tres aislados de sublinaje Cameroon, dos con resistencia a INH y una con resistencia a todos los fármacos probados y fueron aislados entre 2003-2007. De manera interesante, observamos nueve conglomerados con dos aislados resistentes diagnosticados en el mismo año o en años cercanos.

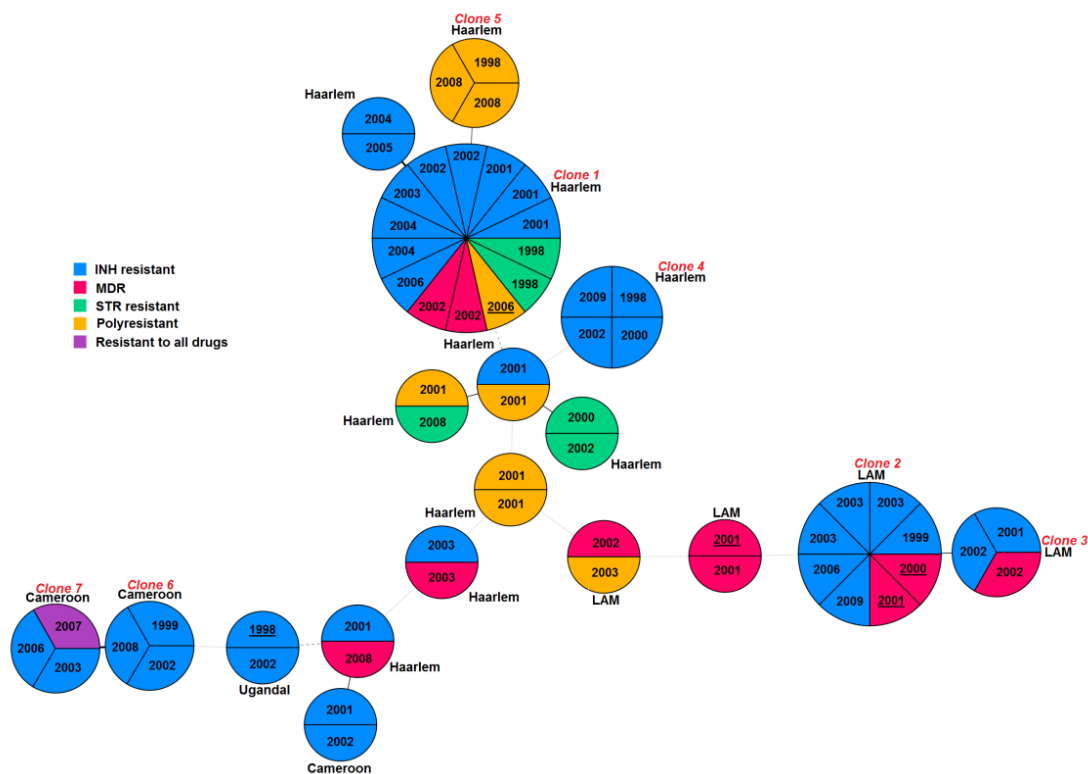


Figura 8. Resultados de la distribución de resistencia primaria, resistencia adquirida y sublinajes asignados entre los aislados en conglomerados. La distribución de resistencia en conglomerados se realizó con el programa BioNumerics® v7.6.

8.7 Diversidad alélica y poder de la prueba MIRU-VNTR.

Analizamos la diversidad alélica de los 24-loci de forma individual **Tabla 6**. Los loci con mayor diversidad fueron: 4056-QUB26 ($h=0.84$), 2163b-QUB11b ($h=0.79$) y 424-Mtub04 ($h=0.72$). Los loci con menor diversidad fueron: 154-MIRU02 ($h=0.09$), 4348-MIRU39 ($h=0.05$) y 2687-MIRU24 ($h=0.04$). Además, observamos en el locus 580-MIRU04, 19 aislados con un alelo pequeño (353pb). También se observó la presencia de 36 alelos dobles en 15 locus distintos, principalmente en 960-MIRU10 ($n=5$) y 2163b-QUB11b ($n=5$). En los locus 960-MIRU10 ($n=15$), 4052-QUB26 ($n=4$), 577-ETR-C ($n=3$), 2163b-QUB11b ($n=1$), y 2531-MIRU23 ($n=1$), hubo ausencia de alelos.

Tabla 6. Resultados de la diversidad alélica (h) para el panel de 24 *loci* MIRU-VNTR.

| MIRU-VNTR locus ^a | Alias | Frecuencia del número de copias de los alelos | | | | | | | | | | | | Índice de diversidad alélica (h) | | | |
|------------------------------|---------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|---|----|--------------------------------------|----|----|------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 3s | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | 11 | 12 | |
| 2687 | MIRU24 | 739 | 16 | | | | | | | | | | | | | | 0.04 |
| 4348 | MIRU39 | 13 | 736 | 5 | | | | | | | | | | | | | 0.05 |
| 154 | MIRU02 | 32 | 719 | 4 | | | | | | | | | | | | | 0.09 |
| 2059 | MIRU20 | 53 | 701 | | | | | | | | | | | | | | 0.13 |
| 580 | MIRU04 | 7 | 697 | 17 | 19 | | 14 | | | | | | | | | | 0.15 |
| 3007 | MIRU27 | 5 | 13 | 685 | | 50 | | | | | | | | | | | 0.17 |
| 2461 | ETRB | 66 | 661 | 9 | | 1 | | 14 | | | | | | | | | 0.23 |
| 3192 | MIRU31 | | 34 | 637 | | 73 | 9 | 1 | | | | | | | | | 0.28 |
| 3171 | Mtub34 | 18 | 70 | 606 | | 6 | 54 | 1 | | | | | | | | | 0.34 |
| 2347 | Mtub29 | | 143 | 19 | | 584 | 8 | 1 | | | | | | | | | 0.37 |
| 2996 | MIRU26 | 2 | 17 | 47 | | 60 | 541 | 79 | 4 | 1 | 1 | | | | | | 0.46 |
| 1644 | MIRU16 | 63 | 107 | 527 | | 55 | 3 | | | | | | | | | | 0.48 |
| 3690 | Mtub39 | 24 | 173 | 511 | | 12 | 20 | 9 | 1 | 2 | | | | | | | 0.49 |
| 2165 | ETRA | 1 | 5 | 271 | 451 | 23 | | 1 | | | | | | | | | 0.51 |
| 577 | ETRC | | 18 | 401 | | 325 | 6 | | | | 1 | | | | | | 0.53 |
| 1955 | Mtub21 | 21 | 199 | 445 | | 69 | 3 | 2 | | 1 | | 9 | 3 | 1 | | | 0.57 |
| 2531 | MIRU23 | 3 | 1 | 140 | | 9 | 404 | 181 | 8 | 7 | | 1 | | | | | 0.62 |
| 4156 | QUB4156 | 33 | 187 | 426 | | 7 | 1 | | | | | | | | | | 0.62 |
| 2401 | Mtub30 | 151 | 186 | 11 | | 392 | 15 | | | | | | | | | | 0.63 |
| 960 | MIRU10 | 1 | 9 | 224 | | 219 | 278 | 3 | 1 | | | | | | | | 0.69 |
| 802 | MIRU40 | 155 | 114 | 350 | | 102 | 17 | 7 | 1 | 6 | 1 | | | | | | 0.70 |
| 424 | Mtub04 | 114 | 330 | 94 | | 168 | 47 | 2 | | | | | | | | | 0.72 |
| 2163b | QUB11b | 2 | 145 | 106 | | 227 | 172 | 65 | 5 | 14 | 13 | | | | | | 0.79 |
| 4052 | QUB26 | 1 | 9 | 8 | 32 | 166 | 167 | 109 | 127 | 73 | 53 | 3 | 1 | | | | 0.84 |

^a MIRU-VNTR *loci* su localización en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

3s= alelo pequeño

El HGDI fue de 0.98 con la tipificación por 24-*loci* MIRU-VNTR.

8.8 Características clínicas asociadas por linaje.

El análisis de datos reveló que el sublinaje Haarlem presentó la mayor proporción (318/419, 75.9%) de pacientes en conglomerados. Los pacientes con aislados de sublinaje Cameroon tardaron más días entre el inicio de síntomas e inicio de tratamiento (mediana

129, RIQ 83-198). Los pacientes con aislados de sublinaje Ghana presentaron hemoptisis (11/23, 47.8%) con mayor frecuencia. Los aislados de sublinaje EAI fue más frecuente en hombres (12/15, 80.0%), presentaron DM2 (10/15, 66.7%) y habían fumado alguna vez (7/15, 46.7%). Los pacientes con sub-linaje Beijing fueron de edad avanzada (mediana 59 años, RIQ 57-60), uno de ellos tenía VIH (1/2, 50%), y el otro tenía DM2, este aislado de *M. tuberculosis* fue también MDR (1/2, 50%), ambos mostraron un IMC mayor (mediana 25.4, RIQ 21.6-29.3), en comparación con el resto de pacientes con otros sublinajes. **Tabla 7.**

Tabla 7. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con TB pulmonar de la cohorte en Orizaba, Veracruz, de 1997-2010, según el sublinaje determinado por el panel 24-*loci* MIRU-VNTR.

| Variable | Total | Haarlem | LAM | Cameroon | UgandaI | Ghana | S | X | TUR | EAI | Beijing | Desconocido | Valor p* | |
|---|------------------|-----------------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------------|------------------|------------|-------|
| | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | | |
| Hombre | 442/755 (58.5) | 257/419 (61.3) | 81/163 (49.7) | 30/49 (61.2) | 21/28 (75.0) | 9/23 (39.1) | 12/18 (66.7) | 7/15 (46.7) | 8/15 (53.3) | 12/15 (80.0) | 0/2 (0.0) | 5/8 (62.5) | 0.023 | |
| Edad (años) [mediana (RIQ)] | 45 (32-59) | 45 (33-59) | 43 (30-55) | 38 (24-53) | 45 (29-58) | 58 (34-70) | 46 (38-59) | 56 (32-77) | 38 (29-54) | 53 (41-64) | 59 (57-60) | 45 (27-62) | 0.040 | |
| >6 años de educación formal | 507/754 (67.2) | 277/418 (66.3) | 115/163 (70.6) | 26/49 (53.1) | 20/28 (71.4) | 19/23 (82.6) | 6/419 (1.4) | 5/18 (27.8) | 4/15 (26.7) | 9/15 (60.0) | 8/15 (53.3) | 2/2 (100) | 6/8 (75.0) | 0.264 |
| Piso de tierra | 174/755 (23.1) | 88/419 (21.0) | 44/163 (27.0) | 9/49 (18.4) | 9/28 (32.1) | 3/21 (14.3) | 2/18 (11.1) | 5/15 (33.3) | 4/15 (26.7) | 4/15 (26.7) | 2/14 (13.3) | 0/2 (0.0) | 3/8 (37.5) | 0.703 |
| Localidad rural | 99/732 (13.5) | 47/409 (11.5) | 30/159 (18.9) | 3/47 (6.4) | 5/26 (19.2) | 6/74 (8.1) | 2/18 (11.1) | 4/15 (26.7) | 4/15 (26.7) | 2/14 (14.3) | 1/15 (6.7) | 0/1 (0.0) | 2/7 (28.6) | 0.251 |
| Distancia al centro de salud más cercano (metros) [mediana (RIQ)] | 708 (414-1099) | 685 (404-1025) | 775 (432-1184) | 735 (476-1044) | 760 (324-1449) | 674 (267-1130) | 566 (471-861) | 899 (519-1413) | 808 (484-1432) | 1045 (609-1109) | 388 (354-422) | 1504 (853-2094) | 0.154 | |
| Acceso a seguridad social | 254/755 (33.6) | 152/419 (36.3) | 48/163 (29.5) | 12/49 (24.5) | 10/28 (35.7) | 9/23 (39.1) | 4/18 (22.2) | 5/15 (33.3) | 5/15 (33.3) | 7/15 (46.7) | 1/2 (50.0) | 1/8 (12.5) | 0.549 | |
| Alguna vez ha consumido alcohol | 330/753 (43.8) | 194/417 (46.5) | 64/163 (39.3) | 22/49 (44.9) | 17/28 (60.7) | 7/23 (30.4) | 8/18 (44.4) | 2/15 (13.3) | 6/15 (40.0) | 8/15 (53.3) | 0/2 (0.0) | 2/8 (25.0) | 0.084 | |
| Alguna vez ha fumado | 164/753 (21.8) | 106/417 (25.4) | 22/163 (13.5) | 10/49 (20.4) | 5/28 (17.9) | 8/23 (34.8) | 2/7 (28.6) | 6/15 (40.0) | 1/15 (6.7) | 5/15 (33.3) | 7/15 (46.7) | 0/2 (0.0) | 2/8 (0.0) | 0.005 |
| Alguna vez ha consumido drogas ilícitas | 35/754 (4.6) | 19/418 (4.6) | 5/163 (3.1) | 3/49 (6.1) | 2/28 (7.1) | 0/23 (0.0) | 2/18 (11.1) | 0/15 (0.0) | 2/15 (13.3) | 2/15 (13.3) | 0/2 (0.0) | 2/8 (0.0) | 0.380 | |
| Sin hogar o residencia en instituciones | 20/754 (2.7) | 12/419 (2.9) | 4/162 (2.5) | 0/49 (0.0) | 1/28 (3.6) | 1/23 (4.3) | 0/18 (0.0) | 0/15 (0.0) | 1/15 (6.7) | 1/15 (6.7) | 0/2 (0.0) | 0/8 (0.0) | 0.903 | |
| Diabetes mellitus tipo 2 | 250/755 (33.1) | 138/419 (32.9) | 52/163 (31.9) | 12/49 (24.5) | 11/28 (39.3) | 7/23 (30.4) | 6/18 (33.3) | 6/15 (40.0) | 6/15 (40.0) | 10/15 (66.7) | 1/2 (50.0) | 1/8 (12.5) | 0.261 | |
| Infección por VIH | 13/739 (1.8) | 7/410 (1.7) | 3/163 (1.8) | 1/47 (2.1) | 1/27 (3.7) | 0/23 (0.0) | 0/16 (0.0) | 0/14 (0.0) | 0/15 (0.0) | 0/15 (0.0) | 1/2 (50.0) | 0/8 (0.0) | 0.001 | |
| Paciente nuevo | 688/754 (91.3) | 384/418 (91.9) | 145/163 (89.0) | 47/49 (95.9) | 26/28 (92.9) | 21/23 (91.3) | 18/18 (100.0) | 12/15 (80.0) | 14/15 (93.3) | 14/15 (93.3) | 1/2 (50.0) | 6/8 (75.0) | 0.179 | |
| Tres o más cruces vs menos de tres cruces primer BAAR o en el BAAR diagnóstico con mayor número de cruces | 211/755 (28.0) | 123/419 (29.4) | 47/163 (28.8) | 13/49 (26.5) | 10/28 (35.7) | 3/23 (13.0) | 5/18 (27.8) | 4/15 (26.7) | 1/15 (6.7) | 4/15 (26.7) | 0/2 (0.0) | 1/8 (12.5) | 0.530 | |
| Resistencia a al menos un fármaco | 117/612 (19.1) | 68/337 (20.2) | 25/131 (19.1) | 13/43 (30.2) | 5/22 (22.7) | 2/16 (12.5) | 0/14 (0.0) | 0/14 (0.0) | 0/12 (0.0) | 2/14 (14.3) | 1/2 (50.0) | 1/7 (14.3) | 0.121 | |
| MDR | 21/612 (3.4) | 8/337 (2.4) | 8/131 (6.1) | 2/43 (4.7) | 1/22 (4.55) | 0/16 (0.0) | 0/14 (0.0) | 0/14 (0.0) | 0/12 (0.0) | 0/14 (0.0) | 1/2 (50.0) | 1/7 (14.3) | 0.014 | |
| Fiebre | 531/752 (70.6) | 292/417 (70.0) | 114/162 (70.4) | 36/49 (73.5) | 23/28 (82.1) | 14/23 (60.9) | 11/18 (61.1) | 13/15 (86.7) | 12/15 (80.0) | 11/15 (73.3) | 1/2 (50.0) | 4/8 (50.0) | 0.580 | |
| Hemoptisis | 250/753 (33.2) | 141/417 (33.8) | 39/163 (23.9) | 19/49 (38.8) | 13/28 (46.4) | 11/23 (47.8) | 8/18 (44.4) | 7/15 (46.7) | 5/15 (33.3) | 7/15 (46.7) | 0/2 (0.0) | 0/8 (0.0) | 0.030 | |
| Cavidades en rayos X | 282/626 (45.1) | 152/344 (44.2) | 74/136 (54.5) | 11/40 (27.5) | 12/24 (50.0) | 8/19 (42.1) | 7/17 (41.2) | 3/12 (25.0) | 3/12 (25.0) | 9/13 (69.2) | 1/2 (50.0) | 2/7 (28.6) | 0.054 | |
| IMC [mediana (RIQ)] | 20.9 (18.4-23.8) | 20.5 (18.1-23.4) | 21.0 (18.9-24.1) | 20.3 (18.9-22.4) | 21.6 (18.7-24.1) | 22.7 (19.0-24.2) | 20.9 (18.0-24.1) | 23.0 (19.1-24.9) | 23.9 (22.2-25.7) | 22.1 (18.7-24.0) | 25.4 (21.6-29.3) | 21.3 (18.6-22.6) | 0.053 | |
| Días entre el inicio de síntomas e inicio de tratamiento [mediana (RIQ)] | 105 (67-182) | 106 (63-180) | 119 (80-196) | 129 (83-198) | 122 (88-284) | 85 (28-131) | 102 (66-215) | 82 (53-155) | 68 (51-96) | 76 (48-92) | 101 (22-179) | 112 (82-136) | 0.017 | |
| Pertenece a clúster | 519/755 (68.7) | 318/419 (75.9) | 95/163 (58.3) | 36/49 (73.5) | 17/28 (60.7) | 12/23 (52.2) | 8/18 (44.4) | 9/15 (60.0) | 11/15 (73.3) | 10/15 (66.7) | 0/2 (0.0) | 3/8 (37.5) | <0.001 | |

* Chi cuadrada de Pearson

† Prueba Kruskal-Wallis

8.9 Características clínicas asociadas con sublinajes Harlem, LAM y otros.

Exploramos la posible asociación entre sublinajes y características clínicas de la población, para ello, realizamos el agrupamiento de los pacientes con los sublinajes Haarlem, LAM y distintos a Haarlem y LAM **Tabla 8**. Observamos que 61.3% (247/419) de pacientes con sublinaje Haarlem fueron hombres, presentaron un IMC de 20.5 (18.1-23.4) menor al promedio y 75.9% (318/419) se encontraron en conglomerado. El 54.5% (74/136) de los pacientes con aislados de sublinaje LAM presentaron cavitaciones. En los pacientes con sublinajes distintos a Haarlem y LAM, el 20.8% (36/173) habían fumado alguna vez, y 40.5% (70/173) presentaron hemoptisis, todos con significancia estadística ($p < 0.05$).

Tabla 8. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con TBP en Orizaba, Veracruz, 1997-2010, analizadas por el sublinaje de los aislados de *M. tuberculosis* obtenido por el panel 24-*loci* MIRU-VNTR.

| Variable | Total | Haarlem | LAM | Otros | Valor p^* |
|---|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------|
| | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | |
| Hombre | 442/755 (58.5) | 257/419 (61.3) | 81/163 (49.7) | 104/173 (60.1) | 0.034 |
| Edad (años) [mediana (RIQ)] | 45 (32-59) | 45 (33-59) | 43 (30-55) | 47 (31-60) | 0.503† |
| >6 años de educación formal | 507/754 (67.2) | 277/418 (66.3) | 115/163 (70.6) | 115/173 (24.3) | 0.595 |
| Piso de tierra | 174/755 (23.1) | 88/419 (21.0) | 44/163 (27.0) | 42/173 (24.0) | 0.277 |
| Localidad rural | 99/732 (13.5) | 47/409 (11.5) | 30/159 (18.9) | 22/164 (13.4) | 0.070 |
| Distancia al centro de salud más cercano (metros) [mediana (RIQ)] | 708 (414-1,099) | 775 (432-1,184) | 775 (432-1,183.7) | 737 (455-1,118) | 0.241† |
| Acceso a seguridad social | 254/755 (33.6) | 152/419 (36.3) | 48/163 (29.5) | 54/173 (31.2) | 0.218 |
| Alguna vez ha consumido alcohol | 330/753 (43.8) | 194/417 (46.5) | 64/163 (39.3) | 72/173 (41.6) | 0.229 |
| Alguna vez ha fumado | 164/753 (21.8) | 106/417 (25.4) | 22/163 (13.5) | 36/173 (20.8) | 0.007 |
| Alguna vez ha consumido drogas ilícitas | 35/754 (4.6) | 19/418 (4.6) | 5/163 (3.1) | 11/173 (6.4) | 0.355 |
| Sin hogar o residencia en instituciones | 20/754 (2.7) | 12/419 (2.9) | 4/162 (2.5) | 4/173 (2.3) | 0.918 |
| Diabetes mellitus tipo 2 | 250/755 (33.1) | 138/419 (32.9) | 52/163 (31.9) | 60/173 (34.7) | 0.858 |
| Infección por VIH | 13/739 (1.8) | 7/410 (1.7) | 3/163 (1.8) | 3/166 (1.8) | 0.993 |
| Paciente nuevo | 688/754 (91.3) | 384/418 (91.9) | 145/163 (89.0) | 159/173 (91.9) | 0.505 |
| Tres o más cruces vs menos de tres cruces primer BAAR o en el BAAR diagnóstico con mayor número de cruces | 211/755 (28.0) | 123/419 (29.4) | 47/163 (28.8) | 41/173 (23.7) | 0.363 |
| Resistencia a al menos un fármaco | 117/612 (19.1) | 68/337 (20.2) | 25/131 (19.1) | 24/144 (16.7) | 0.669 |
| MDR | 21/612 (3.4) | 8/337 (2.4) | 8/131 (6.1) | 5/144 (3.5) | 0.138 |
| Fiebre | 531/752 (70.6) | 292/417 (70.0) | 114/162 (70.4) | 125/173 (72.3) | 0.861 |
| Hemoptisis | 250/753 (33.2) | 141/417 (33.8) | 39/163 (23.9) | 70/173 (40.5) | 0.005 |
| Cavidades en rayos X | 282/626 (45.1) | 152/344 (44.2) | 74/136 (54.5) | 56/146 (38.4) | 0.023 |
| IMC [mediana (RIQ)] | 20.9(18.4-23.8) | 20.5(18.1-23.4) | 21.0(18.9-24.1) | 21.6(19.0-23.9) | 0.016† |
| Días entre el inicio de síntomas e inicio de tratamiento [mediana (RIQ)] | 105 (67-182) | 106 (63-180) | 119 (80-196) | 97 (66.5-175) | 0.098† |
| Pertenece a clúster | 519/755 (68.7) | 318/419 (75.9) | 95/163 (58.3) | 106/173 (61.3) | <0.001 |

* Chi cuadrada de Pearson

† Prueba Kruskal-Wallis

8.10 Desenlace del tratamiento y su asociación por sublinaje.

Analizamos el desenlace al tratamiento de los pacientes y comparamos cura o término de tratamiento con fracaso en todos los sublinajes identificados. Se observó que los aislados de sublinaje X (2/11, 18.2%) y desconocido (1/7, 14.3%) presentaron mayor proporción de fracaso; seguidos de Cameroon (3/41, 7.3%), EAI (1/15, 6.7%), S (1/18, 5.6%), LAM (6/135, 4.4%), Uganda (1/26, 3.9%) y Haarlem (5/358, 1.4%), los pacientes con sublinajes Beijing, Ghana y TUR no presentaron fracaso al tratamiento **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados del desenlace al tratamiento en pacientes con TBP de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010, analizados por sublinaje determinado por el panel 24-loci MIRU-VNTR.

| Variable | Total | Haarlem | LAM | Cameroon | Uganda | Ghana | S | X | TUR | EAI | Beijing | Desconocido | Valor de p* |
|---|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|-------------|
| | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | |
| Resultado de tratamiento | | | | | | | | | | | | | |
| Abandono | 49/755 (6.5) | 27/419 (6.4) | 13/163 (8.0) | 3/49 (6.1) | 0/28 (0.0) | 0/23 (0.0) | 0/18 (0.0) | 4/15 (26.7) | 1/15 (6.7) | 0/15 (0.0) | 0/2 (0.0) | 1/8 (12.5) | 0.059 |
| Cura | 532/755 (70.5) | 306/419 (73.0) | 109/163 (66.9) | 28/49 (57.1) | 23/28 (82.1) | 15/23 (65.2) | 14/18 (77.8) | 8/15 (53.3) | 9/15 (60.0) | 13/15 (86.7) | 2/2 (100) | 5/8 (62.5) | |
| Término de tratamiento | 93/755 (12.3) | 47/419 (11.2) | 20/163 (12.3) | 10/49 (20.4) | 2/28 (7.1) | 6/23 (26.1) | 3/18 (16.7) | 1/15 (6.7) | 2/15 (3.3) | 1/15 (6.7) | 0/2 (0.0) | 1/8 (12.5) | |
| Fracaso | 20/755 (2.7) | 5/419 (1.2) | 6/163 (3.7) | 3/49 (6.1) | 1/28 (3.6) | 0/23 (0.0) | 1/18 (5.6) | 2/15 (13.3) | 0/15 (0.0) | 1/15 (6.7) | 0/2 (0.0) | 1/8 (12.5) | |
| Defunción durante tratamiento | 26/755 (3.4) | 19/419 (4.5) | 4/163 (2.5) | 2/49 (4.1) | 1/28 (3.6) | 0/23 (0.0) | 0/18 (0.0) | 0/15 (0.0) | 0/15 (0.0) | 0/15 (0.0) | 0/2 (0.0) | 0/8 (0.0) | |
| Sin información | 35/755 (4.6) | 15/419 (3.6) | 11/163 (6.8) | 3/49 (6.1) | 1/28 (3.6) | 2/23 (8.7) | 0/18 (0.0) | 0/15 (0.0) | 3/15 (20.0) | 0/15 (0.0) | 0/2 (0.0) | 0/8 (0.0) | |
| Fracaso al tratamiento | | | | | | | | | | | | | |
| Fracaso | 20/645 (3.1) | 5/358 (1.4) | 6/135 (4.4) | 3/41 (7.3) | 1/26 (3.9) | 0/21 (0.0) | 1/18 (5.6) | 2/11 (18.2) | 0/11 (0.0) | 1/15 (6.7) | 0/2 (0.0) | 1/7 (14.3) | 0.029 |
| Cura o término de tratamiento | 625/645 (96.9) | 353/358 (98.6) | 129/135 (95.6) | 38/41 (92.7) | 25/26 (96.2) | 21/21 (100) | 17/18 (94.4) | 9/11 (81.2) | 11/11 (100) | 14/15 (93.3) | 2/2 (100) | 6/7 (85.7) | |
| No éxito a tratamiento | | | | | | | | | | | | | |
| Abandono, fracaso o defunción durante tratamiento | 95/720 (13.2) | 51/404 (12.6) | 23/152 (15.1) | 8/46 (17.4) | 2/27 (7.4) | 0/21 (0.0) | 1/18 (85.6) | 6/15 (40.0) | 1/12 (8.3) | 1/15 (6.7) | 0/2 (0.0) | 2/8 (25.0) | 0.060 |
| Cura o término de tratamiento | 625/720 (86.8) | 353/404 (87.4) | 129/152 (84.9) | 38/46 (82.6) | 25/27 (92.6) | 21/21 (100) | 17/18 (94.4) | 9/15 (60.0) | 11/12 (91.7) | 14/15 (93.3) | 2/2 (100) | 6/8 (75.0) | |
| Muerte durante el tratamiento | | | | | | | | | | | | | |
| Defunción | 26/720 (3.6) | 19/404 (4.7) | 4/152 (2.6) | 2/46 (4.4) | 1/27 (3.7) | 0/21 (0.0) | 0/18 (0.0) | 0/15 (0.0) | 0/12 (0.0) | 0/15 (0.0) | 0/2 (0.0) | 0/8 (0.0) | 0.871 |
| Cura, término de tratamiento, abandono o fracaso | 694/720 (96.4) | 385/404 (95.3) | 148/152 (97.4) | 44/46 (95.7) | 26/27 (96.3) | 21/21 (100) | 18/18 (100) | 15/15 (100) | 12/12 (100) | 15/15 (100) | 2/2 (100) | 8/8 (100) | |

* Chi cuadrada de Pearson

8.11 Desenlace a tratamiento asociados con sublinajes Harlem, LAM y otros.

El desenlace del tratamiento, de acuerdo con los sublinajes agregados se resume en la **Tabla 10**. Se observa que al comparar cura o término de tratamiento con el fracaso, los pacientes con sublinajes distintos a Haarlem y LAM mostraron mayor proporción de fracaso a tratamiento (9/152, 5.9%), en comparación con los pacientes con sublinajes Haarlem (1.4%) y LAM (4.4%) ($p=0.016$).

Tabla 10. Resultados del desenlace del tratamiento de los pacientes con TBP de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010, analizado por el sublinaje determinado por el panel 24-loci MIRU-VNTR.

| Variable | Total | Haarlem | LAM | Otros | Valor de p* |
|---|----------------|----------------|----------------|--------------------|--------------|
| | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | |
| Resultado de tratamiento | | | | | |
| Abandono | 49/755 (6.5) | 27/419 (6.4) | 13/163 (8.0) | 9/173 (5.2) | 0.061 |
| Cura | 532/755 (70.5) | 306/419 (73.0) | 109/163 (66.9) | 117/173 (67.6) | |
| Término de tratamiento | 93/755 (12.3) | 47/419 (11.2) | 20/163 (12.3) | 26/173 (15.0) | |
| Fracaso | 20/755 (2.7) | 5/419 (1.2) | 6/163 (3.7) | 9/173 (5.2) | |
| Defunción durante tratamiento | 26/755 (3.4) | 19/419 (4.5) | 4/163 (2.5) | 3/173 (1.7) | |
| Sin información | 35/755 (4.6) | 15/419 (3.6) | 11/163 (6.8) | 9/173 (5.2) | |
| Fracaso al tratamiento | | | | | |
| Fracaso | 20/645 (3.1) | 5/358 (1.4) | 6/135 (4.4) | 9/152 (5.9) | 0.016 |
| Cura o término de tratamiento | 625/645 (96.9) | 353/358 (98.6) | 129/135 (95.6) | 143/152 (94.1) | |
| No éxito de tratamiento | | | | | |
| Abandono, fracaso o defunción durante tratamiento | 95/720 (13.2) | 51/404 (12.6) | 23/152 (15.1) | 21/164 (12.8) | 0.728 |
| Cura o término de tratamiento | 625/720 (86.8) | 353/404 (87.4) | 129/152 (84.9) | 143/164 (87.2) | |
| Defunción durante tratamiento | | | | | |
| Defunción | 26/720 (3.6) | 19/404 (4.7) | 4/152 (2.6) | 3/164 (1.8) | 0.192 |
| Cura, término de tratamiento, abandono o fracaso | 694/720 (96.4) | 385/404 (95.3) | 148/152 (97.4) | 161/164 (98.2) | |

* Chi cuadrada de Pearson

La comparación entre las características clínicas de acuerdo con el desenlace de cura o término de tratamiento comparado con fracaso (**Tabla 11**), encontramos mayor proporción de fracaso a tratamiento en pacientes que habían fumado alguna vez (8/20, 40% vs 131/624, 21.0% ; p= 0.034), presentaron resistencia al menos a un fármaco (13/17, 76.0% versus 80/505, 16.0%; p<0.001), fueron MDR (5/17, 2.0% vs 6/505, 1.0%, p<0.001) y tenían sublinaje diferente a Haarlem y LAM (9/20, 45.0% vs 143/625, 23.0%; p=0.022). Observamos mayor proporción de cura en pacientes que presentaron escolaridad formal >6 años (423/625, 68.0% vs 9/20, 45%; p=0.034) y sublinaje Haarlem (353/625, 56.5% vs 5/20, 25%; p=0.005).

Tabla 11. Resultados de las características clínicas y desenlace del tratamiento en pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010

| Variable | Total | Fracaso | Cura o término de tratamiento | Valor de p* |
|---|-----------------|---------------------|-------------------------------|--------------|
| | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | |
| Hombre | 363/645 (56.0) | 15/20 (75.0) | 348/625 (56.0) | 0.086 |
| Edad (años) [mediana (RIQ)] | 56 (45-35) | 51 (33-57) | 45 (32-59) | 0.787† |
| >6 años de educación formal | 432/645 (67.0) | 9/20 (45.0) | 423/625 (68.0) | 0.034 |
| Piso de tierra | 154/645 (24.0) | 3/20 (15.0) | 151/625 (24.0) | 0.344 |
| Localidad rural | 81/624 (13.0) | 3/18 (17.0) | 78/606 (13.0) | 0.637 |
| Distancia al centro de salud más cercano (metros) [mediana (RIQ)] | 689 (412-1,095) | 848 (274-1,260) | 692 (412-1,092) | 0.717† |
| Acceso a seguridad social | 225/645 (35.0) | 3/20 (15.0) | 222/625 (36.0) | 0.058 |
| Alguna vez ha consumido alcohol | 269/644 (42.0) | 10/20 (50.0) | 259/624 (42.0) | 0.448 |
| Alguna vez ha fumado | 139/644 (22.0) | 8/20 (40.0) | 131/624 (21.0) | 0.042 |

| | | | | |
|---|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| Alguna vez ha consumido drogas ilícitas | 26/645 (4.0) | 0/20 (0.0) | 26/625 (4.0) | 0.352 |
| Sin hogar o residencia en instituciones | 14/644 (2.0) | 0/20 (0.0) | 14/624 (2.0) | 0.498 |
| Diabetes mellitus tipo 2 | 221/645 (34.0) | 7/20 (35.0) | 214/625 (34.0) | 0.944 |
| Infección por VIH | 6/635 (1.0) | 0/19 (0.0) | 6/616 (1.0) | 0.666 |
| Paciente nuevo | 592/644 (92.0) | 17/20 (85.0) | 575/624 (92.0) | 0.248 |
| Tres o más cruces vs menos de tres cruces primer BAAR o en el BAAR diagnóstico con mayor número de cruces | 174/645 (27.0) | 7/20 (35.0) | 167/625 (27.0) | 0.411 |
| Resistencia a al menos un fármaco | 93/522 (18.0) | 13/17 (76.0) | 80/505 (16.0) | <0.001 |
| MDR | 11/522 (2.0) | 5/17 (29.0) | 6/505 (1.0) | <0.001 |
| Fiebre | 462/642 (72.0) | 11/20 (55.0) | 451/622 (73.0) | 0.086 |
| Hemoptisis | 225/645 (35.0) | 6/20 (30.0) | 219/625 (35.0) | 0.642 |
| Cavidades en rayos X | 244/545 (45.0) | 8/13 (62.0) | 236/532 (44.0) | 0.218 |
| IMC [mediana (RIQ)] | 21.0 (18.7-23.8) | 19.1 (17.6-22.5) | 21.1 (18.7-22.5) | 0.181† |
| Días entre el inicio de síntomas e inicio de tratamiento [mediana (RIQ)] | 105 (67-197) | 152 (79-242) | 105 (66-179) | 0.120† |
| <i>Sublinaje por MIRU</i> | | | | |
| Haarlem | 358/645 (55.5) | 5/20 (25.0) | 353/625 (56.5) | 0.005‡ |
| LAM | 135/645 (20.9) | 6/20 (30.0) | 129/625 (20.6) | 0.311‡ |
| Otros | 152/645 (24.0) | 9/20 (45.0) | 143/625 (23.0) | 0.022‡ |
| Pertenece a clúster | 447/645 (69.3) | 10/20 (50) | 437/625 (69.9) | 0.057 |

* Chi cuadrada de Pearson. † Prueba Kruskal-Wallis. ‡ Prueba binomial.

Analizamos la presencia o ausencia de cavitaciones y las comparamos con las características clínicas de la población **Tabla 12**. Encontramos que los pacientes con cavitaciones tenían DM2 como co-morbilidad (106/282, 38.0% vs 95/344, 28.0%; p=0.008), mayor número de BAAR en el esputo (101/282, 36.0% vs 71/344, 21.0%, p<0.001) y presentaron aislados de sublinaje LAM (74/282, 26.2% vs 62/344, 18.0%; p=0.013).

Tabla 12. Características según cavitaciones en pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010

| Variable | Total | Con cavitaciones | Sin cavitaciones | Valor de p* |
|---|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | n/total (%) | n/total (%) | n/total (%) | |
| Hombre | 362/626 (58.0) | 160/282 (57.0) | 202/344 (59.0) | 0.617 |
| Edad (años) [mediana (RIQ)] | 46 (32-59) | 47 (33-60) | 45 (31-58) | 0.466† |
| >6 años de educación formal | 429/626 (69.0) | 191/282 (68.0) | 238/344 (69.0) | 0.696 |
| Piso de tierra | 151/626 (24.0) | 66/282 (23.0) | 85/344 (25.0) | 0.704 |
| Localidad rural | 81/610 (13.0) | 36/273 (13.0) | 45/337 (13.0) | 0.952 |
| Distancia al centro de salud más cercano (metros) [mediana (RIQ)] | 702 (434.0-1,089) | 749 (464.1-1,109) | 683 (412-1,073) | 0.114† |
| Acceso a seguridad social | 224/626 (36.0) | 108/282 (38.0) | 116/344 (34.0) | 0.235 |
| Alguna vez ha consumido alcohol | 265/626 (42.0) | 129/282 (46.0) | 136/344 (40.0) | 0.118 |
| Alguna vez ha fumado | 135/626 (22.0) | 54/282 (19.0) | 81/344 (24.0) | 0.183 |
| Alguna vez ha consumido drogas ilícitas | 30/626 (5.0) | 12/282 (4.0) | 18/344 (5.0) | 0.569 |
| Sin hogar o residencia en instituciones | 18/626 (3.0) | 10/282 (4.0) | 8/344 (2.0) | 0.363 |
| Diabetes mellitus tipo 2 | 201/626 (32.0) | 106/282 (38.0) | 95/344 (28.0) | 0.008 |
| Infección por VIH | 11/616 (2.0) | 2/276 (1.0) | 9/340 (3.0) | 0.073 |
| Paciente nuevo | 566/625 (91.0) | 249/281 (89.0) | 317/344 (92.0) | 0.132 |
| Tres o más cruces vs menos de tres cruces primer BAAR o en el BAAR diagnóstico con mayor número de cruces | 172/626 (27.0) | 101/282 (36.0) | 71/344 (21.0) | <0.001 |
| Resistencia a al menos un fármaco | 101/524 (19.0) | 47/220 (21.0) | 54/304 (18.0) | 0.302 |
| MDR | 18/524 (3.0) | 8/220 (4.0) | 10/304 (3.0) | 0.830 |
| Fiebre | 438/623 (70.0) | 206/280 (74.0) | 232/343 (68.0) | 0.107 |
| IMC [mediana (RIQ)] | 21.0 (18.4-23.8) | 20.8 (18.5-23.5) | 21.2 (18.4-23.9) | 0.356† |

| | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|---------------|
| Días entre el inicio de síntomas e inicio de tratamiento [mediana (RIQ)] | 104 (66-177) | 108 (68-195) | 100 (63-161) | 0.064† |
| Hemoptisis | 211/625 (34.0) | 95/282 (34.0) | 116/343 (34.0) | 0.972 |
| <i>Sublinaje por MIRU</i> | | | | |
| Haarlem | 344/626 (55.0) | 152/282 (53.9) | 192/344 (55.8) | 0.632‡ |
| LAM | 136/626 (21.7) | 74/282 (26.2) | 62/344 (18.0) | 0.013‡ |
| Otros | 146/626 (23.0) | 56/282 (20.0) | 90/344 (26.0) | 0.063‡‡ |
| Pertenciente a clúster | 433/626 (69.2) | 198/282 (70.2) | 235/344 (68.3) | 0.609‡ |

* Chi cuadrada de Pearson. † Prueba Kruskal-Wallis. ‡ Prueba binomial

Para explicar el fracaso a tratamiento, realizamos dos modelos, uno que incluyó la variable resistencia al menos a un fármaco, la cual presenta asociación con fracaso (RMa 25.763, IC 95% 7.096-93.543; $p < 0.001$), en este mismo modelo, observamos que los casos con aislados diferentes a los sublinajes Haarlem y LAM (RMa 6.740, IC 95% 1.704-26.661; $p = 0.007$), también se asocian con fracaso a tratamiento. En el segundo modelo se incluyó la variable MDR, la cual está asociada con fracaso a tratamiento (RMa 31.497, IC 95% 5.119-93.815; $p < 0.001$). Sin embargo, en ambos modelos se observó que tener escolaridad > 6 años de educación formal no se asoció con fracaso a tratamiento (RMa 0.166, IC 95% 0.045-0.615; $p = 0.007$) y (RMa 0.248, IC 95% 0.069-0.885; $p = 0.032$) **Tabla 13**.

Tabla 13. Características asociadas a fracaso a tratamiento en pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, 1997-2010.

| Características | RMa | IC 95% | | Valor p* | RMa | IC 95% | | Valor p* |
|-----------------------------------|------------|--------|--------|------------------|------------|--------|---------|------------------|
| | | L.I. | L.S. | | | L.I. | L.S. | |
| Hombre | 3.030 | 0.766 | 11.984 | 0.114 | 3.152 | 0.810 | 12.266 | 0.098 |
| Edad (años) | 1.042 | 1.000 | 1.086 | 0.051 | 1.034 | 0.995 | 1.074 | 0.085 |
| > 6 años de educación formal | 0.166 | 0.045 | 0.615 | 0.007 | 0.248 | 0.069 | 0.885 | 0.032 |
| Acceso a seguridad social | 0.246 | 0.056 | 1.085 | 0.064 | 0.264 | 0.062 | 1.123 | 0.071 |
| Diabetes mellitus tipo 2 | 0.716 | 0.195 | 2.634 | 0.615 | 0.750 | 0.222 | 2.532 | 0.643 |
| Paciente nuevo | 0.860 | 0.174 | 4.257 | 0.853 | 1.047 | 0.201 | 5.442 | 0.957 |
| Resistencia al menos a un fármaco | 25.763 | 7.096 | 93.543 | <0.001 | --- | --- | --- | --- |
| MDR | --- | --- | --- | --- | 31.497 | 5.119 | 193.815 | <0.001 |
| <i>Sublinaje</i> | | | | | | | | |
| Haarlem | Referencia | | | | Referencia | | | |
| LAM | 2.852 | 0.574 | 14.181 | 0.200 | 2.009 | 0.426 | 9.475 | 0.378 |
| Otros | 6.740 | 1.704 | 26.661 | 0.007 | 3.342 | 0.906 | 12.320 | 0.070 |

** Regresión logística ajustada. $p < 0.05$ valor estadísticamente significativo

RMa =razón de momios ajustada; IC= Intervalo de confianza; L.I.=Límite inferior; L.S.: Límite superior

Para identificar las variables asociadas con la presencia de cavitaciones, ajustamos un modelo de regresión logística **Tabla 14**. Encontramos que la presencia de cavitaciones estuvo asociada con haber consumido alguna vez bebidas alcohólicas (RMa 1.528, IC 95% 1.041-2.243; $p = 0.030$), tener DM2 (RMa 1.625, IC 95% 1.130-2.337; $p = 0.009$), observar

BAAR en el esputo con tres o más cruces (RMa 2.198, IC 95% 1.524-3.168; p<0.001) y tener el sublinaje LAM (RMa 0.806, IC 95% 1.023-2.333; p=0.039).

Tabla 14. Características asociadas a presentar cavitaciones como hallazgo radiográfico. Orizaba, Veracruz, 1997-2010 (n=626)

| Características | RMa | IC 95% | | Valor p* |
|---|------------|--------|-------|------------------|
| | | L.I. | L.S. | |
| Hombre | 0.781 | 0.529 | 1.152 | 0.212 |
| Edad (años) | 1.003 | 0.993 | 1.013 | 0.573 |
| Alguna vez ha consumido bebidas alcohólicas | 1.528 | 1.041 | 2.243 | 0.030 |
| Diabetes mellitus tipo 2 | 1.625 | 1.130 | 2.337 | 0.009 |
| Tres o más cruces vs menos de tres cruces primer BAAR o en el BAAR diagnóstico con mayor número de cruces | 2.198 | 1.524 | 3.168 | <0.001 |
| <i>Sublinaje</i> | | | | |
| Haarlem | Referencia | | | |
| LAM | 1.545 | 1.023 | 2.333 | 0.039 |
| Otros | 0.806 | 0.537 | 1.210 | 0.298 |

* Regresión logística ajustada. p<0.05 valor estadísticamente significativo
RMa =razón de momios ajustada; IC= Intervalo de confianza; L.I.=Límite inferior; L.S.: Límite superior

8.12 Secuenciación de genoma completo.

Se realizó WGS de 12 aislados de *M. tuberculosis*, los cuales fueron seleccionados con base en su patrón de MIRU-VNTR y divididos en tres grupos como se muestra en la **Tabla 15**. El Grupo I incluyó, cuatro aislados de pacientes diagnosticados entre 2000-2006, con un mismo patrón de 24-loci MIRU-VNTR, un aislado presentó resistencia a STR+INH+RIF, otro presentó resistencia a INH, e incluyó un paciente con DM2. El Grupo II incluyó cuatro aislados de pacientes diagnosticados entre 2000-2006 con un mismo patrón MIRU-VNTR que difieren en cuatro loci del Grupo I, y tres pacientes con DM2. El Grupo III incluyó, cuatro aislados con patrones MIRU-VNTR diferentes entre sí, un aislado presentó resistencia a INH proveniente de un paciente con historia de tratamiento previo y DM2, también se incluyó un paciente con VIH+.

Tabla 15. Características socio-demográficas y moleculares de los aislados secuenciados de pacientes con TB pulmonar de la cohorte de Orizaba, Veracruz, seleccionados para el análisis de WGS. (n=12)

| Grupo | Edad | Sexo | Tratamiento | Fecha de diagnóstico | Resistencia | Patrón de 24-loci MIRU-VNTR | Comorbilidad | Lugar de procedencia |
|-------|------|------|-------------|----------------------|-------------|-----------------------------|--------------|----------------------|
| I | 60 | M | Nuevo | 2000 | - | 23+43553532334243221332233 | - | Orizaba |
| I | 41 | M | Nuevo | 2002 | STR+INH+RIF | 233553532334243221332233 | - | Orizaba |
| I | 59 | F | Nuevo | 2004 | - | 233553532334243221332233 | DM2 | Orizaba |
| I | 28 | M | Nuevo | 2006 | INH | 233553532334243221332233 | - | Cd. Mendoza |
| II | 17 | M | Nuevo | 2000 | - | 233553531335245221334233 | - | Orizaba |
| II | 37 | M | Nuevo | 2002 | - | 233553531335245221334233 | DM2 | San Andrés Tenejapan |
| II | 54 | M | Nuevo | 2002 | - | 233553531335245221334233 | DM2 | Orizaba |
| II | 66 | F | Nuevo | 2006 | - | 233553531335245221334233 | DM2 | Orizaba |
| III | 74 | M | Retratado | 2001 | INH | 243543135339225221314233 | DM2 | Cd. Mendoza |
| III | 60 | M | Nuevo | 2001 | - | 233543531335+6245221334233 | - | Nogales |
| III | 50 | F | Nuevo | 2003 | - | 222553432336245221435231 | - | Río Blanco |
| III | 28 | M | Nuevo | 2003 | - | 213642344424218221324232 | VIH | Orizaba |

Abreviaciones: M- masculino, F-femenino; STR-estreptomocina; INH-Isonazida; RIF-Rifampicina; EMB-Etambutol; S-sensible; R-resistente; DM2- diabetes mellitus; VIH- Virus de la inmunodeficiencia humana.

Para obtener más información sobre la estructura genómica de *M. tuberculosis*, se realizó el alineamiento de las secuencias utilizando el alineador Burrows-Wheeler (BWA-MEM) con el genoma de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3), incluida en los programas Bionumerics y MTBseq. Las características generales de las secuencias de los 12 aislados de *M. tuberculosis* se muestran en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Características generales de las secuencias de *M. tuberculosis* (n=12).

| Muestra | Total de lecturas | % de lecturas mapeadas | Contenido %GC | Profundidad media de cobertura | No. de SNP | Deleciones | Inserciones | Sustituciones |
|---------|-------------------|------------------------|---------------|--------------------------------|------------|------------|-------------|---------------|
| 5236 | 13,149,811 | 98.50 | 65.62 | 437 | 1012 | 296 | 154 | 510 |
| 4493 | 13,262,202 | 98.80 | 65.62 | 433 | 1027 | 296 | 155 | 519 |
| 44956 | 13,207,707 | 98.66 | 65.62 | 441 | 1019 | 301 | 146 | 513 |
| 22253 | 13,363,485 | 98.96 | 65.62 | 448 | 1016 | 304 | 151 | 513 |
| 5205 | 13,549,276 | 98.76 | 65.63 | 448 | 1022 | 216 | 175 | 517 |
| 2038 | 13,585,490 | 98.79 | 65.63 | 449 | 1029 | 207 | 155 | 520 |
| 43187 | 13,591,850 | 98.95 | 65.63 | 451 | 1022 | 213 | 161 | 518 |
| 32509 | 13,245,134 | 98.76 | 65.63 | 445 | 1027 | 205 | 189 | 518 |
| 5420 | 13,492,854 | 98.69 | 65.62 | 448 | 1075 | 423 | 174 | 557 |
| 25184 | 13,616,202 | 98.93 | 65.63 | 454 | 1016 | 219 | 165 | 517 |
| 24094 | 13,660,914 | 99.06 | 65.63 | 453 | 1023 | 241 | 157 | 519 |
| 11066 | 13,595,559 | 98.95 | 65.62 | 454 | 950 | 293 | 154 | 495 |

8.13 Formación de conglomerados por WGS.

La formación de conglomerados se determinó al calcular el número de SNP de diferencia entre los aislados de *M. tuberculosis* secuenciados **Figura 9**. Los conglomerados observados por secuenciación del genoma completo fueron similares a los obtenidos mediante el panel *24-loci* MIRU-VNTR, en donde los aislados con patrones de MIRU-VNTR diferentes presentan mayor número de SNP.

En el Grupo I, la distancia de SNP entre el aislado del año 2000 y los aislados de 2002, 2004 y 2006, fueron 21, 13 y 16 SNP respectivamente. En el Grupo II encontramos tres SNP de distancia entre el aislado de 2000 y 2002. En tanto que encontramos dos SNP de diferencia entre los dos aislados del año 2002. Asimismo, observamos 11 SNP de distancia entre los aislados de los años 2000 y 2006. La distancia más corta entre los grupos, se identificó en el aislado del año 2000 del Grupo II y el aislado de 2001 del Grupo III con 49 SNP de diferencia. También observamos que el número de SNP es menor entre pacientes con DM2 **Figura 9**.

Finalmente, entre los aislados del Grupo III observamos de 165-793 SNP de diferencia. El aislado más distante fue del paciente con VIH+, diagnosticado con TB en el año 2003.

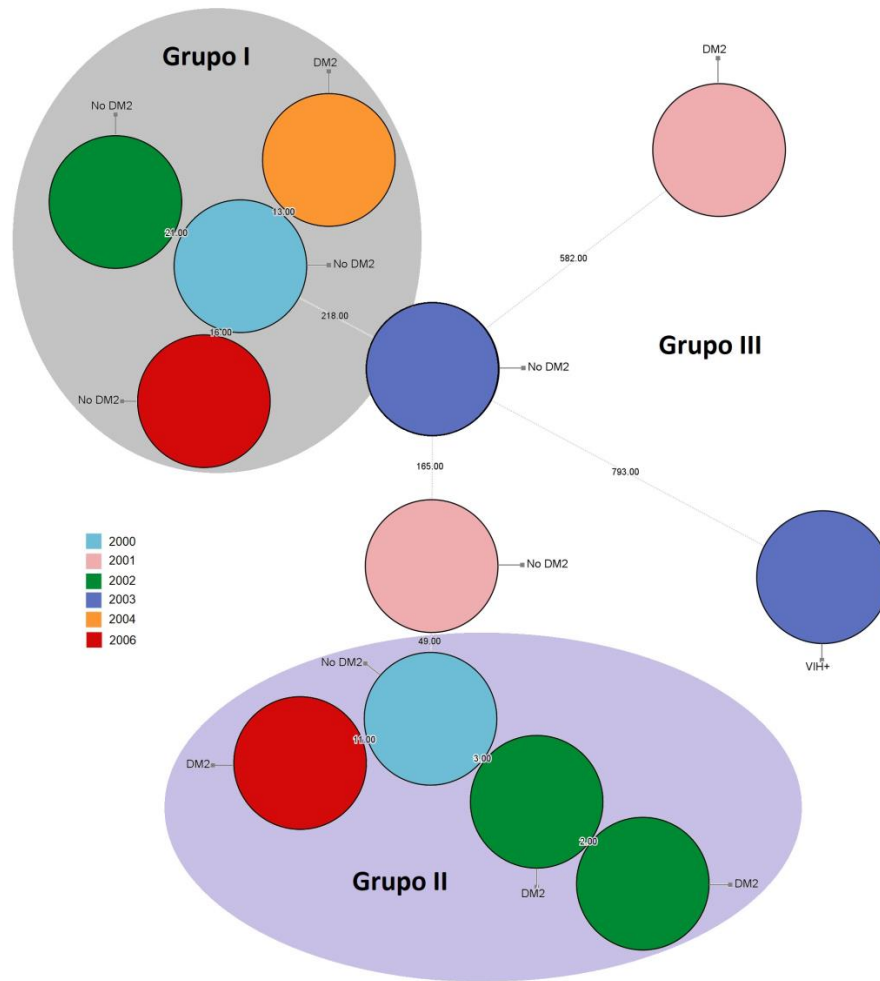


Figura 9. Formación de conglomerados por WGS a partir de la diferencia de SNP entre los 12 aislados de *M. tuberculosis* de pacientes con TB pulmonar de Orizaba, Veracruz. Cada círculo representa un aislado y el color representa el año de aislamiento. Los círculos del fondo (gris y morado) corresponden a un grupo con un mismo patrón de MIRU-VNTR. Los círculos sin fondo representan aislados con patrón de MIRU-VNTR diferente. Las líneas entre nodos representan la distancia genética por número de SNP. DM2= diabetes mellitus tipo 2; VIH+ = virus de la inmunodeficiencia humana. La formación de conglomerados se realizó con el programa BioNumerics® v7.6.

8.14 Dinámica de la transmisión de la enfermedad.

Con los resultados obtenidos de WGS, podemos inferir la dinámica de la transmisión de la TB, mediante el número de SNP observados y su posición a lo largo del genoma en cada aislado **Figura 10**. En el Grupo I, los aislados de los años 2000 y 2004, ambos provenientes de pacientes del municipio de Orizaba y sin relación epidemiológica referida, comparten la posición de SNP. En estos pacientes, se confirmó la transmisión directa al excluir del análisis las regiones repetitivas, lo cual disminuye la distancia de 13 a 11 SNP de diferencia entre ambos aislados. En este grupo también encontramos aislados

con distancia genética de >13 SNP y posición distinta, los pacientes además refirieron haber tenido contacto con un paciente con TB diferente a los incluidos en el análisis **Figura 10A**.

En el Grupo II, se encuentran un aislado del año 2000 de un paciente de Orizaba y dos aislados del año 2002 uno de Orizaba y el otro de San Andrés Tenejapan, todos ellos sin relación epidemiológica pero que comparten un patrón de SNP semejante, lo que sugiere fuertemente la existencia de un evento de transmisión **Figura 10B**. El aislado de 2006 difiere de los otros del mismo grupo por la distribución de los SNP en el genoma, el paciente refirió haber tenido contacto con un paciente con TB diferente a los incluidos en el análisis.

Finalmente, en el Grupo III los aislados presentan patrones de SNP diferentes entre ellos y provienen de pacientes con domicilio en municipios diferentes (Orizaba, Río Blanco, Ciudad Mendoza y Nogales). En la **Figura 11** se muestra la distribución geográfica de los 12 pacientes seleccionados para realizar la secuenciación del genoma completo.

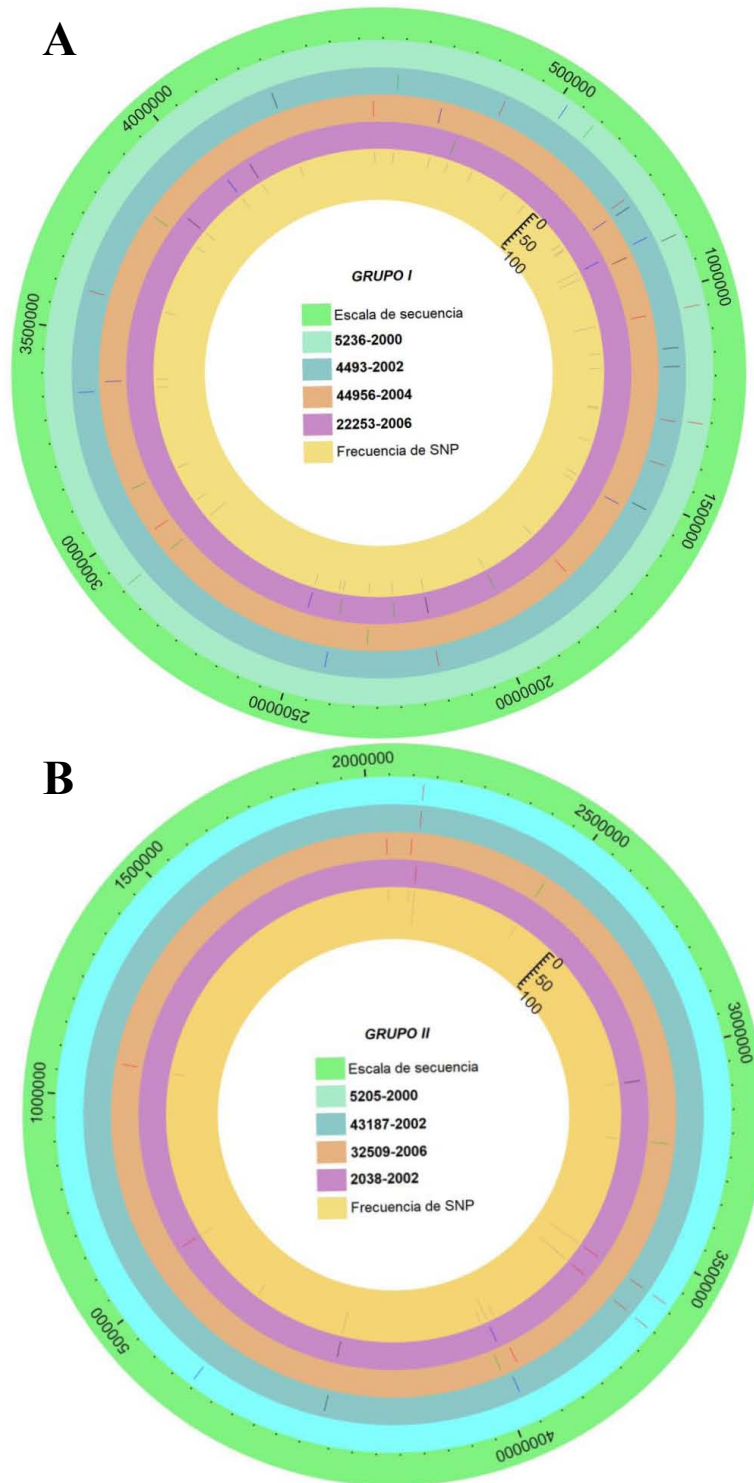


Figura 10. Análisis comparativo de los genomas de *M. tuberculosis*. A) Grupo I y B) Grupo II. La posición y número de SNP se indican con líneas dentro de los círculos. Cada círculo de color representa un aislado. La comparación de los genomas se realizó con el programa BioNumerics® v7.6.

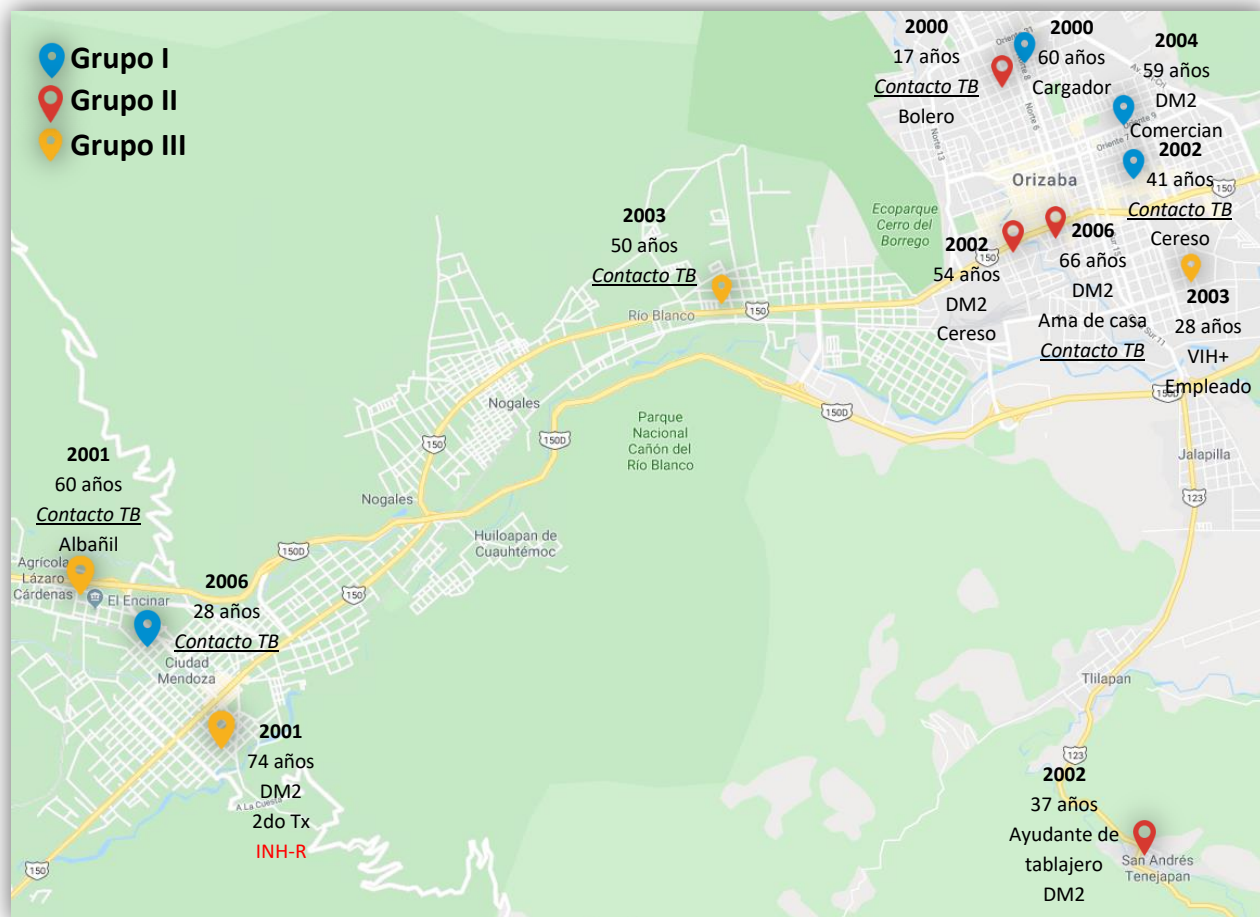


Figura 11. Mapa de la ciudad de Orizaba, Veracruz. Distribución geográfica de los 12 pacientes seleccionados con TB pulmonar.

8.15 Clasificación de los 12 aislados seleccionados para WGS.

Los 12 aislados fueron clasificados en sublinajes basándose en marcadores filogenéticos más canónicos como son los SNP. El sublinaje Haarlem 4.1.2.1, se confirmó en diez aislados clasificados previamente por el panel 24-*loci* MIRU-VNTR. Dos aislados fueron re-clasificados, un aislado previamente clasificado como Haarlem se re-clasificó como sublinaje X 4.1.1.3 proveniente del paciente diagnosticado en 2001 con DM2. Otro aislado clasificado previamente como UgandaI, fue re-clasificado como sublinaje LAM 4.3.4.1 proveniente del paciente diagnosticado en 2003 con VIH.

8.16 Determinación de mutaciones que confieren resistencia.

Se identificaron cinco mutaciones en genes que confieren resistencia a fármacos anti-tuberculosis **Tabla 17**. El aislado con resistencia a STR, INH y RIF, presentó mutación en el codón 88 del gen *rpsL* con sustitución de Lisina por Arginina (Lys88Arg), dicha mutación confiere resistencia a STR, además se observó la inserción de dos nucleótidos (AT) en la región promotora del gen *ahpC* n.-88_-87, la cual confiere resistencia a INH y una mutación en el codón 450 (Ser450Leu) del gen *rpoB*, esta mutación confiere resistencia a RIF. En otro aislado con resistencia fenotípica a INH, encontramos la mutación en el codón 315 (Ser315Thr) del gen *katG*. En el tercer aislado con resistencia a INH, además de presentar la sustitución en el gen *katG* Ser315Thr, observamos la sustitución de una citosina por timina (C>T) en la región promotora *fabG-inhA* en el nucleótido n.-15. A pesar de que los aislados fueron sensibles a EMB por pruebas fenotípicas, encontramos la sustitución de Metionina por Valina en el codón 305 (Met306Val) del gen *embB*.

Tabla 17. Resultados del análisis de las mutaciones en genes que confieren resistencia a fármacos obtenidas por la secuenciación de genoma completo de 12 aislados de *M. tuberculosis* seleccionados

| Aislado | Resistencia | Mutaciones asociadas | | | |
|------------|-------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | STR | INH | RIF | EMB |
| 4493-2000 | STR+INH+RI | <i>rpsL</i> | <i>ahpC</i> ins → -88- | <i>rpoB</i> Ser450Leu | <i>embB</i> Met306Val |
| | F | Lys88Arg | 87 AT promotor | | |
| 22253-2006 | INH | | <i>katG</i> Ser315Thr | | <i>embB</i> Met306Val |
| 5420-2001 | INH | | <i>katG</i> Ser315Thr | | <i>embB</i> Met306Val |
| | | | <i>fabG-inhA</i> - 15C>T | | |

Abreviaciones: STR-estreptomycin; INH-Isonazida; RIF-Rifampicina; EMB-Etambutol

10. DISCUSIÓN.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura poblacional de los aislados de *M. tuberculosis* de una cohorte de pacientes con TBP en Orizaba, Veracruz. Para ello se determinó la prevalencia de los sublinajes circulantes en la población mediante la tipificación por 24-loci MIRU-VNTR de 755 aislados de *M. tuberculosis*. Así mismo, se evaluó la efectividad del método de tipificación y se determinó la asociación entre sublinajes de *M. tuberculosis*, el perfil de resistencia y las características clínicas de la población. Finalmente, se realizó WGS en 12 aislados para determinar la clonalidad de los mismos y trazar la dinámica de la transmisión por medio del número de variantes, e identificar mutaciones asociadas a resistencia.

Los aislados analizados en este estudio, representan el 66.7% (755/1132) de los casos de TB de un estudio poblacional que se realizó durante un periodo de 15 años en 12 municipios de la jurisdicción sanitaria de Orizaba, Veracruz, en el sur de México. El linaje predominante fue el linaje 4 (Euro-Americano) que representa el 96.7% de los aislamientos incluyendo principalmente los sublinajes Haarlem y LAM (77.1%). El linaje 4 se ha detectado en otras regiones de México lo que indica una alta endemicidad (López-Rocha et al., 2013; Zenteno-Cuevas et al., 2015; Flores-López et al., 2017). El linaje 4 es el más común y geográficamente extendido. Según estudios filogenéticos, la epidemiología actual de la TB se debe casi en su totalidad a las migraciones históricas de Europa hacia América (Brynildsrud et al., 2018). Además, el incremento de la virulencia de este linaje junto con condiciones como el hacinamiento, los factores adversos del estilo de vida, las condiciones de trabajo y el contacto con individuos de la comunidad podrían haber facilitado la diseminación y adaptación del linaje 4 en esta población (Coscolla and Gagneux, 2014).

La frecuencia de aislados del sublinaje Haarlem (55.5%) y LAM (21.6%) fue mayor en este estudio comparado con otros estudios en México (22.1%, 32%, 9.5%), en donde predomina el sublinaje T (23.8%, 20%, 25.4%) (Molina-Torres et al., 2010; Zenteno-Cuevas et al., 2015; Lopez-Avalos et al., 2017). Un estudio realizado en Colombia sobre la estructura poblacional de *M. tuberculosis* presentó resultados similares a los nuestros, los sublinajes Haarlem y LAM se presentaron en el 53.3% de sus aislados (Realpe et al., 2014). Dado que el éxito de un linaje en particular se mide por el aumento de su frecuencia a lo largo del tiempo en una población determinada (Coscolla and Gagneux, 2014) se sugiere

que los sublinajes Haarlem y LAM se han adaptado bien a la población estudiada. Lo más probable es que la diseminación y los largos periodos de circulación de los aislados de estos sublinajes han generado muchas de las variantes observadas de Haarlem (164) y LAM (99) manteniendo al mismo tiempo un cierto grado de homogeneidad. Este hallazgo apoya la idea de una asociación simpática entre el huésped humano y *M. tuberculosis* (Gagneux et al., 2006).

También identificamos aislados de sublinaje Cameroon (6.5%), UgandaI (3.7%), Ghana (3%), S (2.4%), X y TUR (2%) que a pesar de ser poco comunes contribuyen a la diversidad genética de la región. En un estudio realizado cerca de la frontera norte de México se describió la diversidad genética similar (n=35; 25%) a la de este estudio, dicho estudio sugiere que la diversidad observada fue probablemente impulsada por la migración (Flores-López et al., 2017). Aunque la distribución de los sublinajes de Cameroon, UgandaI y Ghana están restringidas localmente, existen factores biológicos intrínsecos o extrínsecos como la migración que pueden influir en su distribución (Stucki et al., 2016). Sin embargo, dado que se desconoce el índice de migración en la población de Orizaba no podemos determinar si la migración influyó en la prevalencia de alguno de estos sublinajes.

Encontramos 15/755 (2%) aislados del linaje 1. Se han descrito resultados similares en Baja California (n=3; 2.1%) (Flores-López et al., 2017), el Estado de México (n=4; 2%) (Zenteno-Cuevas et al., 2015), Jalisco (1.56%) (Lopez-Avalos et al., 2017) y como linaje predominantemente en el estado de Guerrero (n=119; 44.6%) (Nava-Aguilera et al., 2011). La aparición de este linaje poco común en Orizaba podría ser útil para evaluar el control de la TB y los programas de vigilancia epidemiológica.

El sublinaje Beijing se encontró en dos aislados genotípicamente distantes por MIRU-VNTR uno de los cuales presentó MDR. Este sublinaje se ha encontrado previamente con poca frecuencia en México (López-Rocha et al., 2013; Zenteno-Cuevas et al., 2015; Flores-López et al., 2017) aunque se encuentra predominantemente en países al este de Asia. Sin embargo, los aislados de este sublinaje son capaces de extenderse rápidamente por todo el mundo como resultado de la migración (Coscolla and Gagneux, 2014). Por lo tanto, sugerimos la vigilancia de la presencia de este sublinaje para prevenir

su diseminación ya que ha sido asociado con el desarrollo de MDR, fracaso a tratamiento y recaída (Coscolla and Gagneux, 2014).

Las tasas de transmisión de *M. tuberculosis* suelen inferirse comparando aislados idénticos obtenidos de pacientes en un entorno epidemiológico determinado (Coscolla and Gagneux, 2014). La tasa de transmisión puede medirse mediante el RTI, nosotros obtuvimos un RTI del 51.7% lo que sugiere que poco más de la mitad de casos de TB estudiados fue resultado de transmisión reciente mientras que el resto probablemente fue debido a la reactivación de la enfermedad latente. Sin embargo, los casos de transmisión reciente pueden estar sobreestimados, en estudios previos se han descrito casos con aislados de *M. tuberculosis* genéticamente idénticos pero que carecen de relación epidemiológica, más bien son el resultado de la circulación constante de una cepa común en la región (Davidson et al., 2018). Por lo tanto, es necesario interpretar el RTI con cautela cuando la relación epidemiológica no es evidente.

En el presente estudio la resistencia a INH fue la más común. Este resultado es similar al notificado previamente en esta misma cohorte en la cual la resistencia a INH estuvo asociada con haber tenido contacto con una persona con TB (aOR 1,85; IC 95%: 1,15-2,96) (Báez-Saldaña et al., 2016). Encontramos baja proporción de aislados MDR (3,2%; 20/612), de los cuales el 50% (10/20) fueron de pacientes con antecedentes de tratamiento. Estos datos son cercanos a la prevalencia de MDR estimada (2,8%) de acuerdo con los datos del censo nacional de vigilancia en México (Bojorquez-Chapela et al., 2013). Estos hallazgos refuerzan la necesidad de realizar pruebas de susceptibilidad en los casos que requieren un segundo tratamiento y así evitar el fracaso a tratamiento y la consiguiente transmisión de aislados MDR.

Además, encontramos una tasa de resistencia primaria más alta (81,9%) que el 28,9% reportado previamente en la región norte de México con alta incidencia de TB (Villa-Rosas et al., 2015). También observamos que los pacientes con TB-DR y diagnóstico nuevo tuvieron aislados que pertenecían a conglomerados (aOR 4,05; IC del 95%: 1,5-11,2; $p = 0,007$) proporcionando evidencia de que la resistencia primaria se transmitió entre la población del estudio.

En el presente estudio, la tasa global de resistencia adquirida fue del 18,1%. De acuerdo con nuestros resultados, en 2019 la OMS informó que el 17,7% de los pacientes previamente tratados presentaron MDR/TB-RR a nivel mundial (Global TB report, 2020). Los hallazgos adicionales mostraron que el tratamiento previo estaba fuertemente asociado con la TB-MDR y esta asociación fue más fuerte en pacientes con aislamientos únicos (aOR de 21,56; IC del 95%: 3,5-134,3; $p = 0,001$). Este hallazgo es similar con diversos estudios realizados en México y en otros países en los que se encontró el tratamiento previo como factor asociado con MDR (Bojorquez-Chapela et al., 2013; Pradipta et al., 2018). La implementación de políticas específicas y programas que involucren la supervisión y el seguimiento de los pacientes previamente tratados reducirán significativamente la carga y la transmisión de la TB-MDR.

Nuestros resultados mostraron que el sublinaje LAM estuvo asociado con la TB-MDR (aOR 4,25, IC 95% 1,4-12,7, $p = 0,010$). Este hallazgo coincide con otros estudios realizados en Perú y Brasil (Costa et al., 2013; Grandjean et al., 2015). Esto respalda el “efecto fundador” indicando que el sublinaje LAM es el principal responsable de la TB-MDR en los países de América Latina como se ha descrito anteriormente (Grandjean et al., 2015). Una posible explicación de nuestros hallazgos es que la transmisión continúa de la resistencia primaria y la presencia del sublinaje LAM favorecen la aparición de la TB-MDR.

Nosotros encontramos que los casos con aislados de sublinaje Haarlem tuvieron mayor proporción de pacientes en conglomerados. Un estudio previo mostró resultados similares, los autores observaron que los aislados de sublinaje Haarlem presentaron mayor probabilidad de pertenecer a un conglomerado (Yimer et al., 2015). Este resultado confirma la amplia distribución y diversidad genética del linaje 4 y su virulencia, la cual se refleja con la formación de conglomerados y el éxito de su transmisión entre la población (Stucki et al., 2016).

Por otro lado, encontramos que los pacientes con aislados de sublinaje Cameroon tardaron más días entre el inicio de síntomas e inicio de tratamiento. Un resultado semejante ha sido descrito previamente en pacientes con aislados de linaje 7 en Etiopia, donde observaron que la razón de tardar más tiempo entre el inicio de síntomas e inicio de

tratamiento fue atribuido al lento crecimiento de las cepas de linaje 7 (Yimer et al., 2015). Debido a que el inicio de tratamiento es importante para cortar las cadenas de transmisión, sería necesario realizar pruebas fenotípicas sobre el tiempo de crecimiento de los aislados de sublinaje Cameroon para confirmar dicha hipótesis.

Con respecto al sublinaje Ghana, encontramos que la mayoría de los pacientes presentaron hemoptisis, sin embargo, nada ha sido descrito anteriormente sobre posibles asociaciones clínicas y este sublinaje.

Otro resultado interesante se refiere a los casos con aislados de *M. tuberculosis* de linaje Indo-Oceánico (EAI), los cuales fueron más frecuentes en hombres, en pacientes con DM2 y en pacientes que alguna vez habían fumado. Se ha descrito que la DM2 por si sola está asociada con la infección por *M. tuberculosis* y progresión a enfermedad activa con presentación severa de la enfermedad (Restrepo and Schlesinger, 2013). Además, se ha visto disminución de la función pulmonar en pacientes con DM2 fumadores comparada con no fumadores (Kolahian et al., 2019). Por lo tanto, es probable que los factores sociales contribuyan a la presencia del sublinaje EAI. Además, los pacientes con aislados de sublinaje EAI presentaron mayor proporción de cavitaciones (69.2%) pero sin significancia estadística. Un estudio que evaluó la relación huésped-patógeno y su asociación con el desenlace clínico en pacientes con TB, describió que aquellos pacientes infectados con cepas que se originaron en regiones geográficas distintas del origen del paciente (alopátricas) como el sublinaje EAI en América presentaron mayor riesgo de daño pulmonar (Pasipanodya et al., 2013). Como observamos en nuestros resultados, se ha sugerido que aunque estos sublinajes están menos adaptados para transmitirse y causar enfermedad en miembros plenamente competentes de poblaciones humanas alopátricas pueden hacerlo en el contexto de resistencia inmunológica deteriorada del huésped (Gagneux et al., 2006). Sin embargo, es necesario realizar la secuenciación del genoma completo de los aislados del sublinaje EAI para conocer las características genéticas del patógeno que facilitan su posible adaptación y transmisión.

El linaje del Este de Asia (Beijing), fue encontrado en dos pacientes de edad avanzada, uno de ellos presentó VIH y el otro DM2 y MDR. Los aislados Beijing fueron genéticamente distintos con 9/15 alelos de diferencia por el panel 24-*loci* MIRU-VNTR,

probablemente estos casos son resultados de reactivación de una infección latente. La familia Beijing ha sido asociada con MDR, sin embargo, en este estudio los datos no son concluyentes, debido a que solo son dos aislados (Hu et al., 2011; Gagneux, 2018). Sin embargo, es muy probable que el perfil MDR de uno de los aislados sea consecuencia de la presión selectiva de los antibióticos ya que el paciente había recibido tratamiento previo.

Observamos mayor proporción de fracaso a tratamiento en pacientes con aislados de sublinaje distinto a Haarlem y LAM, en pacientes que habían fumado alguna vez, y también se asoció con tener resistencia al menos a un fármaco o MDR. En el análisis de características clínicas asociadas por sublinaje, la resistencia se presentó en mayor proporción en aislados de sublinaje Cameroon (13/49, 30.2%), UgandaI (5/22, 22.7%) y Ghana (2/16, 12.5%). Recientemente, un estudio en Níger, reportó 75% de resistencia a RIF y MDR en aislados de sublinaje Cameroon y Ghana (Ejo et al., 2020). De acuerdo con nuestros resultados los sublinajes Cameroon y Ghana geográficamente restringidos dentro del linaje Euro-Americano, parecen haberse adaptado a la población de estudio y contribuyen de manera importante a la generación de resistencia. Por lo tanto, sería necesario realizar la genotipificación a un mayor número de aislados de estos sublinajes y realizar pruebas de susceptibilidad para conocer el impacto real sobre la resistencia de sublinajes poco descritos en México. La variable tener >6 años de educación formal fue significativa, la cual resultó no estar asociada con falla a tratamiento. Probablemente, tener un mayor nivel educativo refleja que los pacientes comprenden la importancia del apego y término de tratamiento.

Otro resultado observado fue que el sublinaje LAM estuvo asociado con la presencia de cavitaciones, el consumo de alcohol, la DM2 y la baciloscopia con tres o más cruces. Se han informado resultados similares previamente sobre la presencia de manifestaciones más severas en pacientes con DM2 y TB (Jiménez-Corona et al., 2013; Armstrong et al., 2020). Así mismo, se ha reportado que la presencia de cavitaciones en TB pulmonar tiende a ser más contagiosa/transmisible debido a la carga bacilar alta (Palaci et al., 2007). Estos resultados respaldan lo descrito por Pasopanodya y cols., quienes describen que las cepas de linajes modernos como el Euro-Americano desarrollaron propiedades no letales, pero producen daño en pulmón lo que incrementa su capacidad de

diseminación entre la población (Pasipanodya et al., 2013). Por ello, en México, con el incremento de la población con DM2 y la presencia de *M. tuberculosis* con sublinaje LAM puede producir mayor transmisión de TB debido al daño pulmonar. Por lo que sugerimos implementar la genotipificación de aislados de *M. tuberculosis* con el uso del panel 24-loci MIRU-VNTR en México y conocer el impacto del sublinaje LAM.

En el presente estudio, la formación de conglomerados por el número y posición de SNP entre los 12 aislados secuenciados fue similar a la obtenida a partir de la genotipificación por el panel 24-loci MIRU-VNTR. Encontramos que los aislados con patrones de MIRU-VNTR diferentes presentaron mayor número y diferente posición de los SNP. Aunque la tipificación por MIRU-VNTR es menos informativa y precisa que la WGS, se puede utilizar como prueba de escrutinio inicial, para la identificación aproximada del sublinaje y la exclusión o la inclusión de aislados de una cadena de transmisión de TB. Nuestros resultados respaldan lo descrito previamente por Merker y cols., quienes informaron que aquellos aislados en conglomerados pueden ser analizados con base en los marcadores MIRU-VNTR antes de la WGS, especialmente en ausencia de datos epidemiológicos de apoyo o cuando se sabe que la diversidad genética de la población es restringida (Merker et al., 2017). Por lo anterior, recomendamos realizar la secuenciación preferentemente en aquellos aislados que previamente se presentaron en conglomerado por herramientas como MIRU-VNTR en regiones con alta carga de TB y cepas comunes circulantes.

Otro aspecto a considerar es que se desconoce un vínculo epidemiológico entre los casos de los aislados de *M. tuberculosis* en conglomerados. Como ha sido descrito anteriormente, resolver los eventos de transmisión adecuadamente es un desafío en países y regiones con carga alta de TB donde se sospecha que podrían existir múltiples casos que actúan como fuente de infección o bien la transmisión por contactos casuales (Dixit et al., 2019).

Respecto al análisis de WGS, los aislados de 2000 y 2004 del Grupo I presentaron 11 SNP de diferencia distribuidos de manera similar, nuestros resultados concuerdan con el punto de corte descrito anteriormente (≤ 12 SNP) para determinar transmisión reciente, por lo cual se infiere son resultado de un evento transmisión (Walker et al., 2013). Por otra

parte, los aislados de los años 2002 y 2006 del Grupo I con una diferencia >12 SNP no se consideraron como involucrados en la transmisión directa (Nikolayevskyy et al., 2019). Muy probablemente los aislados con una diferencia >12 SNP podrían haber participado como intermediarios en la cadena de transmisión ya que estos casos comunicaron haber tenido contacto con pacientes con TB distintos a los incluidos en el análisis de secuenciación. Por lo que sería necesario incrementar el número de aislados secuenciados para inferir con mayor precisión la dinámica de la transmisión.

Con base en la posición y la distancia de SNP en los aislados del Grupo II, se observó que la distancia más pequeña fue entre los aislados de 2000 y 2002 (2-3 SNP). Recientemente Nicolayevskyy y cols., basándose en la tasa de mutaciones y observaciones epidemiológicas propusieron un punto de corte <6 SNP para indicar transmisión reciente, definida como la transmisión que ha ocurrido en los últimos tres años (Walker et al., 2013; Nikolayevskyy et al., 2019). Estos resultados son respaldados por la proximidad entre los años de diagnóstico de los casos y la presencia de DM2 como co-morbilidad. Se ha descrito que los pacientes con DM2 presentan alteraciones de la respuesta inmune facilitando la infección primaria por *M. tuberculosis* o bien la reactivación de la enfermedad (Kumar Nathella and Babu, 2017). Por lo anterior, es posible que los pacientes con DM2 desarrollen TB primaria lo que se traduciría en un número menor de SNP como se observa en nuestros resultados; sin embargo, es necesario realizar más estudios.

Adicionalmente, en el Grupo II el aislado del año 2006 difiere con solo 11 SNP del aislado más cercano. Ya que la posición de SNP no coincide con el de los demás aislados, podría asumirse como parte del evento de transmisión por el número de SNP. Sin embargo, suponemos se trata de un caso intermedio o un nuevo sub-cluster como lo observado previamente en un estudio de transmisión de TB en España (Abascal et al., 2019). Sin embargo, sería necesario realizar la secuenciación a un mayor número de aislados con el mismo patrón de MIRU-VNTR.

Con los datos de WGS confirmamos el sublinaje de diez aislados Haarlem 4.1.2.1., y re-clasificamos dos aislados, uno como sublinaje X 4.1.1.3 y otro como LAM 4.3.4.1. Previamente ha sido descrito que en regiones con transmisión continua de TB usualmente se identifican un gran número de cepas cercanamente relacionadas como lo observado en

este estudio (Luo et al., 2014; Amlerova et al., 2018). Por lo que el uso de WGS favorece a la epidemiología al determinar variaciones genéticas sustanciales que permiten distinguir entre varios genotipos, el origen geográfico y evolución de las cepas especialmente en *M. tuberculosis* considerado genéticamente monomórfica y con muy poca diversidad genética.

En este estudio encontramos una mutación en el gen *rpsL* que se ha descrito confiere resistencia a STR. Anteriormente en un par de estudios en México, la mutación en *rpsL* (Lys88Arg) se ha descrito como la segunda más común encontrada en 4/18 aislados y 1/6 aislados de *M. tuberculosis* (Cuevas-Córdoba et al., 2013; Madrazo-Moya et al., 2019). De acuerdo con estudios previos en España y China se ha observado que la mutación en el gen *rpsL* está asociada con niveles elevados de la concentración mínima inhibitoria (MIC ≥ 512 mg/L) (Tudó et al., 2010; Dai et al., 2021). Por ello, sería necesario realizar pruebas de susceptibilidad en aquellos pacientes que presenten falla a tratamiento, además podría servir como un marcador subrogado de monitoreo de la transmisión de la TB, por ejemplo: casos con el mismo patrón genotípico y de resistencia (STR) como el grupo de aislados observados en este estudio.

Para la resistencia a INH se detectaron tres diferentes mutaciones, la más común fue en el gen *katG* (Ser315Thr) encontrada en dos aislados. Este hallazgo es consistente con varios estudios que han demostrado que la mutación *katG* (Ser315Thr) es la más frecuente asociada con la resistencia a INH tanto en México como en otros países (Walker et al., 2015; Juarez-Eusebio et al., 2017). Un aislado además presentó una segunda mutación en la región promotora de *fabG-inhA* -15C>T. Nuestros resultados son similares a los observados en un estudio reciente en Brasil, en el cual detectaron la mutación en la región promotora *fabG-inhA* -15C>T en 29/156 (18.6%) aislados y en 9/156 (5.8%) aislados presentaron mutaciones tanto en *katG* (Ser315Thr) + *fabG-inhA* (Matsui et al., 2020). En el aislados MDR identificamos una inserción (ins \rightarrow -88-87 AT) en la región promotora de *oxyR-ahpC*. Aunque esta mutación no ha sido reportada previamente en México, ha sido descrita por varios autores los cuales han observado mutaciones en diferentes posiciones de la región intergénica de *oxyR-ahpC* tanto en aislados mono-resistentes a INH como aislados MDR. Nuestros resultados respaldan la hipótesis de que la ocurrencia de esta mutación es independiente de las mutaciones en el promotor de *katG* 315 e *inhA* y suficiente para

producir la resistencia a INH (Vilchèze and Jacobs JR., 2014; Jagielski et al., 2015). Además, se ha sugerido como una alteración compensatoria que ocurre por la pérdida de la actividad de la catalasa-peroxidasa (*katG*) y que ocurre con baja frecuencia, sin embargo, se ha asociado con el incremento del nivel de resistencia para INH (Sherman et al., 1996; Liu et al., 2018). Estos resultados indican la gran variabilidad que existe en el perfil de mutaciones que confieren resistencia a INH, dicha variabilidad podría funcionar como un marcador alternativo de transmisión, y podría tener implicaciones importantes sobre el éxito a tratamiento, por ello es necesario considerar realizar la búsqueda de mutaciones a partir de datos de secuenciación.

La mutación que confirió resistencia a RIF identificada en el presente estudio fue *rpoB* (Ser450Leu). Nuestros resultados concuerdan con un estudio previo en el que utilizaron los datos de más de 3,500 genomas de *M. tuberculosis*, y observaron que la mutación *rpoB* (Ser450Leu) es dominante para la resistencia a RIF (Walker et al., 2015).

Además, en este trabajo se observó la mutación en el gen *embB* (Met306Val) en aislados susceptibles a EMB por pruebas fenotípicas. Resultados similares fueron reportados en un estudio previamente que incluyó aislados de diversas partes del mundo y México, observaron la mutación *embB* (Met306Val) en 100 aislados de los cuales solo 55 fueron resistentes, y concluyeron que dicha mutación puede también estar presente en aislados susceptibles a EMB (Hazzón et al., 2005). Asimismo, nuestros resultados concuerdan con un estudio previo que describe la posible asociación entre la mutación en el gen *embB* (Met306Val) y la resistencia a EMB, encontraron la mutación en 9 aislados resistentes y en 11 susceptibles (Bakula et al., 2013). Otro estudio evaluó el uso de datos de WGS para predecir resistencia a fármacos, y observaron la mutación *embB* (Met306Ile) en 34/50 (68%) aislados fenotípicamente susceptibles (Walker et al., 2015). Por lo que nuestros resultados respaldan que la mutación en *embB* no es un marcador lo suficientemente confiable para predecir la resistencia a EMB.

11.CONCLUSIONES.

Este estudio aporta al conocimiento de la diversidad genética global de *M. tuberculosis* en una zona de alta incidencia en México. Los sublinajes Haarlem y LAM parecen ser endémicos en Orizaba, Veracruz. La tasa de resistencia primaria y la transmisión de la resistencia fueron elevadas. La historia de tratamiento previo y el sublinaje LAM se asociaron a la TB-MDR. El RTI en la población fue alto. Se encontró un alto poder discriminatorio en ocho alelos, QUB26, QUB11b, Mtub04, MIRU40, MIRU10, Mtub30, QUB4156 y MIRU23. El método 24-*loci* MIRU-VNTR es una herramienta eficaz para la genotipificación, para realizar análisis filogenéticos y análisis epidemiológicos en zonas con alta incidencia de TB.

Además, este estudio aporta resultados relevantes sobre la asociación entre la presencia de cavitaciones, el sublinaje LAM y comorbilidades. La falla a tratamiento se asoció con sublinajes distintos de Haarlem y LAM. La posible asociación de EAI en pacientes con DM2 y cavitaciones. Describimos que la diversidad genética del linaje 4 de *M. tuberculosis* juega un papel esencial en la presentación de la enfermedad, misma que podría tener implicaciones importantes para dirigir el tratamiento y mejor control de la TB en México.

Por último, en este estudio la implementación de una herramienta de mayor resolución como la WGS en casos conglomerados a partir de los resultados de genotipificación por 24-*loci* MIRU-VNTR, fue útil para confirmar o excluir los posibles eventos de transmisión directa, al determinar el número y posición de SNP entre los aislados. Igualmente, se confirmaron y re-clasificaron los genotipos de los aislados secuenciados de manera más precisa. Además, la WGS permitió identificar mutaciones en genes que confirieron resistencia a los principales fármacos utilizados para el tratamiento contra TB, siempre respaldadas con pruebas fenotípicas.

12.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abascal, E., Pérez-Lago, L., Martínez-Lirola, M., Chiner-Oms, Á., Herranz, M., Chaoui, I., Comas, I., El Messaoudi, M.D., Cárdenas, J.A.G., Santantón, S., Bouza, E., García-de-Viedma, D., 2019. Whole genome sequencing-based analysis of tuberculosis (TB) in migrants: Rapid tools for crossborder surveillance and to distinguish between recent transmission in the host country and new importations. *Eurosurveillance*. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.4.1800005
- Allix-Béguec, C., Wahl, C., Hanekom, M., Nikolayevskyy, V., Drobniewski, F., Maeda, S., Campos-Herrero, I., Mokrousov, I., Niemann, S., Kontsevaya, I., Rastogi, N., Samper, S., Sng, L.H., Warren, R.M., Supply, P., 2014. Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of mycobacterium tuberculosis Beijing isolates. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.02519-13
- Amlerova, J., Bitar, I., Hrabak, J., 2018. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis using whole genome sequencing. *Folia Microbiol. (Praha)*. doi:10.1007/s12223-018-0599-y
- Armstrong, L.R., Steve Kammerer, J., Haddad, M.B., 2020. Diabetes mellitus among adults with tuberculosis in the USA, 2010-2017. *BMJ Open Diabetes Res. Care*. doi:10.1136/bmjdr-2020-001275
- Báez-Saldaña, R., Delgado-Sánchez, G., García-García, L., Cruz-Hervert, L.P., Montesinos-Castillo, M., Ferreyra-Reyes, L., Bobadilla-Del-Valle, M., Canizales-Quintero, S., Ferreira-Guerrero, E., Téllez-Vázquez, N., Montero-Campos, R., Yanes-Lane, M., Mongua-Rodriguez, N., Martínez-Gamboa, R.A., Sifuentes-Osornio, J., Ponce-De-León, A., 2016. Isoniazid mono-resistant tuberculosis: Impact on treatment outcome and survival of pulmonary tuberculosis patients in Southern Mexico 1995-2010. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0168955
- Bakuła, Z., Napiórkowska, A., Bielecki, J., Augustynowicz-Kopec, E., Zwolska, Z., Jagielski, T., 2013. Mutations in the embB gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Poland. *Biomed Res. Int.* doi:10.1155/2013/167954
- Bañuls, A.L., Sanou, A., Van Anh, N.T., Godreuil, S., 2015. Mycobacterium tuberculosis: Ecology and evolution of a human bacterium. *J. Med. Microbiol.* doi:10.1099/jmm.0.000171
- Barbier, M., Wirth, T., 2016. The Evolutionary History, Demography, and Spread of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Microbiol. Spectr.* doi:10.1128/microbiolspec.tb2-0008-2016
- Behr, M. A., Edelstein, P. H., & Ramakrishnan, L., 2018. Revisiting the timetable of tuberculosis. *BMJ*. 362. doi:10.1136/bmj.k2738
- Bjorn-Mortensen, K., Soborg, B., Koch, A., Ladefoged, K., Merker, M., Lillebaek, T., Andersen, A.B., Niemann, S., Kohl, T.A., 2016. Tracing Mycobacterium tuberculosis transmission by whole genome sequencing in a high incidence setting: A retrospective

population-based study in East Greenland. *Sci. Rep.* 6, 33180. doi:10.1038/srep33180

- Black, A.T., Hamblion, E.L., Buttivant, H., Anderson, S.R., Stone, M., Casali, N., Drobniewski, F., Nwoguh, F., Marshall, B.G., Booth, L., 2018. Tracking and responding to an outbreak of tuberculosis using MIRU-VNTR genotyping and whole genome sequencing as epidemiological tools. *J. Public Heal. (United Kingdom)*. doi:10.1093/pubmed/fox075
- Bojorquez-Chapela, I., Bäcker, C.E., Orejel, I., López, A., Díaz-Quiñonez, A., Hernández-Serrato, M.I., Balandrano, S., Romero, M., Solís, M.M.T.R., Castellanos, M., Alpuche, C., Hernández-Ávila, M., López-Gatell, H., 2013. Drug resistance in Mexico: Results from the National Survey on Drug-Resistant Tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 17, 514–9. doi:10.5588/ijtld.12.0167
- Boritsch, E.C., Supply, P., Honoré, N., Seeman, T., Stinear, T.P., Brosch, R., 2014. A glimpse into the past and predictions for the future: The molecular evolution of the tuberculosis agent. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/mmi.12720
- Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Florensa, A.F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J.K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B.B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M.F., Duggett, N.A., Kempf, I., Nykäsenoja, S., Olkkola, S., Wiczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O., Aarestrup, F.M., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkaa345
- Bottai, D., Frigui, W., Sayes, F., Di Luca, M., Spadoni, D., Pawlik, A., Zoppo, M., Orgeur, M., Khanna, V., Hardy, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., Ma, L., Bouchier, C., Tavanti, A., Larrouy-Maumus, G., Brosch, R., 2020. TbD1 deletion as a driver of the evolutionary success of modern epidemic *Mycobacterium tuberculosis* lineages. *Nat. Commun.* doi:10.1038/s41467-020-14508-5
- Brites, D., Gagneux, S., 2017. the nature and evolution of genomic diversity in the mycobacterium tuberculosis Complex, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/978-3-319-64371-7_1
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., Van Soolingen, D., Cole, S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.052548299
- Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W.M., Gori, A., Al-Hajoj, S.A., Allix, C., Aristimuño, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, C., Evans, J.T., Fauville-Dufaux, M., Ferdinand, S., De Viedma, D.G., Garzelli, C., Gazzola, L., Gomes, H.M., Gutierrez, M.C., Hawkey, P.M., Van Helden, P.D., Kadival, G. V., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Kubin, M., Kulkarni, S.P., Liens, B., Lillebaek, T., Ho, M.L., Martin, Carlos, Martin, Christian,

- Mokrousov, I., Narvskaja, O., Yun, F.N., Naumann, L., Niemann, S., Parwati, I., Rahim, Z., Rasolofo-Razanamparany, V., Rasolonalona, T., Rossetti, M.L., Rüscher-Gerdes, S., Sajduda, A., Samper, S., Shemyakin, I.G., Singh, U.B., Somoskovi, A., Skuce, R.A., Van Soolingen, D., Streicher, E.M., Suffys, P.N., Tortoli, E., Tracevska, T., Vincent, V., Victor, T.C., Warren, R.M., Sook, F.Y., Zaman, K., Portaels, F., Rastogi, N., Sola, C., 2006. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: Mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* doi:10.1186/1471-2180-6-23
- Brynildsrud, O.B., Pepperell, C.S., Suffys, P., Grandjean, L., Monteserin, J., Debech, N., Bohlin, J., Alfsnes, K., Pettersson, J.O.H., Kirkeleite, I., Fandinho, F., Da Silva, M.A., Perdigao, J., Portugal, I., Viveiros, M., Clark, T., Caws, M., Dunstan, S., Thai, P.V.K., Lopez, B., Ritacco, V., Kitchen, A., Brown, T.S., Van Soolingen, D., O'Neill, M.B., Holt, K.E., Feil, E.J., Mathema, B., Balloux, F., Eldholm, V., 2018. Global expansion of Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Sci. Adv.* doi:10.1126/sciadv.aat5869
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature.* doi:10.1038/31159
- Coll, F., McNerney, R., Preston, M.D., Guerra-Assunção, J.A., Warry, A., Hill-Cawthorne, G., Mallard, K., Nair, M., Miranda, A., Alves, A., Perdigão, J., Viveiros, M., Portugal, I., Hasan, Z., Hasan, R., Glynn, J.R., Martin, N., Pain, A., Clark, T.G., 2015. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* doi:10.1186/s13073-015-0164-0
- Coll, P., García de Viedma, D., 2018. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* doi:10.1016/j.eimc.2018.01.001
- Conaty, S.J., Hayward, A.C., Story, A., Glynn, J.R., Drobniewski, F.A., Watson, J.M., 2004. Explaining risk factors for drug-resistant tuberculosis in England and Wales: Contribution of primary and secondary drug resistance. *Epidemiol. Infect.* doi:10.1017/S0950268804002869
- Coscolla, M., Gagneux, S., 2014. Consequences of genomic diversity in mycobacterium tuberculosis. *Semin. Immunol.* 26, 431–44. doi:10.1016/j.smim.2014.09.012
- Costa, E.R.D., Lazzarini, L.C.O., Perizzolo, P.F., Díaz, C.A., Spies, F.S., Costa, L.L., Ribeiro, A.W., Barroco, C., Schuh, S.J., Da Silva Pereira, M.A., Dias, C.F., Gomes, H.M., Unis, G., Zaha, A., Almeida Da Silva, P.E., Suffys, P.N., Rossettia, M.L.R., 2013. Mycobacterium tuberculosis of the RDRio genotype is the predominant cause of tuberculosis and associated with multidrug resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01511-12

- Cuevas-Córdoba, B., Cuellar-Sánchez, A., Pasissi-Crivelli, A., Santana-álvarez, C.A., Hernández-Illezcas, J., Zenteno-Cuevas, R., 2013. Rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* doi:10.1016/j.jmii.2012.08.020
- Dai, R., He, J., Zha, X., Wang, Yiting, Zhang, X., Gao, H., Yang, X., Li, J., Xin, Y., Wang, Yumeng, Li, S., Jin, J., Zhang, Qi, Bai, J., Peng, Y., Wu, H., Zhang, Qingwen, Wei, B., Xu, J., Li, W., 2021. A novel mechanism of streptomycin resistance in *Yersinia pestis*: Mutation in the *rpsL* gene. *PLoS Negl. Trop. Dis.* doi:10.1371/journal.pntd.0009324
- Dale, J.W., Brittain, D., Cataldi, A.A., Cousins, D., Crawford, J.T., Driscoll, J., Heersma, H., Lillebaek, T., Quitugua, T., Rastogi, N., Skuce, R.A., Sola, C., Van Soolingen, D., Vincent, V., 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: Recommendations for standardised nomenclature. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*
- Davidson, J.A., Thomas, H.L., Maguire, H., Brown, T., Burkitt, A., MacDonald, N., Campbell, C.N.J., Lalor, M.K., 2018. Understanding Tuberculosis Transmission in the United Kingdom: Findings from 6 Years of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeats Strain Typing, 2010-2015. *Am. J. Epidemiol.* 187, 2233–2242. doi:10.1093/aje/kwy119
- Desikan, S., Narayanan, S., 2015. Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J. Med. Res.* doi:10.4103/0971-5916.160695
- Dheda, K., Barry, C.E., Maartens, G., 2016. Tuberculosis. *Lancet.* doi:10.1016/S0140-6736(15)00151-8
- Dixit, A., Freschi, L., Vargas, R., Calderon, R., Sacchettini, J., Drobniowski, F., Galea, J.T., Contreras, C., Yataco, R., Zhang, Z., Lecca, L., Kolokotronis, S.O., Mathema, B., Farhat, M.R., 2019. Whole genome sequencing identifies bacterial factors affecting transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a high-prevalence setting. *Sci. Rep.* doi:10.1038/s41598-019-41967-8
- Duchêne, S., Holt, K.E., Weill, F.X., Le Hello, S., Hawkey, J., Edwards, D.J., Fourment, M., Holmes, E.C., 2016. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microb. genomics.* doi:10.1099/mgen.0.000094
- Ei, P.W., Aung, W.W., Lee, J.S., Choi, G.E., Chang, C.L., 2016. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: A review of frequently used methods. *J. Korean Med. Sci.* doi:10.3346/jkms.2016.31.11.1673
- Ejo, M., Hassane-Harouna, S., Souleymane, M.B., Lempens, P., Dockx, J., Uwizeye, C., De Rijk, P., Decroo, T., Diro, E., Torrea, G., Rigouts, L., Piubello, A., de Jong, B.C., 2020. Multidrug-resistant patients receiving treatment in Niger who are infected with *M. tuberculosis* Cameroon family convert faster in smear and culture than those with *M. tuberculosis* Ghana family. *Tuberculosis.* doi:10.1016/j.tube.2020.101922

- Flores-López, C.A., Zenteno-Cuevas, R., Laniado-Laborín, R., Reynaud, Y., García-Ortiz, R.A., González-Y-Merchand, J.A., Rivera, S., Vázquez-Chacón, C.A., Vaughan, G., Martínez-Guarneros, J.A., Victoria-Cota, N.L., Cruz-Rivera, M., Rastogi, N., Muñoz-Salazar, R., 2017. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Baja California, Mexico: A result of human migration? *Infect. Genet. Evol.* 55, 378–383. doi:10.1016/j.meegid.2016.07.001
- Gagneux, S., 2018. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro.2018.8
- Gagneux, S., 2012. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* doi:10.1098/rstb.2011.0316
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., De Jong, B.C., Narayanan, S., Nicol, M., Niemann, S., Kremeri, K., Gutierrez, M.C., Hilty, M., Hopewell, P.C., Small, P.M., 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2869–73. doi:10.1073/pnas.0511240103
- Gagneux, S., Small, P.M., 2007. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(07)70108-1
- García-García, M.D.L., Palacios-Martínez, M., Ponce-de-Leon, A., Jiménez-Corona, M.E., Jiménez-Corona, A., Balandrano-Campos, S., Olivera-Díaz, H., Valdespino-Gómez, J.L., Small, P.M., 2000. The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*
- García-García, M.D.L., Small, P.M., Garcia-Sancho, C., Mayar-Maya, M.E., Ferreyra-Reyes, L., Palacios-Martinez, M., Jiménez, S., Canales, G., Quiroz, G., Yáñez, L., Valdespino-Gómez, J.L., 1999. Tuberculosis epidemiology and control in Veracruz, Mexico. *Int. J. Epidemiol.* 28, 135–40. doi:10.1093/ije/28.1.135
- García-García, M.L., Jiménez-Corona, M.E., Ponce-De-León, A., Jiménez-Corona, A., Palacios-Martínez, M., Balandrano-Campos, S., Ferreyra-Reyes, L., Juárez-Sandino, L., Sifuentes-Osornio, J., Olivera-Díaz, H., Valdespino-Gómez, J.L., Small, P.M., 2000. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in Southern Mexico, in: *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.
- Gardy, J.L., Johnston, J.C., Sui, S.J.H., Cook, V.J., Shah, L., Brodtkin, E., Rempel, S., Moore, R., Zhao, Y., Holt, R., Varhol, R., Birol, I., Lem, M., Sharma, M.K., Elwood, K., Jones, S.J.M., Brinkman, F.S.L., Brunham, R.C., Tang, P., 2011. Whole-Genome Sequencing and Social-Network Analysis of a Tuberculosis Outbreak. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/nejmoa1003176
- Global TB report, 2020. Global tuberculosis report 2020, World Health Organization.
- Grandjean, L., Iwamoto, T., Lithgow, A., Gilman, R.H., Arikawa, K., Nakanishi, N.,

- Martin, L., Castillo, E., Alarcon, V., Coronel, J., Solano, W., Aminian, M., Guezala, C., Rastogi, N., Couvin, D., Sheen, P., Zimic, M., Moore, D.A.J., 2015. The Association between mycobacterium tuberculosis genotype and drug resistance in Peru. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0126271
- Guthrie, J.L., Gardy, J.L., 2017. A brief primer on genomic epidemiology: lessons learned from *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* doi:10.1111/nyas.13273
- Guthrie, J.L., Strudwick, L., Roberts, B., Allen, M., McFadzen, J., Roth, D., Jorgensen, D., Rodrigues, M., Tang, P., Hanley, B., Johnston, J., Cook, V.J., Gardy, J.L., 2019. Whole genome sequencing for improved understanding of mycobacterium tuberculosis transmission in a remote circumpolar region. *Epidemiol. Infect.* doi:10.1017/S0950268819000670
- Gygli, S.M., Borrell, S., Trauner, A., Gagneux, S., 2017. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1093/femsre/fux011
- Hazbón, M.H., Bobadilla Del Valle, M., Guerrero, M.I., Varma-Basil, M., Filliol, I., Cavatore, M., Colangeli, R., Safi, H., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J., García-García, L., Davidow, A., Brimacombe, M., León, C.I., Porras, T., Bose, M., Chaves, F., Eisenach, K.D., Sifuentes-Osornio, J., Ponce De León, A., Cave, M.D., Alland, D., 2005. Role of embB codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: A novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.49.9.3794-3802.2005
- Hu, Y., Ma, X., Graviss, E.A., Wang, W., Jiang, W., Xu, B., 2011. A major subgroup of Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* is associated with multidrug resistance and increased transmissibility. *Epidemiol. Infect.* doi:10.1017/S0950268810000890
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–6. doi:10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988
- Jagielski, T., Bakula, Z., Roeske, K., Kamiński, M., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J., 2015. Mutation profiling for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkv253
- Jiménez-Corona, M.E., Cruz-Hervert, L.P., García-García, L., Ferreyra-Reyes, L., Delgado-Sánchez, G., Bobadilla-Del-Valle, M., Canizales-Quintero, S., Ferreira-Guerrero, E., Báez-Saldaña, R., Téllez-Vázquez, N., Montero-Campos, R., Mongua-Rodriguez, N., Martínez-Gamboa, R.A., Sifuentes-Osornio, J., Ponce-De-León, A., 2013. Association of diabetes and tuberculosis: Impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax*. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-201756
- Juarez-Eusebio, D.M., Munro-Rojas, D., Muñoz-Salazar, R., Laniado-Laborín, R., Martínez-Guarneros, J.A., Flores-López, C.A., Zenteno-Cuevas, R., 2017. Molecular

- characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from high prevalence tuberculosis states in Mexico. *Infect. Genet. Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2016.09.012
- Kato-Maeda, M., Metcalfe, J.Z., Flores, L., 2011. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: Application in epidemiologic studies. *Future Microbiol.* 6, 203–16. doi:10.2217/fmb.10.165
- Knechel, N.A., 2009. Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit. Care Nurse.* doi:10.4037/ccn2009968
- Kohl, T.A., Utpatel, C., Schleusener, V., De Filippo, M.R., Beckert, P., Cirillo, D.M., Niemann, S., 2018. MTBseq: A comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ.* doi:10.7717/peerj.5895
- Kolahian, S., Leiss, V., Nürnberg, B., 2019. Diabetic lung disease: fact or fiction? *Rev. Endocr. Metab. Disord.* doi:10.1007/s11154-019-09516-w
- Kumar Nathella, P., Babu, S., 2017. Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis. *Immunology.* doi:10.1111/imm.12762
- Liu, L., Jiang, F., Chen, L., Zhao, B., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Liu, B., Zhou, Y., Yang, J., Zhao, Y., Jin, Q., Zhang, X., 2018. The impact of combined gene mutations in *inhA* and *ahpC* genes on high levels of isoniazid resistance amongst *katG* non-315 in multidrug-resistant tuberculosis isolates from China. *Emerg. Microbes Infect.* doi:10.1038/s41426-018-0184-0
- Lopez-Avalos, G., Gonzalez-Palomar, G., Lopez-Rodriguez, M., Vazquez-Chacon, C.A., Mora-Aguilera, G., Gonzalez-Barrios, J.A., Villanueva-Arias, J.C., Sandoval-Diaz, M., Miranda-Hernández, U., Alvarez-Maya, I., 2017. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and transmission associated with first-line drug resistance: a first analysis in Jalisco, Mexico. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 11, 90–97. doi:10.1016/j.jgar.2017.07.004
- López-Rocha, E., Juárez-Álvarez, J., Riego-Ruiz, L., Enciso-Moreno, L., Ortega-Aguilar, F., Hernández-Nieto, J., Enciso-Moreno, J.A., López-Revilla, R., 2013. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosí, México. *BMC Res. Notes* 6, 172. doi:10.1186/1756-0500-6-172
- Luo, T., Yang, C., Peng, Y., Lu, L., Sun, G., Wu, J., Jin, X., Hong, J., Li, F., Mei, J., Deriemer, K., Gao, Q., 2014. Whole-genome sequencing to detect recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in settings with a high burden of tuberculosis. *Tuberculosis.* doi:10.1016/j.tube.2014.04.005
- Madrazo-Moya, C.F., Cancino-Muñoz, I., Cuevas-Córdoba, B., González-Covarrubias, V., Barbosa-Amezcu, M., Soberón, X., Muñoz-Salazar, R., Martínez-Guarneros, A., Bäcker, C., Zarrabal-Meza, J., Sampieri-Ramirez, C., Enciso-Moreno, A., Lauzardo, M., Comas, I., Zenteno-Cuevas, R., 2019. Whole genomic sequencing as a tool for

diagnosis of drug and multidrug-resistance tuberculosis in an endemic region in Mexico. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0213046

Mathema, B., Andrews, J.R., Cohen, T., Borgdorff, M.W., Behr, M., Glynn, J.R., Rustomjee, R., Silk, B.J., Wood, R., 2017. Drivers of Tuberculosis Transmission. *J. Infect. Dis.* doi:10.1093/infdis/jix354

Matsui, T., Pinhata, J.M.W., Rabello, M.C. da S., Brandão, A.P., Ferrazoli, L., Leão, S.C., Viana-Niero, C., de Oliveira, R.S., 2020. Frequency of first and second-line drug resistance-associated mutations among resistant mycobacterium tuberculosis clinical isolates from são paulo, brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* doi:10.1590/0074-02760200055

McEvoy, C.R.E., Cloete, R., Müller, B., Schürch, A.C., van Helden, P.D., Gagneux, S., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., 2012. Comparative analysis of mycobacterium tuberculosis *pe* and *ppe* genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0030593

Meehan, C.J., Goig, G.A., Kohl, T.A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., Farhat, M.R., Guthrie, J.L., Laukens, K., Miotto, P., Ofori-Anyinam, B., Dreyer, V., Supply, P., Suresh, A., Utpatel, C., van Soolingen, D., Zhou, Y., Ashton, P.M., Brites, D., Cabibbe, A.M., de Jong, B.C., de Vos, M., Menardo, F., Gagneux, S., Gao, Q., Heupink, T.H., Liu, Q., Loiseau, C., Rigouts, L., Rodwell, T.C., Tagliani, E., Walker, T.M., Warren, R.M., Zhao, Y., Zignol, M., Schito, M., Gardy, J., Cirillo, D.M., Niemann, S., Comas, I., Van Rie, A., 2019. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/s41579-019-0214-5

Merker, M., Kohl, T.A., Niemann, S., Supply, P., 2017. The evolution of strain typing in the mycobacterium tuberculosis complex, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/978-3-319-64371-7_3

Molina-Torres, C.A., Moreno-Torres, E., Ocampo-Candiani, J., Rendon, A., Blackwood, K., Kremer, K., Rastogi, N., Welsh, O., Vera-Cabrera, L., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 48, 448–55. doi:10.1128/JCM.01894-09

Munro-Rojas, D., Fernandez-Morales, E., Zarrabal-Meza, J., Martínez-Cazares, M.T., Parissi-Crivelli, A., Fuentes-Domínguez, J., Séraphin, M.N., Lauzardo, M., González-Y-Merchand, J.A., Rivera-Gutierrez, S., Zenteno-Cuevas, R., 2018. Genetic diversity of drug and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Veracruz, Mexico. *PLoS One* 13, e0193626. doi:10.1371/journal.pone.0193626

Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Secretaria de Salud, Diario Oficial de la Federación, Mexico, 2010

Nava-Aguilera, E., López-Vidal, Y., Harris, E., Morales-Pérez, A., Mitchell, S., Flores-Moreno, M., Villegas-Arrizón, A., Legorreta-Soberanis, J., Ledogar, R., Andersson,

- N., 2011. Clustering of mycobacterium tuberculosis cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 408375. doi:10.1155/2011/408375
- Ngabonziza, J.C.S., Loiseau, C., Marceau, M., Jouet, A., Menardo, F., Tzfidia, O., Antoine, R., Niyigena, E.B., Mulders, W., Fissette, K., Diels, M., Gaudin, C., Duthoy, S., Ssengooba, W., André, E., Kaswa, M.K., Habimana, Y.M., Brites, D., Affolabi, D., Mazarati, J.B., de Jong, B.C., Rigouts, L., Gagneux, S., Meehan, C.J., Supply, P., 2020. A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat. Commun.* doi:10.1038/s41467-020-16626-6
- Niemann, S., Merker, M., Kohl, T., Supply, P., 2016. Impact of Genetic Diversity on the Biology of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains . *Microbiol. Spectr.* doi:10.1128/microbiolspec.tb2-0022-2016
- Nikolayevskyy, V., Niemann, S., Anthony, R., van Soolingen, D., Tagliani, E., Ködmön, C., van der Werf, M.J., Cirillo, D.M., 2019. Role and value of whole genome sequencing in studying tuberculosis transmission. *Clin. Microbiol. Infect.* doi:10.1016/j.cmi.2019.03.022
- Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M., 2016. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* doi:10.1038/nrdp.2016.76
- Palaci, M., Dietze, R., Hadad, D.J., Ribeiro, F.K.C., Peres, R.L., Vinhas, S.A., Maciel, E.L.N., Dettoni, V.D.V., Horter, L., Boom, W.H., Johnson, J.L., Eisenach, K.D., 2007. Cavitory disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01780-07
- Pasipanodya, J.G., Moonan, P.K., Vecino, E., Miller, T.L., Fernandez, M., Slocum, P., Drewyer, G., Weis, S.E., 2013. Allopatric tuberculosis host-pathogen relationships are associated with greater pulmonary impairment. *Infect. Genet. Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2013.02.015
- Perdigão, J., Silva, H., Machado, D., Macedo, R., Maltez, F., Silva, C., Jordao, L., Couto, I., Mallard, K., Coll, F., Hill-Cawthorne, G.A., McNerney, R., Pain, A., Clark, T.G., Viveiros, M., Portugal, I., 2014. Unraveling genomic diversity and evolution in lisbon, portugal, a highly drug resistant setting. *BMC Genomics* 15. doi:10.1186/1471-2164-15-991
- Ponce-De-Leon, A., Garcia-Garcia, M.D.L., Garcia-Sancho, M.C., Gomez-Perez, F.J., Valdespino-Gomez, J.L., Olaiz-Fernandez, G., Rojas, R., Ferreyra-Reyes, L., Cano-Arellano, B., Bobadilla, M., Small, P.M., Sifuentes-Osornio, J., 2004. Tuberculosis and diabetes in Southern Mexico. *Diabetes Care.* doi:10.2337/diacare.27.7.1584
- Pradipta, I.S., Forsman, L.D., Bruchfeld, J., Hak, E., Alffenaar, J.W., 2018. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* doi:10.1016/j.jinf.2018.10.004
- Realpe, T., Correa, N., Roza, J.C., Ferro, B.E., Gomez, V., Zapata, E., Ribon, W., Puerto,

- G., Castro, C., Nieto, L.M., Diaz, M.L., Rivera, O., Couvin, D., Rastogi, N., Arbelaez, M.P., Robledo, J., 2014. Population structure among Mycobacterium tuberculosis isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. PLoS One 9, e93848. doi:10.1371/journal.pone.0093848
- Reichler, M.R., Khan, A., Sterling, T.R., Zhao, H., Moran, Joyce, McAuley, James, Bessler, P., Mangura, Bonita, Bakhtawar, I., LeDoux, C., McAuley, J., Beison, J., Fitzgerald, M., Naus, M., Nakajima, M., Schluger, N., Hirsch-Moverman, Y., Moran, J., Blumberg, H., Tapia, J., Singha, L., Hershfeld, E., Roche, B., Mangura, B., Sevilla, A., Sterling, T., Chavez-Lindell, T., Maruri, F., Dorman, S., Cronin, W., Munk, E., 2018. Risk and timing of tuberculosis among close contacts of persons with infectious tuberculosis, in: Journal of Infectious Diseases. doi:10.1093/infdis/jiy265
- Restrepo, B.I., Schlesinger, L.S., 2013. Host-pathogen interactions in tuberculosis patients with type 2 diabetes mellitus. Tuberculosis. doi:10.1016/S1472-9792(13)70004-0
- Roetzer, A., Diel, R., Kohl, T.A., Rückert, C., Nübel, U., Blom, J., Wirth, T., Jaenicke, S., Schuback, S., Rüsche-Gerdes, S., Supply, P., Kalinowski, J., Niemann, S., 2013. Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a Mycobacterium tuberculosis Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study. PLoS Med. doi:10.1371/journal.pmed.1001387
- Safi, H., Barnes, P.F., Lakey, D.L., Shams, H., Samten, B., Vankayalapati, R., Howard, S.T., 2004. IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04037.x
- Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Arain, T.M., Morris, S.L., Barry, C.E., Stover, C.K., 1996. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. Science (80-.). doi:10.1126/science.272.5268.1641
- Standards, D., 2000. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. THIS OFFICIAL STATEMENT OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY AND THE CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION WAS ADOPTED BY THE ATS BOARD OF DIRECTORS, JULY 1999. Am. Thorac. Soc. Am J Respir Crit Care Med 161, 1376–1395.
- Stucki, D., Brites, D., Jeljeli, L., Coscolla, M., Liu, Q., Trauner, A., Fenner, L., Rutaihua, L., Borrell, S., Luo, T., Gao, Q., Kato-Maeda, M., Ballif, M., Egger, M., Macedo, R., Mardassi, H., Moreno, M., Vilanova, G.T., Fyfe, J., Globan, M., Thomas, J., Jamieson, F., Guthrie, J.L., Asante-Poku, A., Yeboah-Manu, D., Wampande, E., Ssengooba, W., Joloba, M., Boom, W.H., Basu, I., Bower, J., Saraiva, M., Vasconcellos, S.E.G., Suffys, P., Koch, A., Wilkinson, R., Gail-Bekker, L., Malla, B., Ley, S.D., Beck, H.P., De Jong, B.C., Toit, K., Sanchez-Padilla, E., Bonnet, M., Gil-Brusola, A., Frank, M., Penlap Beng, V.N., Eisenach, K., Alani, I., Ndung’U, P.W., Revathi, G., Gehre, F., Akter, S., Ntoumi, F., Stewart-Isherwood, L., Ntinginya, N.E., Rachow, A., Hoelscher, M., Cirillo, D.M., Skenders, G., Hoffner, S., Bakonyte, D., Stakenas, P., Diel, R., Crudu, V., Moldovan, O., Al-Hajoj, S., Otero, L., Barletta, F., Carter, E.J., Diero, L., Supply, P., Comas, I., Niemann, S., Gagneux, S., 2016. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and

geographically restricted sublineages. *Nat. Genet.* 48, 1535–1543. doi:10.1038/ng.3704

Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsche-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., De Haas, P., Van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C., Van Soolingen, D., 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4498–510. doi:10.1128/JCM.01392-06

Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C., 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x

Torkaman MR, Nasiri MJ, P, F., MH, S., M, M., AA, V., 2014. Estimation of Recent Transmission of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains among Iranian and Afghan Immigrants: A Cluster-Based Study. *J. Clin. DIAGNOSTIC Res.* 8, DC05-8. doi:10.7860/jcdr/2014/8886.4864

Tudó, G., Rey, E., Borrell, S., Alcaide, F., Codina, G., Coll, P., Martín-Casabona, N., Montemayor, M., Moure, R., Orcau, À., Salvadó, M., Vicente, E., González-Martín, J., 2010. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkq322

van Soolingen, D., de Haas, P.E., Kremer, K., 2003. Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacteria*. *Mycobacterium Tuberc. Protoc.* 54, 165–203. doi:10.1385/1-59259-147-7:165

Vilchèze, C., Jacobs JR., W.R., 2014. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol. Spectr.* doi:10.1128/microbiolspec.mgm2-0014-2013

Villa-Rosas, C., Laniado-Laborín, R., Ocegüera-Palao, L., 2015. Primary drug resistance in a region with high burden of tuberculosis. A critical problem. *Salud Publica Mex.* doi:10.21149/spm.v57i2.7414

Walker, T.M., Ip, C.L.C., Harrell, R.H., Evans, J.T., Kapatai, G., Dediccoat, M.J., Eyre, D.W., Wilson, D.J., Hawkey, P.M., Crook, D.W., Parkhill, J., Harris, D., Walker, A.S., Bowden, R., Monk, P., Smith, E.G., Peto, T.E.A., 2013. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: A retrospective observational study. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(12)70277-3

Walker, T.M., Kohl, T.A., Omar, S. V., Hedge, J., Del Ojo Elias, C., Bradley, P., Iqbal, Z., Feuerriegel, S., Niehaus, K.E., Wilson, D.J., Clifton, D.A., Kapatai, G., Ip, C.L.C., Bowden, R., Drobniowski, F.A., Allix-Béguec, C., Gaudin, C., Parkhill, J., Diel, R., Supply, P., Crook, D.W., Smith, E.G., Walker, A.S., Ismail, N., Niemann, S., Peto, T.E.A., Davies, J., Crichton, C., Acharya, M., Madrid-Marquez, L., Eyre, D., Wyllie,

- D., Golubchik, T., Munang, M., 2015. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: A retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(15)00062-6
- Yimer, S.A., Norheim, G., Namouchi, A., Zegeye, E.D., Kinander, W., Tønjum, T., Bekele, S., Mannsåker, T., Bjune, G., Aseffa, A., Holm-Hansen, C., 2015. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 7 strains are associated with prolonged patient delay in seeking treatment for pulmonary tuberculosis in Amhara region, Ethiopia. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.03566-14
- Zenteno-Cuevas, R., Mendoza-Damián, F., Muñoz, I.C., Enciso-Moreno, L., Pérez-Navarro, L.M., Ramírez-Hernández, M.D., Vázquez-Medina, K., Widrobo-García, L., Lauzardo, M., Enciso-Moreno, J.A., 2015. Description of the population structure and genetic diversity of tuberculosis in Estado de México, a low prevalence setting from Mexico. *APMIS* 123, 116–22. doi:10.1111/apm.12312

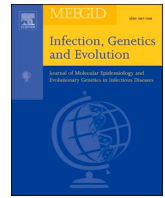
13.ANEXO (Artículo requisito para la obtención del grado).

Ordaz-Vázquez A, Torres-González P, Cruz-Hervert P, Ferreyra-Reyes L, Delgado-Sánchez G, García-García L, Kato-Maeda M, Ponce-De-León A, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-Del-Valle M. Genetic diversity and primary drug resistance transmission in *Mycobacterium tuberculosis* in southern Mexico. *Infect Genet Evol.* 2021 Jul 7;93:104994. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104994. PMID: 34245908.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Genetic diversity and primary drug resistance transmission in *Mycobacterium tuberculosis* in southern Mexico

Anabel Ordaz-Vázquez^a, Pedro Torres-González^a, Pablo Cruz-Hervert^b, Leticia Ferreyra-Reyes^c, Guadalupe Delgado-Sánchez^c, Lourdes García-García^c, Midori Kato-Maeda^d, Alfredo Ponce-De-León^a, José Sifuentes-Osornio^e, Miriam Bobadilla-Del-Valle^{a,*}

^a Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico

^b Departamento de Salud Pública y Epidemiología Oral, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

^c Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico

^d Division of Pulmonary, Critical Care, Allergy and Sleep Medicine, Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA

^e Departamento de Medicina, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis
Genetic diversity
MIRU-VNTR
Primary resistance
Transmission

ABSTRACT

Tuberculosis is a global human health threat, especially in developing countries. The present study aimed to describe the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and to measure the transmission rates of primary and acquired resistance. A total of 755 *M. tuberculosis* isolates from a cohort study of patients with culture-confirmed pulmonary tuberculosis in Orizaba, Veracruz, performed between 1995 and 2010 were genotyped by the 24-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR) method. Drug susceptibility was determined. Logistic regression models were constructed to identify the variables associated with resistance and clusters. The recent transmission index (RTI), the Hunter-Gaston discrimination index (HGDI) for the MIRU-VNTR test and allelic diversity (h) were calculated. The Haarlem and LAM lineages were the most common in the population. A total of 519 isolates were grouped into 128 clusters. The overall drug resistance rate was 19%, isoniazid monoresistance (10%) was the most common, and 3.4% of the isolates were multidrug resistant. Among the 116 isolates resistant to at least one drug, the primary and acquired resistance rates were 81.9% and 18.1%, respectively. Primary resistance was associated with belonging to a cluster (aOR 4.05, 95% CI 1.5–11.2, $p = 0.007$). Previous treatment history (aOR 9.05, 95% CI 3.6–22.5, $p < 0.001$) and LAM lineage (aOR 4.25, 95% CI 1.4–12.7, $p = 0.010$) were associated with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). The RTI was 51.7%, and the 24-locus MIRU-VNTR HGDI was 0.98. The alleles with the greatest diversity were 4056-QUB26 ($h = 0.84$), 2163b-QUB11b ($h = 0.79$), and 424-Mtub04 ($h = 0.72$). Primary resistance transmission, high LAM lineage prevalence and its association with MDR-TB represent public health problems. The implementation of molecular tools is needed to improve the existing control surveillance tuberculosis program.

1. Introduction

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. In 2019, the World Health Organization (WHO) estimated that 10 million people developed tuberculosis and 1.4 million people died from it. In Mexico, the incidence of tuberculosis was 23 cases/100,000 inhabitants, multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and rifampicin resistance (RR-TB) were reported in 970 cases, and the proportions of cases involving resistant strains were 2.6% among new cases and 11% among previously treated cases (WHO, 2020). The state of

Veracruz in southern Mexico has the highest number of tuberculosis cases (1895) nationwide (CENAPRECE, 2020). The incidence in the municipality of Orizaba, Veracruz, where we have performed extensive epidemiologic studies, was 16–38 cases/100,000 inhabitants during the period 1995–2010, surpassing the national incidence (Blanco-Guillot et al., 2018).

In this cohort we have studied and reported the disease burden, the factors associated with mortality, the association between diabetes and tuberculosis, one of the major concerns in Mexico, among other issues (Jiménez-Corona et al., 2013; Jiménez-Corona et al., 2006; Cruz-Hervert

* Corresponding author at: Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Sección XVI, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico.

E-mail address: miriam.bobadillav@incmnsz.mx (M. Bobadilla-Del-Valle).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104994>

Received 16 February 2021; Received in revised form 28 June 2021; Accepted 4 July 2021

Available online 7 July 2021

1567-1348/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

et al., 2012). This cohort, of pulmonary tuberculosis is one of the largest and most important in our country. During the study, isolates were genotyped by RFLP-IS6110, to know disease transmission; however, with this methodology it is not possible to classify the *M. tuberculosis* isolates into lineages for genetic diversity study (García-García et al., 2000).

Despite the high incidence of tuberculosis previously described in Orizaba, Veracruz, the local genetic diversity of *M. tuberculosis* is unknown. In Mexico, the estimated burdens of primary and acquired resistance have been poorly described. For that reason, the aim of this study was to describe the genetic diversity of *M. tuberculosis* using the 24-locus MIRU-VNTR method and to measure the transmission rates of primary and acquired resistance.

2. Materials and methods

2.1. Study design and population

We recruited 1132 patients who had been diagnosed with pulmonary tuberculosis from 1995 to 2010. The study area included 12 municipalities in the Orizaba Health Jurisdiction in the state of Veracruz, Mexico. These municipalities cover an area of 618.11 km² and are occupied by 413,223 inhabitants, 26.3% of whom live in rural communities (Blanco-Guillot et al., 2018). We recovered 612 isolates from a strain bank and 143 more from a DNA bank. For this study, 755 (66.7%) *M. tuberculosis* isolates were genotyped. Sociodemographic and clinical data were obtained from each patient. The study was approved by the institutional ethics and research committees (Ref. No. 1515; July 15th 2015).

2.2. Recovery of *Mycobacterium tuberculosis* isolates

The 612 isolates were thawed and cultured in mycobacteria growth indicator tube (MGIT) medium in BACTEC MGIT 960® (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA). Positive cultures were propagated in 20 mL of Middlebrook 7H9 broth (BD) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose, and catalase (OADC) (BD) and incubated at 37 °C in a 7.5% CO₂ atmosphere for 45 days. Culture purity was assessed by Ziehl-Neelsen staining.

2.3. DNA extraction

DNA was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide method (van Soolingen et al., 2003).

2.4. Susceptibility tests

Antimicrobial susceptibility tests were performed in 612 (81%) isolates on a BACTEC 460® radiometric system (BD). The first-line drugs tested were isoniazid (INH) (0.1 µg/mL), rifampicin (RIF) (2.0 µg/mL), ethambutol (EMB) (7.5 µg/mL), and streptomycin (STR) (6.0 µg/mL).

2.5. Typing by 24-locus MIRU-VNTR

M. tuberculosis isolates were typed using the MIRU-VNTR typing kit (GenoScreen, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. Fragments were separated by capillary electrophoresis in an ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the GeneScan 1200 LIZ standard (Applied Biosystems) was used as sizing fragments. Fragment size and repeat number were determined using GeneMapper v4.1 software (Applied Biosystems). Finally, a MIRU-VNTR numerical pattern was generated for each isolate (Supply et al., 2006).

2.6. Typing data analysis

Lineages were assigned according to the international database [www](http://www.miru-vntrplus.org)

[.miru-vntrplus.org](http://www.miru-vntrplus.org) based on a similarity value of 0.37 (15/24 identical alleles). The MIRU-VNTR patterns were analyzed with the BioNumerics package v7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Isolate phylogeny was confirmed by an unweighted pair grouping method with arithmetic mean (UPGMA), generating a minimum spanning tree. Clusters were defined as isolates with identical patterns, and isolates missing one allele or both alleles were analyzed based on 23 out of 24 markers. The recent transmission index (RTI) was calculated using the $RTI_{n-1} = (nc - c)/n$ formula (Torkaman et al., 2014). The Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) was calculated. For each locus, allelic variability (*h*) was determined according to the formula $h = 1 - \sum_{xi}^2$ (Hunter and Gaston, 1988).

2.7. Statistical analysis

Adjusted unconditional logistic regression models were constructed to identify variables associated with belonging to clusters. The independent variable was a previous history of treatment, and the model was adjusted by sex and age. An analysis stratified by resistance to at least one drug was performed.

To identify the variables associated with MDR-TB, logistic regression models were adjusted and stratified by cluster. Lineage was considered an independent variable, and the model was adjusted by sex, age and previous history of treatment.

To construct the adjusted logistic regression models, initially saturated models were generated, and variables with *p* < 0.20 in the bivariate analysis and those with biological plausibility were included. Final models were considered when they were parsimonious and complied with the diagnosis. Statistical analyses were performed using STATA® v15 software.

3. Results

3.1. General population characteristics

Patient sociodemographic data are summarized in Table 1. Of the 755 patients, 688 (91%) were reported to have new tuberculosis cases, and 66 (9%) had been previously treated. The median age of the study population was 45 years (IQR = 32–59), 442 (59%) were male, and 250 (33%) had type 2 diabetes (DM2). Fever and hemoptysis occurred in 531/752 (71%) and 250/753 (33%) patients, respectively. Radiographic findings showed lymphadenopathy in 301/625 (48%) patients and cavitation in 282/626 (45%) patients.

3.2. Genetic diversity

Ninety-six percent of the clinical isolates belonged to lineage 4. The most frequent sublineage was Haarlem (419, 55.5%), followed by LAM (163, 21.6%), Cameroon (49, 6.5%), Uganda1 (28, 3.7%), Ghana (23, 3%), S (18, 2.4%), X (15, 2%) and TUR (15, 2%). Fifteen (2%) isolates were assigned to lineage 1, and 2 (0.3%) isolates were assigned to lineage 2. It was not possible to determine the lineage for eight isolates (1.1%), and therefore, these were considered to be unknown.

Overall, 519 (68.7%) isolates were grouped into 128 clusters, and 236 (31.3%) showed unique patterns based on the results of 24-locus MIRU-VNTR. The cluster size ranged from 2 to 67 isolates and showed the following size distribution: clusters with two patients: 63; three: 28; four: 13; five: 7; six: 5; seven: 4; eight: 2; and one cluster each with nine, 12, 13, 14, 33, and 67 patients. The RTI during the study period was 51.7%.

3.3. Resistance profile

Antimicrobial susceptibility testing was performed on 612 (81%) isolates; 496 (81%) were pansusceptible, and 116 (19%) were resistant to one or more drugs. Resistance to INH was found in 61 isolates (10%),

Table 1

Demographic and clinical characteristics of the patients with pulmonary tuberculosis in Orizaba, Veracruz, 1998–2010 ($n = 755$).

| Variables | Total cases | Percentage (%) |
|---|----------------------|----------------|
| Male sex | 442/755 | 59 |
| Age, years, median [IQR] | 45[32–59] | |
| Co-morbidities | | |
| HIV coinfection | 13/739 ^a | 1.7 |
| Diabetes mellitus | 250/755 | 33 |
| Smear microscopy | | |
| Paucibacillary | 103/755 | 14 |
| More than ten bacilli per oil immersion field | 211/755 | 28 |
| Clinical presentation | | |
| Fever | 531/752 ^a | 71 |
| Haemoptysis | 250/753 ^a | 33 |
| Cavities | 282/626 ^a | 45 |
| Radiographic findings | | |
| Pleural effusion | 71/625 ^a | 12 |
| Lymphadenopathy | 301/625 ^a | 48 |
| Nodule | 95/623 ^a | 15 |
| Treatment outcome | | |
| New case | 688/754 ^a | 91 |
| Relapse | 66/754 ^a | 9 |
| Cure | 532/755 | 70 |
| Default | 49/755 | 6 |
| Failure | 20/755 | 3 |
| Sociodemographic | | |
| More than six years of formal schooling | 507/754 ^a | 67 |
| House with dirt floor | 174/755 | 23 |
| Rural residence | 99/732 ^a | 14 |
| Access to social security | 254/755 | 34 |
| BCG-vaccinated | 352/751 ^a | 47 |

Abbreviations: IQR-interquartile range; HIV-human immunodeficiency virus; BCG-Bacillus Calmette-Guerin.

^a Because there were missing values for the characteristics of some of the tuberculosis patients, several of the numbers below do not sum to the group total.

to STR in 10 (1.6%), and resistance to RIF was found in 5 (0.8%). MDR (resistance to at least INH + RIF) was found in 21 (3.4%) isolates, and polyresistance (INH + STR) was found in 19 (3.1%) isolates.

3.4. Primary resistance and MDR-TB association

Among the 116 isolates resistant to at least one drug, 95 (81.9%) cases were diagnosed as new (primary resistance), and 21 (18.1%) cases were previously treated for tuberculosis (acquired resistance). On the other hand, we observed that 83 (71.5%) resistant isolates were in clusters, of which 73 (88%) were from new cases and 10 (12%) were from cases in previously treated patients; 33 (28.4%) presented unique patterns, of which 22 (66.7%) were from new cases and 11 (33.3%) were from previously treated patients (Fig. 1).

Using unconditional adjusted logistic regression models, the variables associated with clusters were identified and stratified by resistance to at least one drug. The models were adjusted by age and sex. We observed that isolates from patients with tuberculosis drug resistant (DR-TB) who had a new diagnosis were more likely to be found in clusters (adjusted Odds Ratio [aOR] 4.05, 95% Confidence Interval [CI] 1.5–11.2, $p = 0.007$) (Table 2).

To identify the variables associated with MDR-TB, unconditional adjusted logistic regression models were constructed with stratification by cluster. We observed that of all the patients included in the study, those who had been previously treated were more likely to have MDR-TB (aOR 9.05, 95% CI 3.6–22.5, $p < 0.001$); moreover, this likelihood was higher in patients with unique isolates (aOR 21.56, 95% CI 3.5–134.3, $p = 0.001$). We also observed that patients who had isolates that belonged to clusters and those who had been previously treated were more likely to have MDR-TB (aOR 6.85, 95% CI 2.2–21.0, $p = 0.001$), after adjustment by sex, age and lineage. Likewise, patients with isolates that belonged to a cluster with the LAM lineage were more likely

to have MDR-TB than those with isolates that belonged to other lineages (aOR 4.25, 95% CI 1.4–12.7, $p = 0.010$), after adjustment by sex, age and previous treatment (Table 3).

3.5. Distribution of primary resistance transmission

Fig. 2 shows the distribution of resistant isolates stratified by cluster, lineage, resistance pattern and year of isolation. Clones 1–7 show clusters with more than three resistant isolates. Clone 1 included 14 isolates that were of the Haarlem lineage with multiple resistance patterns, nine INH-resistant isolates diagnosed between 2001 and 2006, two MDR isolates diagnosed in 2002, two STR-resistant isolates diagnosed in 1998, and one polyresistant isolate diagnosed in 2006. Interestingly, we observed nine clusters with two resistant isolates diagnosed in the same year or proximal years.

3.6. Allelic diversity and MIRU-VNTR discriminatory power

We analyzed the allelic diversity of 24 loci individually (Table 4). The loci with the highest levels of diversity were 4056-QUB26 ($h = 0.84$), 2163b-QUB11b ($h = 0.79$), and 424-Mtub04 ($h = 0.72$). Those with the lowest levels of diversity were 154-MIRU02 ($h = 0.09$), 4348-MIRU39 ($h = 0.05$), and 2687-MIRU24 ($h = 0.04$). We observed small alleles (353 bp) in 19 isolates at 580-MIRU04. Likewise, double alleles were observed in 36 at 15 different loci, mainly 960-MIRU10 ($n = 5$) and 2163b-QUB11b ($n = 5$). The absence of alleles was observed at 960-MIRU10 ($n = 15$), 4052-QUB26 ($n = 4$), 577-ETR-C ($n = 3$), 2163b-QUB11b ($n = 1$), and 2531-MIRU23 ($n = 1$). For 24-locus MIRU-VNTR, the HGDI was 0.98.

4. Discussion

This study describes the genetic diversity of 755 *M. tuberculosis* isolates collected over 15 years. These isolates represent more than 50% of the tuberculosis cases in 12 municipalities in the sanitary jurisdictions in Orizaba, Veracruz in southern Mexico. In this study, the predominant lineage was lineage 4 (Euro-American), accounting for more than 96% of the isolates, mostly including the sublineages Haarlem and LAM (77%).

Lineage 4 has been detected in other regions of Mexico, indicating high endemicity (López-Rocha et al., 2013; Flores-López et al., 2017; Zenteno-Cuevas et al., 2015). Lineage 4 is the most geographically widespread and common lineage. According to phylogenetic studies, the current tuberculosis epidemiology is almost entirely due to historical migrations to America (Brynildsrud et al., 2018). Furthermore, the enhanced virulence of this lineage together with conditions such as overcrowding, adverse lifestyle factors, working conditions, and contact with individuals in the community could have facilitated the dissemination and adaptation of lineage 4 in this population.

Interestingly, the frequencies of isolates of the Haarlem (55.5%) and LAM (21.6%) sublineages were higher in this study than in other studies in Mexico, where the T lineage predominates (Zenteno-Cuevas et al., 2015; Molina-Torres et al., 2010; Lopez-Avalos et al., 2017). While a Colombian study on population structure presented results similar to ours, the Haarlem and LAM sublineages accounted for only 53.3%, far less than the 77% reported in the present study (Realpe et al., 2014). Since the success of a particular lineage is measured by its increase in frequency over time in a given population (Coscolla and Gagneux, 2014), this would suggest that the Haarlem and LAM sublineages have adapted well to the study population. Most likely, dissemination and lengthy circulation periods of isolates of these sublineages have generated many of the observed Haarlem (164) and LAM (99) variants, while also maintaining a certain degree of homogeneity. This finding supports the idea of a sympatric association between the human host and *M. tuberculosis* (Gagneux et al., 2006).

We also identified Cameroon (6.5%), UgandaI (3.7%), Ghana (3%), S

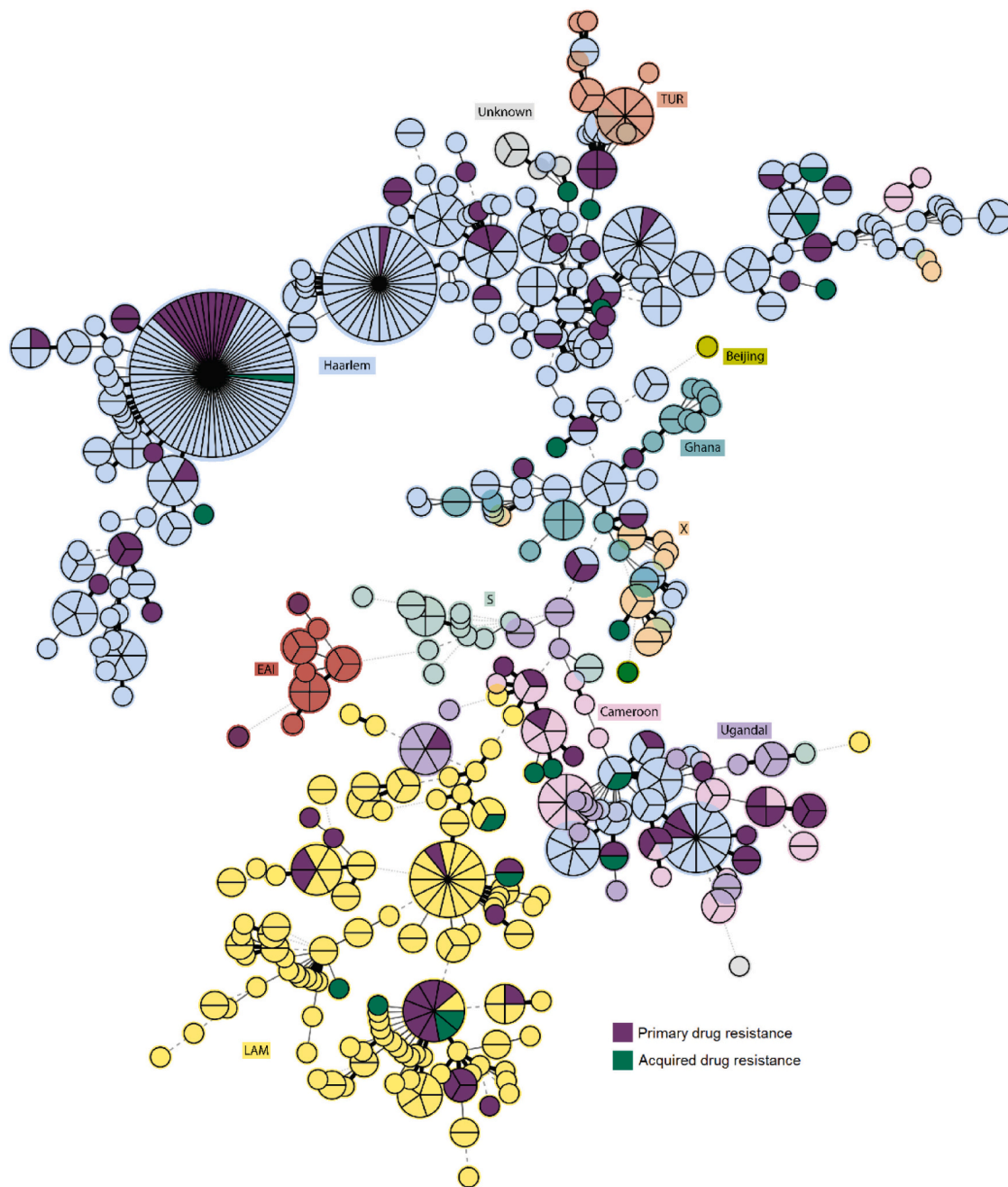


Fig. 1. Distribution of primary and acquired resistance among unique and clustered isolates. Minimum spanning tree analysis of 755 *M. tuberculosis* isolates illustrating the distribution of primary and acquired resistance. Big nodes represent clustered isolates with a similar MIRU-VNTR pattern. Small nodes represent isolates with a unique MIRU-VNTR pattern. Lines between nodes indicate genetic distance between genotypes, with shorter lines indicating more genetic similarity. Colors within nodes indicate distribution of primary (purple) and acquired (green) resistance. The background colors represent the sub lineages. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2
Variables associated with belonging to clusters, stratified by resistance to at least one drug.

| Variable | All | | Pansusceptible | | DR-TB | |
|-------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | (n = 755) | | (n = 496) | | (n = 116) | |
| | Odds ratio (95% CI) | p-value ^a | Odds ratio (95% CI) | p-value ^a | Odds ratio (95% CI) | p-value ^a |
| Sex (male) | 0.95 (0.7–1.3) | 0.726 | 1.18 (0.8–1.8) | 0.405 | 0.48 (0.2–1.2) | 0.123 |
| Age (years) | 0.99 (0.97–0.99) | 0.001 | 0.99 (0.9–1.0) | 0.054 | 0.98 (0.9–1.0) | 0.260 |
| New patient | 1.12 (0.6–1.9) | 0.686 | 0.66 (0.3–1.4) | 0.285 | 4.05 (1.5–11.2) | 0.007 |

DR-TB: tuberculosis drug resistant; CI, Confidence interval.

^a Unconditional adjusted logistic regression.

Table 3
Variables associated with MDR-TB, stratified by belonging to clusters.

| Variable | All (n = 612) | | Unique (n = 177) | | Clustered (n = 435) | |
|-----------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | Odds ratio (95% CI) | p-value ^a | Odds ratio (95% CI) | p-value ^a | Odds ratio (95% CI) | p-value ^a |
| Sex (male) | 1.03 (0.4–2.6) | 0.947 | 0.63 (0.1–3.9) | 0.620 | 1.13 (0.4–3.5) | 0.835 |
| Age (years) | 0.99 (0.9–1.0) | 0.364 | 0.97 (0.9–1.0) | 0.357 | 0.99 (0.9–1.0) | 0.799 |
| Previous treatment | 9.05 (3.6–22.5) | <0.001 | 21.56 (3.5–134.3) | 0.001 | 6.85 (2.2–21.0) | 0.001 |
| LAM lineage Vs others | 2.18 (0.8–5.7) | 0.109 | 0.31 (0.028–3.4) | 0.340 | 4.25 (1.4–12.7) | 0.010 |

MDR-TB, Multidrug-resistant tuberculosis; CI, Confidence interval.

^a Unconditional adjusted logistic regression.

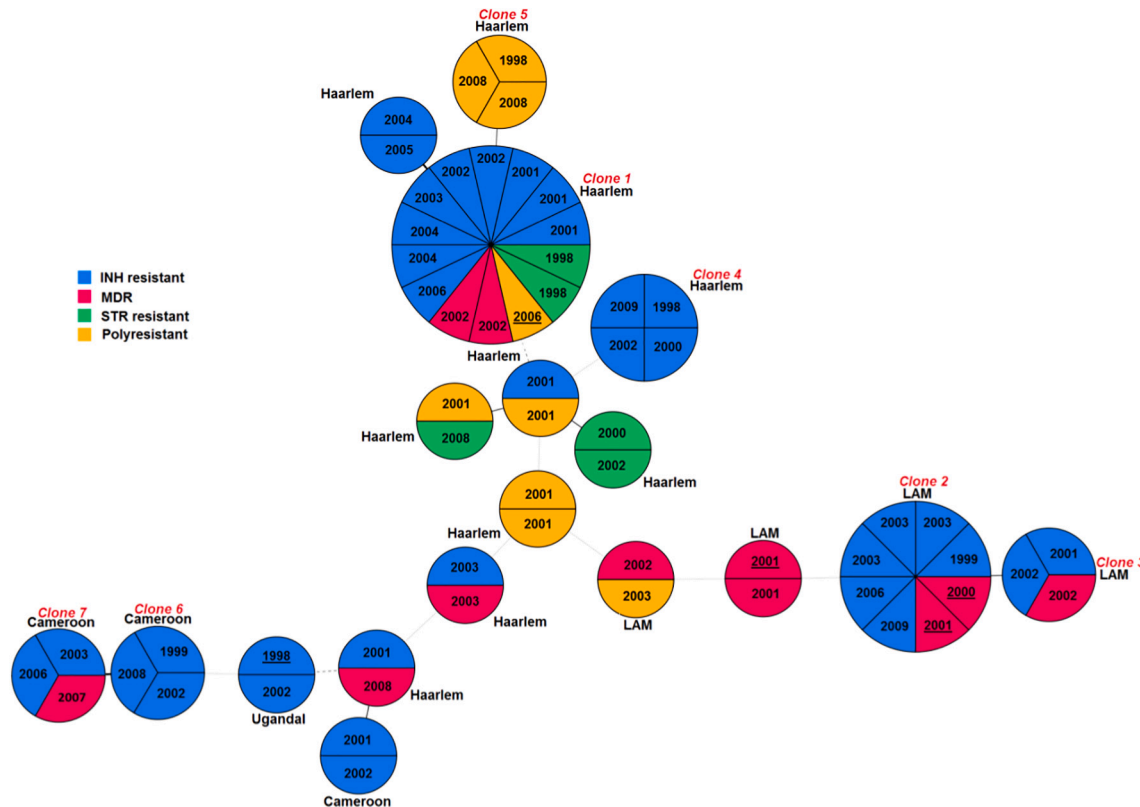


Fig. 2. Distribution of the isolates clustered with primary and acquired resistance plus lineages. Minimum spanning tree analysis illustrating the relationships among *M. tuberculosis* clustered resistant isolates from Orizaba, Veracruz. Nodes represent isolates with a similar MIRU-VNTR pattern. Colors indicate the resistance profile as specified in the key. The numbers within circles represents the year of isolation/diagnostic. Numbers underlined indicate cases with previous history of treatment. Lineages are shown outside the circles.

(2.4%), X, and TUR (2%) sublineages, which, despite their rarity, contribute to the region's genetic diversity. A study conducted near the northern border of Mexico described genetic diversity similar to that in this study, suggesting that the observed diversity was likely driven by migration (Flores-López et al., 2017). Although the distributions of the Cameroon, Ugandal, and Ghana sublineages are locally restricted, intrinsic biological factors or extrinsic factors such as migration can influence their distributions (Stucki et al., 2016). However, since the percentage of migrants in the population of Orizaba is unknown, we cannot determine whether migration influenced the prevalence of any of these sublineages.

We found only 15/755 (2%) lineage 1 isolates. Similar findings have been described in Baja California (Flores-López et al., 2017), the State of Mexico (Zenteno-Cuevas et al., 2015), and Jalisco (Lopez-Avalos et al., 2017). The appearance of this uncommon lineage in Orizaba could be useful for evaluating tuberculosis control and epidemiological surveillance programs.

The Beijing sublineage was found in 2 (0.2%) genotypically distant isolates, one of which was MDR. This lineage has been previously found

in Mexico, although it is rare (López-Rocha et al., 2013; Flores-López et al., 2017; Zenteno-Cuevas et al., 2015). Although it is predominantly found in East Asian countries, it can spread quickly worldwide via migration (Coscolla and Gagneux, 2014). Therefore, we suggest surveilling this lineage to prevent its dissemination because it is associated with MDR development, treatment failure and relapse (Coscolla and Gagneux, 2014).

M. tuberculosis transmission rates are generally inferred by comparing identical isolates obtained from patients in a given epidemiological setting (Coscolla and Gagneux, 2014). Despite having typified only 66% of the isolates in the study period, we obtained an RTI of 51.7%, suggesting that just over half of the studied tuberculosis cases were due to recent transmission, while the rest were likely due to reactivation. However, recent transmission cases can be overestimated, and previous studies have described cases that feature genetically identical *M. tuberculosis* isolates that lack any epidemiological relationship but instead occur as a result of the circulation of a common strain in the region (Davidson et al., 2018). Therefore, it is necessary to interpret RTIs with caution when no epidemiological linkage is evident.

Table 4
Allelic diversity (h) for the 24 locus MIRU-VNTR set studied.

| MIRU-VNTR locus ^a | Alias | Alleles copy number frequency | | | | | | | | | | | Allelic diversity index (h) | | | | |
|------------------------------|---------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|---------------------------------|----|----|----|------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 s | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | 10 | 11 | 12 | |
| 2687 | MIRU24 | | 739 | 16 | | | | | | | | | | | | | 0.04 |
| 4348 | MIRU39 | | 13 | 736 | 5 | | | | | | | | | | | | 0.05 |
| 154 | MIRU02 | | 32 | 719 | 4 | | | | | | | | | | | | 0.09 |
| 2059 | MIRU20 | | 53 | 701 | | | | | | | | | | | | | 0.13 |
| 580 | MIRU04 | | 7 | 697 | 17 | 19 | | 14 | | | | | | | | | 0.15 |
| 3007 | MIRU27 | | 5 | 13 | 685 | | 50 | | | | | | | | | | 0.17 |
| 2461 | ETRB | | 66 | 661 | 9 | | 1 | | 14 | | | | | | | | 0.23 |
| 3192 | MIRU31 | | | 34 | 637 | | 73 | 9 | 1 | | | | | | | | 0.28 |
| 3171 | Mtub34 | | 18 | 70 | 606 | | 6 | 54 | 1 | | | | | | | | 0.34 |
| 2347 | Mtub29 | | | 143 | 19 | | 584 | 8 | 1 | | | | | | | | 0.37 |
| 2996 | MIRU26 | | 2 | 17 | 47 | | 60 | 541 | 79 | 4 | 1 | 1 | | | | | 0.46 |
| 1644 | MIRU16 | | 63 | 107 | 527 | | 55 | 3 | | | | | | | | | 0.48 |
| 3690 | Mtub39 | | 24 | 173 | 511 | | 12 | 20 | 9 | 1 | 2 | | | | | | 0.49 |
| 2165 | ETRA | 1 | 5 | 271 | 451 | | 23 | | 1 | | | | | | | | 0.51 |
| 577 | ETRC | | | 18 | 401 | | 325 | 6 | | | | 1 | | | | | 0.53 |
| 1955 | Mtub21 | | 21 | 199 | 445 | | 69 | 3 | 2 | | 1 | | | 9 | 3 | 1 | 0.57 |
| 2531 | MIRU23 | | 3 | 1 | 140 | | 9 | 404 | 181 | 8 | 7 | | 1 | | | | 0.62 |
| 4156 | QUB4156 | | 33 | 187 | 426 | | 7 | 1 | | | | | | | | | 0.62 |
| 2401 | Mtub30 | | 151 | 186 | 11 | | 392 | 15 | | | | | | | | | 0.63 |
| 960 | MIRU10 | | 1 | 9 | 224 | | 219 | 278 | 3 | 1 | | | | | | | 0.69 |
| 802 | MIRU40 | | 155 | 114 | 350 | | 102 | 17 | 7 | 1 | 6 | 1 | | | | | 0.70 |
| 424 | Mtub04 | | 114 | 330 | 94 | | 168 | 47 | 2 | | | | | | | | 0.72 |
| 2163b | QUB11b | | 2 | 145 | 106 | | 227 | 172 | 65 | 5 | 14 | 13 | | | | | 0.79 |
| 4052 | QUB26 | 1 | 9 | 8 | 32 | | 166 | 167 | 109 | 127 | 73 | 53 | 3 | 1 | | | 0.84 |

^a MIRU-VNTR loci are referenced by the first four digits of their location on the *M. tuberculosis* H37Rv genome.

In the present study, resistance to INH was the most common, appearing in 61/612 (10%) isolates. This result is similar to the 9.75% previously reported in this cohort, in which resistance to INH was associated with having had contact with a person with tuberculosis (aOR 1.85, 95% CI 1.15–2.96) (Báez-Saldaña et al., 2016).

Furthermore, we found a higher primary resistance rate (81.9%) than the 28.9% reported in another region with a high incidence of tuberculosis in northern Mexico (Villa-Rosas et al., 2015). We also observed that patients with DR-TB who had new diagnoses had isolates that belonged to clusters (aOR 4.05, 95% CI 1.5–11.2, $p = 0.007$), providing evidence that primary resistance was transmitted among the study population.

In the current study, the overall acquired resistance rate was 18.1%. In contrast to our results, according to the WHO Anti-tuberculosis drug resistance report, between 2002 and 2007 acquired resistance in Mexico was 41.1%. Furthermore, in previous reports in our population studied, between 1995 and 1999 acquired resistance decreased from 54.7–49.2% respectively (WHO/IUATLD, 2008; Zazueta-Beltran et al., 2009). Additional findings showed that previous treatment was strongly associated with MDR-TB, and this association was strongest in patients with unique isolates (aOR of 21.56, 95% CI 3.5–134.3, $p = 0.001$). This finding is consistent with several studies conducted in Mexico and elsewhere that found previous treatment to be the most significant factor associated with MDR-TB (Bojorquez-Chapela et al., 2013; Pradipta et al., 2018). Targeted policies and programs involving supervision and follow-up of previously treated patients will significantly reduce the burden and transmission of MDR-TB.

Our results showed that the LAM lineage was associated with MDR-TB (aOR 4.25, 95% CI 1.4–12.7, $p = 0.010$). This finding is in agreement with other studies conducted in Peru and Brazil (Grandjean et al., 2015; Dalla-Costa et al., 2013). This supports the founder effect, indicating that the LAM lineage is primarily responsible for MDR-TB in Latin American countries, as previously described (Grandjean et al., 2015). A possible explanation for our findings is that the ongoing transmission of primary drug resistance and the presence of the LAM lineage favor the emergence of MDR-TB. Nevertheless, more studies are needed.

Our results showed a high discriminatory power of 24-locus MIRU-VNTR (HGDI = 0.98), similar to previous results in Mexico (Zenteno-Cuevas et al., 2015). This reinforces the idea that this method could be

useful in phylogenetic and molecular epidemiology studies in high-incidence areas (Kato-Maeda et al., 2011).

We tested a 24-locus panel and found that the loci with the highest levels of allelic diversity ($h \geq 6$) were 4056-QUB26, 2163b-QUB11b, 424-Mtub04, 802-MIRU40, 960-MIRU10, 2401-Mtub30, 4156-QUB4156, and 2531-MIRU23. These findings are similar to those reported in other populations in Mexico (Zenteno-Cuevas et al., 2015; Bolado-Martínez et al., 2015). For the 24 evaluated alleles, highly polymorphic markers have been identified that contribute significantly and accurately to the identification of isolates with genetically similar patterns in high-incidence regions with endemic *M. tuberculosis* clones.

Interestingly, we observed double alleles, and these were relatively more common at 2163b-QUB11b and 960-MIRU10; in addition, the latter locus had no alleles in 15 isolates. Double alleles have not been previously documented in Mexican *M. tuberculosis* isolates. The possible mechanisms responsible for the presence of double alleles are microevolutionary processes or mixed infection with multiple *M. tuberculosis* strains (Streit et al., 2015). We attributed these findings to microevolutionary processes because, in addition to the absence of the 960-MIRU10 allele, 13/19 isolates had small alleles at the 580-MIRU04 locus. This observation was possible due to our amplicon analysis by capillary electrophoresis. This method can more accurately determine locus size than gel electrophoresis, although the latter method was used in most studies conducted in Mexico (Kato-Maeda et al., 2011).

A study limitation was the lack of contact follow-up of patients with clustered isolates to confirm the transmission inferred based on the MIRU-VNTR results with clinical and epidemiological data. Follow-up was not possible because we were unable to locate patients due to the long interval between case detection and isolate genotyping. In the absence of epidemiological and clinical support, the formation of clusters by MIRU-VNTR should be considered possibly indicative of recent tuberculosis transmission. Likewise, epidemiological transmission was confirmed by MIRU-VNTR in approximately half of the cases in low-incidence areas (de Beer et al., 2013). However, in areas in which *M. tuberculosis* populations have low genetic diversity, the proportion of clustered isolates found by MIRU-VNTR may be high, which should be confirmed by whole-genome sequencing (Bjorn-Mortensen et al., 2016). Therefore, whole-genome sequencing of the isolates in the largest clusters should be performed to accurately determine their clonality and

establish probable transmission chains.

5. Conclusions

This study adds to the knowledge of the global genetic diversity of *M. tuberculosis* in a high-incidence area in Mexico. The Haarlem and LAM lineages seem to be endemic in the study area. The primary resistance rate and resistance transmission were high. A previous history of treatment and the LAM lineage were associated with MDR-TB. The RTI in the population was high. High discriminatory power was found for eight alleles, namely, QUB26, QUB11b, Mtub04, MIRU40, MIRU10, Mtub30, QUB4156 and MIRU23. The 24-locus MIRU-VNTR method is an efficient tool for typing, performing phylogenetic analyses, and determining epidemiology in a high-incidence area.

Contributions

Study conception and design: MBV, PTG, LGG, APDL, JSO. Laboratory work: AOV. Field data acquisition: LFR, GDS. Data analysis and interpretation: PCH, GDS, AOV. Manuscript drafting: AOV, MBV, LGG. Manuscript review: MKM, LGG, APDL, JSO.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Funding

This work was supported by a scholarship (280577) granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (<https://www.conacyt.gob.mx/>) to AOV, PhD student in the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. This work was also supported (Grant number: 233506) by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (<https://www.conacyt.gob.mx/>).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104994>.

References

- Báez-Saldaña, R., Delgado-Sánchez, G., García-García, L., Cruz-Hervert, L.P., Montesinos-Castillo, M., Ponce-de-León, A., 2016. Isoniazid mono-resistant tuberculosis: impact on treatment outcome and survival of pulmonary tuberculosis patients in southern Mexico 1995-2010. *PLoS One* 11 (12), e0168955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168955>.
- Bjorn-Mortensen, K., Soborg, B., Koch, A., Ladefoged, K., Merker, M., Kohl, T.A., 2016. Tracing *Mycobacterium tuberculosis* transmission by whole genome sequencing in a high incidence setting: a retrospective population-based study in East Greenland. *Sci. Rep.* 6, 33180. <https://doi.org/10.1038/srep33180>.
- Blanco-Guillot, F., Castañeda-Cediell, M.L., Cruz-Hervert, P., Ferreyra-Reyes, L., Delgado-Sánchez, G., García-García, L., 2018. Genotyping and spatial analysis of pulmonary tuberculosis and diabetes cases in the state of Veracruz, Mexico. *PLoS One* 13 (3), e0193911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193911>.
- Bojorquez-Chapela, I., Bäcker, C.E., Orejel, I., López, A., Díaz-Quiñonez, A., López-Gatell, H., 2013. Drug resistance in Mexico: results from the National Survey on Drug-Resistant Tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* 17 (4), 514-519. <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0167>.
- Bolado-Martínez, E., Candia-Plata, M., Zenteno-Cuevas, R., Mendoza Damián, F., Avilés-Acosta, M., Álvarez-Hernández, G., 2015. Proposal of a five MIRU-VNTR panel to screen clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *Biomed. Res. Int.* 33 (9), 609-612. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.010>.
- Brynildsrud, O.B., Pepperell, C.S., Suffys, P., Grandjean, L., Monteserin, J., Eldholm, V., 2018. Global expansion of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Sci. Adv.* 4 (10), eaat5869 <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat5869>.
- CENAPRECE, 2020. Programas Preventivos. Dirección de Micobacteriosis. Casos Nuevos de Tuberculosis Pulmonar. Estados Unidos Mexicanos 1990-2016. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficial_es.html. Consulted.
- Coscolla, M., Gagneux, S., 2014. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin. Immunol.* 26 (6), 431-444. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.012>.
- Cruz-Hervert, L., García-García, L., Ferreyra-Reyes, L., Bobadilla-del-Valle, M., Cano-Arellano, B., Ponce-de-León, A., 2012. Tuberculosis in ageing: high rates, complex diagnosis and poor clinical outcomes. *Age Ageing* 41 (4), 488-495. <https://doi.org/10.1093/ageing/afs028>.
- Dalla-Costa, E.R., Lazzarini, L.C., Perizzolo, P.F., Díaz, C.A., Spies, F.S., Rossetti, M.L., 2013. *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio genotype is the predominant cause of tuberculosis and associated with multidrug resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 51 (4), 1071-1077.
- Davidson, J.A., Thomas, H.L., Maguire, H., Brown, T., Burkitt, A., Lalor, M.K., 2018. Understanding tuberculosis transmission in the United Kingdom: findings from 6 years of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeats strain typing, 2010-2015. *Am. J. Epidemiol.* 187 (10), 2233-2242. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy119>.
- de Beer, J.L., van Ingen, J., de Vries, G., Erkens, C., Sebek, M., van Soolingen, D., 2013. Comparative study of IS6110 restriction fragment length polymorphism and variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 51 (4), 1193-1198. <https://doi.org/10.1128/JCM.03061-12>.
- Flores-López, C.A., Zenteno-Cuevas, R., Laniado-Laborín, R., Reynaud, Y., García-Ortiz, R.A., Muñoz-Salazar, R., 2017. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Baja California, Mexico: a result of human migration? *Infect. Genet. Evol.* 55, 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.001>.
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B.C., Small, P.M., 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (8), 2869-2873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511240103>.
- García-García, M., Palacios-Martínez, M., Ponce-de-León, A., Jiménez-Corona, M., Jiménez-Corona, A., Small, P.M., 2000. The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4 (1), 12-17.
- Grandjean, L., Iwamoto, T., Lithgow, A., Gilman, R.H., Arikawa, K., Moore, D.A., 2015. The association between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and drug resistance in Peru. *PLoS One* 10 (5), e0126271.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26 (11), 2465-2466. <https://doi.org/10.1128/JCM.26.11.2465-2466.1988>.
- Jiménez-Corona, M., García-García, L., DeRiemer, K., Ferreyra-Reyes, L., Bobadilla-del-Valle, M., Ponce-de-León, A., 2006. Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 61 (4), 348-353. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.049452>.
- Jiménez-Corona, M., Cruz-Hervert, L., García-García, L., Ferreyra-Reyes, L., Delgado-Sánchez, G., Ponce-de-León, A., 2013. Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax* 68 (3), 214-220. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201756>.
- Kato-Maeda, M., Metcalfe, J.Z., Flores, L., 2011. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. *Future Microbiol.* 6 (2), 203-216. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.165>.
- Lopez-Avalos, G., Gonzalez-Palomar, G., Lopez-Rodriguez, M., Vazquez-Chacon, C.A., Mora-Aguilera, G., Alvarez-Maya, I., 2017. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and transmission associated with first-line drug resistance: a first analysis in Jalisco, Mexico. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 11, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.07.004>.
- López-Rocha, E., Juárez-Álvarez, J., Riego-Ruiz, L., Enciso-Moreno, L., Ortega-Aguilar, F., López-Revilla, R., 2013. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México. *BMC Res Notes* 6, 172. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-172>.
- Molina-Torres, C.A., Moreno-Torres, E., Ocampo-Candiani, J., Rendon, A., Blackwood, K., Vera-Cabrera, L., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 48 (2), 448-455. <https://doi.org/10.1128/JCM.01894-09>.
- Pradapta, I.S., Forsman, L.D., Bruchfeld, J., Hak, E., Alffenaar, J.W., 2018. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: a global systematic review and meta-analysis. *J. Inf. Secur.* 77 (6), 469-478.
- Realpe, T., Correa, N., Rozo, J.C., Ferro, B.E., Gomez, V., Robledo, J., 2014. Population structure among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. *PLoS One* 9 (4), e93848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093848>.
- Streit, E., Millet, J., Rastogi, N., 2015. *Mycobacterium tuberculosis* polyclonal infections and microevolution identified by MIRU-VNTRs in an epidemiological study. *Int. J. Mycobacteriol.* 4 (3), 222-227. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.05.005>.
- Stucki, D., Brites, D., Jeljeli, L., Coscolla, M., Liu, Q., Gagneux, S., 2016. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat. Genet.* 48 (12), 1535-1543. <https://doi.org/10.1038/ng.3704>.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsch-Gerdes, S., van Soolingen, D., 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (12), 4498-4510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>.

- Torkaman, M.R., Nasiri, M.J., Farnia, P., Shahhosseiny, M.H., Mozafari, M., Velayati, A. A., 2014. Estimation of recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan immigrants: a cluster-based study. *J. Clin. Diagn. Res.* 8 (9), DC05–DC8. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8886.4864>.
- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Kremer, K., 2003. Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria. *Mycobacterium Tuberc. Protoc.* 54, 165–203. <https://doi.org/10.1385/1-59259-147-7:165>.
- Villa-Rosas, C., Laniado-Laborín, R., Ocegüera-Palao, L., 2015. Primary drug resistance in a region with high burden of tuberculosis. A critical problem. *Salud Publica Mex.* 57 (2), 177–179. <https://doi.org/10.21149/spm.v57i2.7414>. PMID: 26235779.
- WHO/IUATLD, 2008. Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 2002–2007. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43889>.
- World Health Organization, 2020. Global Tuberculosis Report 2020. Available at. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Accessed date: October 2020.
- Zazueta-Beltran, J., León-Sicaños, C., Canizalez-Roman, A., 2009. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J. Infect. Dev. Ctries* 3 (3), 162–168. <https://doi.org/10.3855/jidc.31>.
- Zenteno-Cuevas, R., Mendoza-Damián, F., Muñoz, I.C., Enciso-Moreno, L., Pérez-Navarro, L.M., Enciso-Moreno, J.A., 2015. Description of the population structure and genetic diversity of tuberculosis in Estado de México, a low prevalence setting from Mexico. *APMIS* 123 (2), 116–122. <https://doi.org/10.1111/apm.12312>.