



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C**

**Epidemiología molecular de la tuberculosis en
San Luis Potosí**

Tesis que presenta
Ma. Estela López Rocha

Para obtener el grado de
Doctora en Biología Molecular

Director de la tesis
Dr. Rubén López-Revilla

San Luis Potosí, S.L.P.

Abril de 2014



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Epidemiología molecular de la tuberculosis en San Luis Potosí”*** presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ma. Estela López Rocha** y aprobada el **once de abril del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Director de la tesis

Dr. José Antonio Enciso Moreno
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio Augusto Gordillo Moscoso
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

El trabajo de esta tesis fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

El trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto “Epidemiología molecular de la tuberculosis en el estado de San Luis Potosí”, FMSLP-2008-C02-107371 de FOMIX-SLP

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 80328).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 069 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de abril del año 2014, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. José Antonio Enciso Moreno	Presidente	UIMZ
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. Antonio Augusto Gordillo Moscoso	Sinodal externo	UASLP
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Sinodal	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ma. Estela López Rocha

sobre la Tesis intitulada:

Epidemiología molecular de la tuberculosis en San Luis Potosí

que se desarrolló bajo la dirección de


Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de abril de 2014.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



DEDICATORIAS

A la memoria de mi querida madre.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén López Revilla. Por haberme brindado su confianza, apoyo, consejos e invaluable y enseñanzas

A la Dra. Lina Riego. Por el tiempo, el compromiso y la disposición que tuvo conmigo.

A la Bióloga. Mireya Sánchez. Por el soporte y la ayuda incondicional que siempre me dio en el laboratorio.

Al Dr. J. Antonio Enciso de la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas del Instituto Mexicano del Seguro Social (UIMZ-IMSS), un agradecimiento muy especial por permitirnos participar en este proyecto.

A Leonor Enciso y Yolanda García de la UIMZ-IMSS por haberme capacitado en los métodos de genotipificación.

Al Dr. Marcelo Aranda y a la Enf. Dora Díaz Ornelas de los Servicios de Salud de San Luis Potosí por permitirnos el acceso a los expedientes de los pacientes de Programa Estatal de Tuberculosis de San Luis Potosí.

A los Q.F.B. Francisco Ortega y Julián Hernández del Laboratorio Estatal de Salud Pública (Servicios de Salud de San Luis Potosí), por todo su esfuerzo y trabajo durante la propagación de las cepas y la extracción de DNA de los aislados.

A Julio Juárez Alvarez por su extraordinaria ayuda y participación en todas las etapas de este proyecto.

A Luis, Nayeli, Julieta y Patricia por la gran ayuda, en la realización de los métodos de genotipificación así como en la captura de resultados y edición de imágenes.

Al CONACYT por haberme concedido una beca para realizar esta tesis

Al IPICYT por haberme dado la oportunidad de realizar mi posgrado en un ambiente de camaradería con mis compañeros estudiantes, y de consejo y aliento de parte de los profesores.

ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	II
COPIA DEL ACTA DEL EXAMEN.....	IV
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Tuberculosis.....	1
Vigilancia epidemiológica de la tuberculosis en San Luis Potosí.....	4
Epidemiología molecular de la tuberculosis.....	4
Métodos para el estudio de la epidemiología molecular de la TB	6
<i>Espoligotipificación.....</i>	6
<i>MIRU-VNTR.....</i>	6
Justificación.....	7
Estrategia empleada.....	8
Avances logrados.....	9
<i>Epidemiología clásica y farmacorresistencia de la TB.....</i>	10
<i>Especies, linajes, familias y diversidad genética de las cepas del CMTB circulantes.....</i>	10
<i>Tuberculosis pulmonar humana por Mycobacterium bovis.....</i>	11
<i>Magnitud de la transmisión reciente.....</i>	12
<i>Cadenas de transmisión reciente y cepas emergentes.....</i>	12
Partes de la tesis	13
CAPÍTULO II. GENETIC DIVERSITY OF THE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> COMPLEX IN SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO.....	14
Abstract.....	14
Background.....	15
Methods.....	16
<i>Territory and population.....</i>	16
<i>Culture and drug susceptibility of the MTC isolates.....</i>	17
<i>Spoligotyping.....</i>	19
<i>Statistical analysis and geographic distribution of MTC species, lineages and families.....</i>	21
Results.....	21
<i>Pulmonary TB incidence per sanitary jurisdiction and region.....</i>	21
<i>Features of the PTB cases.....</i>	24
<i>Lineages, families and clusters of the MTC isolates.....</i>	26
<i>Lineages and families of drug-resistant MTC isolates.....</i>	27
Discussion	31
Conclusions	35
References.....	35
CAPÍTULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL COMPLEJO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> Y CADENAS DE TRANSMISIÓN RECIENTE IDENTIFICADAS POR GENOTIPIFICACIÓN VNTR EN SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO	39
Resumen.....	39
Introducción	40
<i>Planteamiento del problema.....</i>	41
<i>Justificación.....</i>	42
Material y métodos	42
<i>Territorio, población y periodo estudiado</i>	42
<i>Cultivo del esputo</i>	47

<i>Espoligotipificación y asignación de genotipos</i>	47
<i>Cuantificación de la diversidad genética</i>	48
<i>Índice de transmisión-mutación y detección de cepas emergentes</i>	48
<i>Selección de espoligoclústeres potencialmente involucrados en cadenas de transmisión</i>	51
<i>Genotipificación VNTR</i>	51
Resultados	53
<i>Etapas del estudio</i>	53
<i>Diversidad genética del CMTB y espoligoclústeres</i>	53
<i>Espoligoclústeres</i>	56
<i>Índice de transmisión-mutación</i>	56
<i>Genotipos VNTR y cadenas de transmisión reciente</i>	61
<i>Cepas emergentes</i>	62
Discusión.....	67
Referencias.....	73
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL	76
REFERENCIAS GENERALES	78
ANEXO 1 PRODUCTOS GENERADOS	85
Artículo publicado (Capítulo II).....	86
Manuscrito del segundo artículo que será sometido a publicación (Capítulo III)	86
Artículos en memorias de reuniones científicas	86
Participación en reuniones científicas.....	88
ANEXO 2 CONVENIO IPICYT-SSA.....	91
ANEXO 3 PROGRAMA DE VIGILANCIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS	101
ANEXO 4 COPIA DEL ARTÍCULO PUBLICADO	106

LISTA DE TABLAS

Table 1. Population density, PTB incidence and MTC isolates per sanitary jurisdiction (January 2006 to March 2010).....	18
Table 2. Sociodemographic and clinical variables of the PTB cases in the low-, intermediate- and high-incidence regions of the state	23
Table 3. Spoligotype patterns and octal codes of the 24 MTC clusters found.....	28
Table 4. Lineages of the drug-resistant MTC isolates.....	30
Tabla 1. Distribución anual de casos de TBP activa, contactos y casos detectados y de aislados del CMTB recuperados y espiligotipificados	45
Tabla 2. Aislados del CMTB por jurisdicción sanitaria	46
Tabla 3. Los 140 espiligotipos y 32 espiligoclústeres identificados.....	54
Tabla 4. Especies, linajes y familias del CMTB identificados por espiligotipificación.....	58
Tabla 5. Casos de TBP de los 31 aislados del CMTB agrupados en siete espiligoclústeres potencialmente implicados en cadenas de transmisión	59
Tabla 6. Variables del <i>spoligoforest</i> empleadas para calcular el índice de transmisión-mutación (TMI).....	60
Tabla 7. Las seis cadenas de transmisión reciente identificadas por genotipificación MIRU-VNTR	64
Tabla 8. Genotipos de los 14 aislados sin relación geográfica seleccionados aleatoriamente	65
Tabla 9. Índices discriminatorios de Hunter-Gaston (HGDI) de los loci MIRU-VNTR ^a	66

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Flow diagram indicating the PTB cases, the cultured recovered and spoligotyped MTC isolates, and the statistical, geographic and genotypic analyses performed for this study	20
Figure 2. PTB incidence rates by jurisdiction and region	22
Figure 3. Dendrogram, families and spoligotype patterns of the 109 MTC genotypes identified	25
Figure 4. Geographic distribution of the Euro-American and other MTC lineages found	29
Figura 1. Etapas del estudio.....	44
Figura 2. <i>Spoligoforest</i> de los aislados del CMTB	50
Figura 3. Electroferograma típico para cuantificar las copias del locus MIRU-ETR en 16 aislados del CMTB	52
Figura 4. Dendrograma polifásico derivado de los espiligotipos y los códigos VNTR de los aislados del CMTB que forman espiligoclústeres.....	63

RESUMEN

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS EN SAN LUIS POTOSÍ

CONTEXTO: El estado de San Luis Potosí sufre las vulnerabilidades socioeconómicas y factores de riesgo determinantes de la TB y aunque México es un país prioritario para el control de la TB, los estudios de epidemiología molecular son escasos en general y nulos en el estado. MÉTODOS: Recolectamos y analizamos los datos sociodemográficos y clínicos completos de 248 pacientes de TB pulmonar (TBP) entre los 432 casos confirmados por cultivo en el periodo 2006-2010 de la población sujeta a vigilancia epidemiológica de esta enfermedad. Por otro lado, determinamos los espoligotipos, especies, linajes y familias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) de 332 aislados de TBP diagnosticados entre 2006 y 2011. Estimamos los índices de diversidad genética de Nei y de Simpson y el índice de transmisión-mutación (TMI). Los aislados del CMTB involucrados en cadenas de transmisión reciente fueron identificados por sus patrones de 15 loci MIRU-VNTR entre clústeres de aislados con espoligotipos idénticos y vínculos geográficos. Los índices discriminatorios de los genotipos VNTR fueron calculados con la fórmula de Hunter-Gaston y las cepas emergentes del CMTB identificadas con el método de Storey aplicado a los espoligotipos. RESULTADOS. La tasa de incidencia de TBP varió entre 2.4 y 33.4 (casos por 100,000 habitantes) en las seis jurisdicciones sanitarias del estado, que fueron agrupadas en regiones de baja (jurisdicciones I, II y III), intermedia (IV y V) y alta incidencia (VI) con tasas de 6.2, 17.3 y 33.4 respectivamente. La mediana de edad de los pacientes fue 50 años y los casos predominaron en hombres y amas de casa. Entre los aislados del CMTB 324 tuvieron espoligotipos de *M. tuberculosis* (97.6%) y ocho de *M. bovis* (2.4%). Doscientos veinticuatro aislados se agruparon en espoligoclústeres, siendo los principales de los genotipos SIT53 (n = 96) y SIT42 (n = 20). Predominó el Linaje 4 (Euro-Americano) con 304 aislados, seguido del Linaje 1 (Indo-Oceánico) con 14 aislados y el Linaje 2 (Asiático Oriental) con seis aislados. Los valores de los índices fueron: H = 0.91 (Nei), S = 0.09 (Simpson), TMI = 0.11. Entre los 32 espoligoclústeres identificados estuvieron geográficamente relacionados siete, formados por 31 aislados (9.3% del total) en clústeres de 2 a 14 aislados. Entre los espoligoclústeres fueron identificados 25 genotipos VNTR y seis parejas de aislados implicados en cadenas de transmisión (3.7% del total): tres parejas con contactos probados y tres sin contactos probados; dos de las tres últimas parejas corresponden a la familia Beijing. Índice discriminatorio de Gunter-Gaston para los 15 loci MIRU-VNTR, HGDI = 0.997. CONCLUSIONES. El número de espoligotipos, linajes y familias del CMTB y los índices de Nei y Simpson confirman y cuantifican la gran diversidad de las cepas del CMTB circulantes en San Luis Potosí. La baja proporción de casos detectados entre los contactos (7.4%) y el TMI = 0.11 indican que la epidemiología de la TBP se debe principalmente a reactivación endógena y no a transmisión reciente. La genotipificación VNTR identificó seis cadenas de transmisión (3.6% de los aislados, i.e., tres veces menos que el valor del TMI). Las cepas emergentes identificadas con el método de Storey son SIT53 y SIT42; sin embargo, dos de las seis cadenas de transmisión son de la cepa Beijing, que también parece estar emergiendo en el estado.

PALABRAS CLAVE: Espoligotipificación, MIRU-VNTR, determinantes socioeconómicos de la TB, transmisión reciente de la TB, cepa Beijing.

ABSTRACT

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS IN SAN LUIS POTOSÍ

BACKGROUND: The state of San Luis Potosí is adversely affected by socio-economic vulnerabilities and risk factors determinant of tuberculosis (TB) and, although Mexico is a high-priority country for the TB control, molecular epidemiology studies are scarce at large in the country and inexistent in the state. **METHODS:** We collected and analyzed complete sociodemographic and clinical data from 248 patients of pulmonary TB (PTB) confirmed by culture in the population under epidemiologic surveillance from 2006 to 2010. On the other hand, we determined the spoligotypes, species, lineages and families of 332 *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC) isolates from the PTB cases diagnosed from 2006 to 2011. We estimated Nei's and Simpson's diversity indexes and the transmission-mutation index (TMI). MTC isolates involved in recent transmission chains were identified through their 15 MIRU-VNTR loci patterns from spoligoclusters with identical patterns and geographic links. The discriminatory genotype indexes for each MIRU-VNTR locus were calculated with the Hunter-Gaston formula, and emergent MTC strains identified with the Storey method applied to spoligotypes. **RESULTS.** The PTB incidence rates varied from 2.4 to 33.4 (cases by 100.000 inhabitants) in the six state sanitary jurisdictions, which were grouped in regions of low (jurisdictions I, II and III), intermediate (IV and V) and high incidence (VI) with respective rates of 6.2, 17.3 and 33.4. The median age of patients was 50 years and TBP cases predominated in men and housewives. Amongst the MTC isolates, 324 (97.6%) had *M. tuberculosis* spoligotypes and eight (2.4%) had *M. bovis* spoligotypes. Two hundred twenty-four isolates were grouped in spoligoclusters, mainly of SIT53 (n = 96) and SIT42 (n = 20) genotypes. The Lineage 4 (Euro-American) predominated with 304 isolates, followed by Lineage 1 (Indo-Oceanic) with 14 isolates, and Lineage 2 (East-Asian) with six isolates. Values of the indexes were: H = 0.91 (Nei), S = 0.09 (Simpson), TMI = 0.11. Among the 32 spoligoclusters —constituted by 31 isolates (9.3%) in clusters of 2 to 14— only seven were geographically linked. In these clusters we resolved twenty-five MIRU-VNTR types, and identified six pairs of isolates involved in recent transmission chains (3.7% of the total); three pairs from cases with proven contacts and three without proven contacts corresponding to the Beijing family. The Gunter-Gaston discriminatory index for the 15 MIRU-VNTR loci was 0.997. **CONCLUSIONS.** The large number of spoligotypes, lineages and families and the indices of Nei and Simpson confirm and quantify the great diversity of the MTC strains circulating in San Luis Potosí. The low proportion of cases detected in the contacts (7.4%) and the TMI = 0.11 indicate that the epidemiology of PTB is mostly due to endogenous reactivation, not to recent transmission. MIRU-VNTR genotyping identified six chains of recent transmission (3.6% of the isolates), i.e., one-third the TMI value. The emergent strains identified by the method of Storey are SIT53 and SIT42, but since Beijing strains are involved in two of the six recent transmission chains identified, they also appear to be emerging in the state.

KEY WORDS: Spoligotyping, MIRU-VNTR, socioeconomic determinants of TB, recent transmission of TB, Beijing strain.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tuberculosis

La tuberculosis (TB) ha producido sufrimiento y muerte en todo el mundo y en todas las culturas manteniéndose como una de las enfermedades más letales para los humanos.

La TB es una enfermedad infectocontagiosa causada por especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, aunque *M. bovis*, la especie que causa la enfermedad en bovinos también infecta a humanos. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variadas y dependen principalmente del sitio de la infección, siendo el más frecuente el pulmonar (Caminero-Luna 2003).

Un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y el 90% de los individuos infectados desarrollan inicialmente la TB latente (TBL) (Caminero-Luna 2003), estado asintomático no contagioso. Sin embargo, alrededor del 10% de los individuos con TBL (aproximadamente 200 millones en todo el mundo) desarrollan TB activa (TBA) en alguna etapa de su vida. Los factores asociados a la adquisición de la infección, el desarrollo de la enfermedad y la mortalidad dependen de aspectos biológicos, médicos, sociales, económicos y culturales (Raviglione 2010).

Las campañas sanitarias de comienzos del siglo pasado y el advenimiento de los antibióticos en la década de los años 1950 hicieron pensar en la erradicación de la TB. Sin embargo, a principios de los años 1990, en una acción sin precedentes, la Organización Mundial de la Salud (OMS), basada en el cada vez mayor número de casos notificados y las proyecciones alarmantes de la incidencia de TB en el mundo, declaró a la enfermedad como una grave amenaza reemergente e hizo un llamado a las instituciones de salud de los gobiernos para tomar medidas inmediatas contra la enfermedad (Caminero 2007).

La presencia de condiciones que afectan el sistema inmunológico como el VIH/SIDA, enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus tipo II y

enfermedades pulmonares crónicas son factores de riesgo para el desarrollo de la TB pulmonar (TBP). La marginación, la pobreza, la desnutrición, el hacinamiento y el abuso del alcohol, tabaco y drogas aceleran la progresión de la TBL a la TBA (Espinal et al. 2000) y las minorías étnicas son particularmente vulnerables (Greene 2004).

Las causas de la reemergencia global de la TB fueron la laxa vigilancia epidemiológica, la insuficiencia de recursos para el control de la enfermedad, la creciente pobreza y desnutrición en el mundo, el surgimiento del VIH-SIDA, y la pandemia de diabetes. Junto con estos factores, la emergencia de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) multidrogorresistentes (MDR) o extremadamente drogorresistentes (XDR) hicieron aún más complicada la prevención y control de la enfermedad en algunos países (Caminero-Luna 2003).

La tuberculosis es curable mediante tratamiento con múltiples fármacos (“antifímicos”) por periodos de seis a 12 meses. En México, igual que en otros países, la monoterapia, el abandono del tratamiento y el tratamiento inadecuado favorecieron la selección de cepas resistentes a múltiples fármacos (MTB-MDR) (Bloom et al. 1994; Alvarez-Gordillo et al. 1995; Bustamante-Montes et al. 1996; Alvarez-Gordillo and Dorantes-Jimenez 1998). El tránsito continuo de personas de México a Estados Unidos y viceversa parece aumentar la propagación de estas cepas en las poblaciones de ambos países (Shafer et al. 1995; Sifuentes-Osornio et al. 1995; Quitugua et al. 2002).

Las condiciones socioeconómicas también son determinantes de la TB. La OMS estimó que en el 2007 el 95% de los casos nuevos y el 98% de las muertes por TB ocurrieron en países con bajos y medianos recursos económicos, que el número de casos nuevos en el mundo fue de 9.3 millones y en las Américas fue de casi 331,000 con tasas de incidencias respectivas de 139 y 36.8 por 100,000 habitantes (World Health Organization 2009). India, China, Indonesia, Sudáfrica y Nigeria ocuparon los cinco primeros lugares en cifras absolutas de casos y el continente africano fue la región con la máxima incidencia, 363 por 100,000 habitantes (World Health Organization 2009).

En el contexto mundial México tuvo en 2007 una tasa de incidencia relativamente baja, no mayor a 20 casos por 100,000 habitantes (World Health Organization 2009), aunque según las fuentes oficiales del país ese año la tasa de incidencia nacional fue de 13.5. La diferencia en la estimación de la OMS se debe al subregistro, debido principalmente a la falla en la detección primaria de casos. Es bien sabido que la vigilancia epidemiológica pasiva (detección de casos en la consulta externa) que se lleva a cabo en México descubre tardíamente los casos, que en todo momento representan una proporción significativa de enfermos no diagnosticados. Esto sin contar que —por nuestra experiencia durante la realización de este trabajo— la actualización de la base de datos nacional de tuberculosis es deficiente e incompleta.

El panorama epidemiológico de la tuberculosis es complejo y preocupante en México como en el resto de los países en desarrollo y las tasas de incidencia difieren notablemente en cada entidad federativa. En 2007 los estados con las tasas más altas fueron Baja California con 35 y Tamaulipas con 33, mientras que Tlaxcala y el Estado de México tuvieron tasas de 2.4 y 2.8 respectivamente. En ese mismo año San Luis Potosí tuvo una tasa de incidencia de 12.2 (Castellanos-Joya et al. 2008).

Dividido políticamente en 58 municipios heterogéneos desde el punto de vista económico y social y con casi 2.6 millones de habitantes, el estado de San Luis Potosí es uno de los 10 estados mexicanos con más pobreza. En 2010 el 22.2% de su población sufría carencias por rezago educativo, 21% por acceso a servicios de salud, 57.2% por acceso a la seguridad social, 16.4% por calidad y espacios de la vivienda, 25.8% por acceso a los servicios básicos en la vivienda y 30.1% por acceso a la alimentación. El 52.6% de los habitantes vivía en la pobreza, es decir, 1,360,000 personas, entre los cuales 400,000 eran extremadamente pobres. El 36% residía en hábitats rurales y el 10% hablaba una lengua indígena. El grado de intensidad migratoria a Estados Unidos es de los más altos del país con 6.6% de viviendas que reciben remesas, 3.1% de población emigrante, 1.3% de migrantes bidireccionales y 3.2% de migrantes de retorno (Consejo Nacional de Población 2012).

Las características del control epidemiológico de la TB, así como las condiciones socioeconómicas y otros factores de riesgo en San Luis Potosí son representativas de lo que ocurre en gran parte del país y por las cuales la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha definido a México como un país prioritario para el control de la TB en las Américas junto con Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, Nicaragua, Perú, y República Dominicana (Panamerican Health Organization 2008).

Vigilancia epidemiológica de la tuberculosis en San Luis Potosí

El actual objetivo fundamental del control de la TB en México es la prevención de la transmisión de persona a persona mediante la curación de los casos de TB activa.

El diagnóstico se centra en la demostración microscópica (baciloscopía) de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en los casos probables de TB, es decir, en pacientes mayores de 15 años con tos productiva y evolución de dos o más semanas, detectados mediante vigilancia pasiva en la consulta externa (Secretaría de Salud. 2005).

En San Luis Potosí existe una red estatal de laboratorios que realizan baciloscopías con personal certificado y que son evaluados continuamente. Sin embargo, como la norma indica que la presencia de BAAR en especímenes de esputo confirma la enfermedad, sólo se realiza cultivo microbiológico en una fracción de los pacientes. Por otro lado, no hay una red estatal de laboratorios de micobacteriología y sólo el Laboratorio Estatal de Salud Pública lleva a cabo el cultivo y pruebas de sensibilidad a los antifímicos y, aunque identifica las cepas del CMTB con un método molecular, no hace diferenciación de especies de micobacterias que causan la TB.

Epidemiología molecular de la tuberculosis

La epidemiología molecular integra las técnicas convencionales de seguimiento epidemiológico con las técnicas moleculares de diagnóstico y genotipificación que además de identificar determinantes de la distribución, transmisión y manifestación

de la enfermedad, simplifican la elección de intervenciones apropiadas de control y prevención (Allix-Beguec et al. 2008a).

En contraste con la baciloscopía y el cultivo que sólo determinan la presencia de micobacterias en los especímenes de los pacientes sospechosos, los métodos de la epidemiología molecular determinan la especie, el linaje, la familia y la identidad genética de las cepas del CMTB circulantes en una población dada. Estos datos, en conjunto con los procedimientos de la epidemiología clásica, permiten diferenciar las infecciones recientes de las producidas por reactivación endógena, identificar brotes epidémicos en hospitales, instituciones de salud y cárceles, e identificar las cadenas de transmisión entre los enfermos de una comunidad (Small et al. 1994; van der Spuy et al. 2003). Otros métodos moleculares recientes identifican cepas MDR (Sekiguchi et al. 2007) y XDR (Evans and Segal 2010).

El descubrimiento de elementos genéticos transponibles y otras secuencias de DNA repetido presentes en los genomas de las especies del CMTB han servido para desarrollar métodos de genotipificación que diferencian entre especies y cepas (Mazurek et al. 1991).

Los métodos más reconocidos y utilizados como marcadores genéticos para diferenciar entre las especies del CMTB son la espoligotipificación, la tipificación del número variable de copias repetidas en tándem (VNTR por sus siglas en inglés) y la tipificación del número de copias del elemento transponible IS6110 por análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP IS6110).

En México hay pocos estudios de epidemiología molecular publicados y no se conoce la diversidad genética de las cepas circulantes en el país, excepto la de las ciudades de Orizaba (Jimenez-Corona et al. 2009), Monterrey (Molina-Torres et al. 2010) y Acapulco (Nava-Aguilera et al. 2011). Aunque hay un estudio publicado sobre clústeres de transmisión reciente en localidades limitadas (Garcia-Garcia et al. 2000), no se han hecho estudios sistemáticos a escala estatal o nacional sobre la transmisión reciente de la TB.

Métodos para el estudio de la epidemiología molecular de la TB

A continuación se describen los métodos empleados actualmente para el estudio de la epidemiología molecular de la TB.

Espoligotipificación

La espoligotipificación (*spoligotyping*, del inglés spacer oligonucleotide typing) se basa en la tipificación del polimorfismo de la región DR (*direct repeats*, repetidos directos) del CMTB. Los loci DR conocidos constan de secuencias repetidas de 36 pares de bases (pb) separadas por secuencias espaciadoras de 35 a 41 pb (Kamerbeek et al. 1997).

La espoligotipificación detecta la presencia o ausencia de espaciadores en las cepas del CMTB y sirve para caracterizar familias de micobacterias en una escala intraespecífica (Driscoll 2009). La base de datos SpolDB4 (Fourth International Spoligotyping Database) incluye 62 linajes del CMTB y almacena dos mil espoligotipos compartidos que representan casi cuarenta mil cepas provenientes de 122 países (Brudey et al. 2006b).

La espoligotipificación permite analizar en poco tiempo y de manera simultánea un gran número de cepas y las bases de datos internacionales disponibles permiten hacer los análisis de similitud entre ellas. Aunque tiene baja resolución para discriminar diferencias entre cepas, la espoligotipificación permite implementar estrategias adecuadas de trazabilidad para asociar el perfil genético de cada cepa del CMTB a una localidad para establecer nichos de permanencia y rutas de diseminación del patógeno.

MIRU-VNTR

Las secuencias repetidas en tándem se encuentran dispersas por miles de copias en casi todos los genomas de eucariotes superiores (Cox and Mirkin 1997). Los loci de estas secuencias repetidas son usualmente llamadas microsatélites cuando son cortas (1-13 pb) y minisatélites si son de 10-100 pb (Tautz and Renz 1984). Muchos de estos loci muestran hipervariabilidad en el número de secuencias repetidas tanto en el genoma humano como de animales por lo que son llamados loci VNTR (Nakamura et al. 1987).

Algunos microsatélites con secuencias cortas repetidas similares a las encontradas en humanos han sido caracterizados recientemente en los genomas de varios procariones (Brudey et al. 2006a). En el genoma de *M. tuberculosis* estas estructuras, compuestas por secuencias de 40-100 pb, se encuentran dispersas en 41 loci del cromosoma de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y son llamadas MIRU (en inglés, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) (Supply et al. 2000).

La genotipificación por MIRU-VNTR se basa en la determinación del número de copias repetidas en tándem en conjuntos que varían de 12 a 24 loci. Debido a su alta resolución, el método permite identificar cadenas de transmisión, un dato esencial para la vigilancia y control de la TB. Ofrece rapidez, reproducibilidad y gran resolución para la genotipificación de las especies del CMTB por lo cual ha sido aceptado internacionalmente como un método de referencia para la epidemiología molecular de la tuberculosis en combinación con la espoligotipificación (Supply et al. 2006).

Justificación

A pesar de que nuestro país es prioritario para el control y prevención de la TB en las Américas, antes de este trabajo no se había realizado ningún estudio de epidemiología molecular que pudiese generar información crucial para la prevención y el control de la TB en el territorio de San Luis Potosí, a pesar de que en la entidad hay condiciones socioeconómicas determinantes de la enfermedad y factores de riesgo como desnutrición, alcoholismo y diabetes y un alto índice de migración.

Aunque el sistema de vigilancia epidemiológica de la TB en el estado es exitoso según el modelo de evaluación nacional, con buenos resultados en los indicadores de cobertura, diagnóstico, curación y seguimiento (Secretaría de Salud. 2011), los datos que alimentan a los indicadores se basan en los casos notificados que, como ya se ha mencionado, no son necesariamente todos los casos incidentes.

Sin cambiar el modelo de vigilancia epidemiológica pasiva que opera actualmente, las herramientas moleculares permitirían un mayor acercamiento a las cifras reales de incidencia, porque mediante la genotipificación se pueden establecer no sólo las relaciones entre las cepas del CMTB que infectan a los enfermos y sus contactos, sino también identificar contactos insospechados. Estos hallazgos permitirían descubrir casos no detectados por el seguimiento epidemiológico clásico y a estimar la extensión de la transmisión reciente, datos cruciales para el control de la TB.

Los métodos moleculares permiten identificar las especies y la diversidad genética de las cepas circulantes del CMTB e, igualmente, sus relaciones con otras poblaciones del país y del mundo. Su aplicación rutinaria y sistemática genera información útil para determinar los cambios en la distribución de las cepas endémicas y para detectar cepas emergentes, datos también cruciales para el control de la TB.

Este estudio ha determinado la prevalencia de las especies del CMTB que causan TB pulmonar en el estado de San Luis Potosí, la diversidad genética de las cepas circulantes y su relación con la diversidad genética global y con la de las escasas poblaciones del país que han sido estudiadas. Por último, pero no menos importante, también ha determinado la contribución relativa de la transmisión reciente y la reactivación endógena a la epidemiología de la TB en el estado.

Estrategia empleada

Este trabajo incluyó todos los casos de TB pulmonar provenientes de la vigilancia epidemiológica en el estado, pero especialmente los confirmados por cultivo entre 2006 y 2011 y cuyos aislados pudieron ser recuperados de la colección de cepas de micobacterias conservadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública.

El estudio abarcó todo el estado de San Luis Potosí empleando un enfoque multidisciplinario que además de la micobacteriología incluyó:

- El análisis de la epidemiología clásica de la TBP y su relación con variables sociodemográficas y médicas.
- La determinación de resistencia a antifímicos de primera línea.

- El desarrollo de un sistema de información geográfica para visualizar los genotipos y otras variables asociadas a la enfermedad.
- La espoligotipificación, para la genotipificación de mediana resolución que identifica las especies de los aislados del CMTB, su diversidad genética y el acotamiento de los clústeres potencialmente involucrados en cadenas de transmisión.
- La tipificación MIRU-VNTR de alta resolución, para identificar aislados con genotipos idénticos o casi idénticos involucrados en cadenas de transmisión
- La estimación de la diversidad genética, la transmisión reciente y la identificación de cepas emergentes mediante la aplicación de diversos modelos matemáticos.

Avances logrados

El estudio confirma que el diagnóstico convencional de la TB es reforzado por el uso racional y programático de métodos moleculares para identificar las cepas del CMTB, determinar la distribución geográfica de los genotipos e identificar las cadenas de transmisión reciente.

Hemos implementado, optimizado y estandarizado la genotipificación del CMTB por espoligotipos y MIRU-VNTR, identificado clústeres de casos con relación geográfica y epidemiológica y establecido las herramientas estadísticas, matemáticas y de localización geográfica que concretan los datos en información útil para tomar decisiones que mejoren el programa de la TB estatal.

Logramos definir la situación de la epidemiología clásica de la TB en el estado de San Luis Potosí, determinar la frecuencia de resistencia a los antituberculosos en las cepas del CMTB circulantes aisladas de los pacientes, genotipificar las cepas del CMTB circulantes mediante espoligotipificación y MIRU-VNTR para identificar las especies, linajes y familias y las cepas individuales, crear una base de datos de la epidemiología clásica y molecular de la TB en San Luis Potosí, identificar las cadenas de transmisión reciente entre los aislados del CMTB

analizados y estimar la contribución relativa de la transmisión reciente y la reactivación endógenas a la epidemiología de la TB en el estado.

A continuación describimos los avances específicos en los diferentes aspectos que abarca la tesis.

Epidemiología clásica y farmacorresistencia de la TB

Con el fin contextualizar la epidemiología molecular investigamos la epidemiología clásica y la farmacorresistencia de los aislados del CMTB obtenidos de 248 casos confirmados y con datos completos entre la población sujeta a vigilancia epidemiológica en el periodo 2006-2010. La tasa de incidencia de la TB pulmonar (TBP) por jurisdicción sanitaria tuvo un rango de 2.4 a 33.4 (por 100,000 habitantes). Esta disparidad nos hizo dividir el estado en tres regiones de incidencia: baja (jurisdicciones I, II y III), intermedia (jurisdicciones IV y V) y alta (jurisdicción VI) con tasas de 6.2, 17.3 y 33.4, respectivamente. Encontramos que el grado de marginación aumenta progresivamente de manera significativa desde la región de baja incidencia a la de alta incidencia.

Dos tercios de los pacientes eran hombres; un tercio amas de casas; la mitad sin empleo o jornaleros. Casi dos tercios de los pacientes no completaron la primaria o no tuvieron ninguna educación formal. La mitad (51.2%) tenía una enfermedad concomitante, la más frecuente fue diabetes (21.4%) seguida de desnutrición (16.5%) y alcoholismo 9.3%). En el periodo estudiado se detectaron 61 (3.7%) casos por búsqueda convencional entre los contactos de los casos índice.

Confirmamos el nivel socioeconómico bajo como determinante de la TB en San Luis Potosí y a la región Huasteca como origen de la mayoría de los nuevos casos (213/332, 64.1%), particularmente la Huasteca Sur con el 43.6% del total.

Especies, linajes, familias y diversidad genética de las cepas del CMTB circulantes

Hasta este estudio no se conocía la diversidad genética ni los linajes y familias de las cepas del CMTB circulantes en el estado. De 332 aislados espoligotipificados, 324 (97.6%) tuvieron patrones correspondientes a *M. tuberculosis* y ocho (2.4%) a *M. bovis*. Encontramos 140 espoligotipos diferentes. Predominó el Linaje 4 (Euro-

Americano) con 304 aislados. Le siguió el Linaje 1 (Indo-Oceánico) con 14 aislados, todos de la familia Manila SIT119 y el Linaje 2 (Asiático-Oriental) con seis aislados, todos de la familia Beijing SIT1. Estimamos cuantitativamente la gran diversidad genética del CMTB al determinar que el índice de Nei fue de 0.9, es decir, cercano al máximo de 1.0 y el de Simpson, que indica la probabilidad de que dos cepas tomadas al azar sean del mismo tipo, fue de 0.09.

Por tanto hay en el estado una alta diversidad genética en la que, debido a que el Linaje 4 (Euro-Americano) es el predominante y se distribuye uniformemente en toda su extensión geográfica, concluimos que la epidemia de la enfermedad en San Luis Potosí forma parte de la más amplia epidemia de TB en Latinoamérica. Sin embargo, debe tomarse especialmente en cuenta los casos por cepas de la familia Beijing del Linaje 2, de crucial importancia para la vigilancia epidemiológica de la TB que están emergiendo en todo el mundo, son más virulentas y tienen propensión a la farmacoresistencia.

Tuberculosis pulmonar humana por Mycobacterium bovis

El hallazgo de *M. bovis* en pacientes adultos con tuberculosis pulmonar fue inesperado ya que la infección por *M. bovis* es más frecuente en niños (es decir, un grupo demográfico fuera de la vigilancia epidemiológica de la TBP) y hasta hace poco se consideraba que la infección de origen bovino se adquiere casi exclusivamente por vía extrapulmonar.

Estos pacientes fueron diagnosticados en el sistema de vigilancia epidemiológica diseñado para detectar *M. tuberculosis* tanto en el campo como en el laboratorio. Todos los aislados fueron recuperados de cultivos en medio de Lowenstein-Jensen, no adecuado para la detección de *M. bovis*. Por estas razones creemos que la proporción de pacientes con TB pulmonar causada por *M. bovis* puede ser mayor al 2.4% detectado en este trabajo. En todo caso requiere un sistema de vigilancia y control ampliado respecto al que opera actualmente en los Servicios de Salud.

Magnitud de la transmisión reciente

La tipificación molecular ha permitido identificar casos no relacionados epidemiológicamente y ha transformado la forma en que se estima la transmisión reciente de la TB. Utilizamos un modelo matemático por el cual se estima la transmisión reciente analizando el tamaño y ordenamiento jerárquico de los espilogoclústeres basado en las diferencias del patrón de espaciadores atribuidos a eventos de mutación simple y toma en cuenta, además, el ritmo de tales mutaciones. La variable resultante es llamada Índice de Transmisión-Mutación (TMI) y constituye una aproximación a la magnitud de la transmisión reciente en nuestra población.

El 67.5% (224/332) de los aislados se agrupó en 32 espilogoclústeres entre los cuales los más numerosos fueron de los tipo SIT53 (96 aislados) y SIT 42 (20 aislados). El tamaño promedio de los clústeres fue de 2.4 y la tasa de mutación de 0.039. Así encontramos un $TMI = 0.11$, indicativo de que la transmisión reciente contribuye escasamente a la epidemiología de la TBP en San Luis Potosí.

Cadenas de transmisión reciente y cepas emergentes

Aunque la espilogotipificación agrega valor a la epidemiología convencional de la TBP, su grado de resolución es intermedio y por tanto desde el punto de vista casuístico (no poblacional) no es útil para detectar cadenas de transmisión con certidumbre. Para esta función requerimos un método de mayor resolución que diferencia cepas con alto grado de resolución. Se trata de la tipificación del Número Variable de Repetidos en Tándem de las Unidades Repetitivas Intercaladas de las Micobacterias (MIRU-VNTR por sus siglas en inglés). Se entiende que la transmisión reciente está delimitada en tiempo y lugar y ocurre en la misma comunidad dentro de los dos años previos a la presentación de los síntomas. Por esta razón seleccionamos los aislados de los espilogoclústeres con vínculos geográficos. Excluimos los espilogotipos de aislados únicos, pero dada su importancia epidemiológica, también tipificamos todos los aislados del clúster Beijing. Resolvimos 24 genotipos MIRU-VNTR y seis clústeres (3.6% de los aislados estudiados) que representan cadenas de transmisión. Comprobamos el vínculo epidemiológico de tres parejas con aislados de genotipo idéntico pero no

en las tres restantes, formadas por parejas de aislados cuyo tipo difiere en un solo locus VNTR. Dos de estas últimas parejas además pertenecen a la familia Beijing, es decir, representan un tercio de las cadenas de transmisión detectadas.

Con estos resultados confirmamos la utilidad de la tipificación MIRU-VNTR para detectar cadenas de transmisión en una muestra de espigoclusteros seleccionada.

Partes de la tesis

El Capítulo II, que sigue a esta introducción general, incluye los resultados sobre la epidemiología clásica de la TB, la farmacorresistencia, la diversidad genética de los aislados CMTB circulantes, la tuberculosis humana causada por *M. bovis* y la estimación de la transmisión reciente en el estado. Esta parte ha sido publicada en inglés, por lo cual el capítulo está redactado en ese idioma.

El Capítulo III está constituido por el manuscrito de un segundo artículo que presenta los resultados ampliados sobre la estimación cuantitativa de la diversidad genética del CMTB en el estado, la estimación de la transmisión reciente mediante el TMI (índice de transmisión-mutación) y la identificación de cadenas de transmisión por MIRU-VNTR, la detección de cepas emergentes y la evidencia de que la cepa Beijing parece estar emergiendo en el estado.

El Capítulo IV es una discusión general del trabajo, al que siguen las referencias generales, correspondientes a la Introducción y a la Discusión general.

El Anexo 1 relaciona los productos generados por este trabajo

El Anexo 2 es el convenio de colaboración del IPICYT con los Servicios de Salud, que hizo posible el trabajo.

El Anexo 3, denominado “Programa Estatal de Vigilancia Molecular de la Tuberculosis” es el documento que resume la situación de la epidemiología molecular de la TB en el estado revelada por este trabajo y la organización y los beneficios esperados de dicho programa que será propuesto a las autoridades de los Servicios de Salud del Estado.

CAPÍTULO II. GENETIC DIVERSITY OF THE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX IN SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO

Abstract

Background: Although epidemiologic and socioeconomic criteria and biomedical risk factors indicate high-priority for tuberculosis (TB) control in Mexico, molecular epidemiology studies of the disease in the country are scarce. **Methods:** Complete sociodemographic and clinical data were obtained from 248 of the 432 pulmonary TB (PTB) cases confirmed from 2006 to 2010 on the population under epidemiological surveillance in the state of San Luis Potosí, México. From most PTB cases with complete data *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) isolates were recovered and their spoligotypes, lineages and families, geographic distribution and drug resistance determined. **Results:** Pulmonary tuberculosis incidence ranged from 2.4 to 33.4 (cases per 100,000 inhabitants) in the six state sanitary jurisdictions that were grouped in regions of low (jurisdictions I-II-III), intermediate (jurisdictions IV-V) and high incidence (jurisdiction VI) with 6.2, 17.3 and 33.4 rates, respectively. Most patients were poor, 50-years-median- age males and housewives. Among the 237 MTC spoligotyped isolates, 232 corresponded to *M. tuberculosis* (104 spoligotypes in 24 clusters) and five to *M. bovis*. The predominant Euro-American lineage was distributed all over the state, the East-Asian lineage (Beijing family) in the capital city, the Indo-Oceanic (Manila family) in eastern localities, and *M. bovis* in rural localities. **Conclusions:** In San Luis Potosí TB affects mainly poor male adults and is caused by *M. tuberculosis* and to a minor extent by *M. bovis*. There is great genotypic diversity among *M. tuberculosis* strains, the Euro-American lineage being much more prevalent than the Indo-Oceanic and East-Asian lineages. The frequency of resistant strains is relatively low and not associated to any particular lineage.

Background

In 2007 the global incidence of tuberculosis (TB) was 139 (cases per 100,000 inhabitants), whereas in the Americas it was 36.8 (World Health Organization 2009), and in Mexico 13.5 (Castellanos-Joya et al. 2008). In the same year the Mexican states with highest incidences were Baja California (35.3) and Tamaulipas (32.7) whereas the incidence was 12.2 in the state of San Luis Potosí (Castellanos-Joya et al. 2008), where this study was performed. Although the national TB incidence is relatively low, the weight of epidemiologic and socioeconomic criteria and biomedical risk factors define Mexico as a high-priority country for TB control in the Americas (Panamerican Health Organization 2008).

TB reemergence, its association with the HIV-AIDS and diabetes epidemics (Ponce-De-Leon et al. 2004; Jimenez-Corona et al. 2009) and the emergence and spread of MDR strains demand that epidemiological and genotyping data of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC) isolates be used to identify chains of transmission (van der Spuy et al. 2003) and to differentiate TB cases due to endogenous reactivation (van Rie et al. 1999).

Spoligotyping, based on the polymorphism of spacer sequences of the direct repeat region (DR) is used to differentiate MTC isolates (Kamerbeek et al. 1997). Although less discriminatory than IS6110-based RFLP typing, it is a fast and cost-effective method allowing simultaneous analysis of numerous samples and generates contextual information on epidemiologically relevant MTC members (Filliol et al. 2003). Spoligotyping also identifies *M. bovis* strains, which usually carry few IS6110 copies (van Soolingen et al. 1993).

The Euro-American lineage of *M. tuberculosis* predominates in Mexico (Molina-Torres et al. 2010), where some areas also have high frequencies of the Indo-Oceanic lineage (Nava-Aguilera et al. 2011). In Mexico *M. bovis* also appears to be a relevant cause of pulmonary TB (PTB) in humans (Perez-Guerrero et al. 2008; Milian-Suazo et al. 2010), and the Beijing family of the *M. tuberculosis* East-Asian lineage has been mentioned in a recent paper (Jimenez-Corona et al. 2009).

In this work we analyze the epidemiology, geographic distribution, lineages, families and drug resistance patterns of the MTC strains isolated from PTB cases in the state of San Luis Potosí, Mexico.

Methods

Territory and population

The state of San Luis Potosí, located in North-Central Mexico, is divided in 58 municipalities and six sanitary districts designated as jurisdictions I, II, III, IV, V and VI (Table 1). From January 2006 to March 2010, 1339 PTB cases were confirmed in the population submitted to passive epidemiologic surveillance (patients 15-years-old or older with productive cough for more than two weeks and positive acid-fast bacilli smear) and included in a DOT program whose scheme and drugs were provided and supervised by the State Tuberculosis Program, as defined by the Mexican Standard for Tuberculosis Prevention and Control (Secretaría de Salud. 2005). Clinical information was elicited by medical personnel of dedicated brigades of the State TB Program and recorded in the National Epidemiologic Surveillance Platform. PTB incidence rates calculated from these cases were normalized for the population projected for 2010 (National Council of Population 2010) and complete sociodemographic and clinical data (name, sex, age, place of residence, occupation, formal education, previous TB history, contact with TB cases, concomitant disease and acid-fast bacilli smear) were collected from 248 cases (Figure 1). Alcoholism was defined as a behavior disorder indicated by a rank > 8 in the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) (Babor et al. 2001), and malnutrition by a body mass index < 18.5 (World Health Organization 2000). Diabetes mellitus was defined by blood glucose levels > 126 mg/dl in fasting samples or > 200 mg/dl in random samples (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2000). As indicator of socioeconomic level, the marginalization degree—a continuous integrative measure of the fraction of the population lacking access to goods and services essential for the development of basic capabilities—was stratified into five discrete indexes: very high, high, medium, low and very low (Anzaldo and

Prado). The Ethics and Research Committee of the San Luis Potosí State Health Services approved the study.

Culture and drug susceptibility of the MTC isolates

Sputum specimens were decontaminated with the Petroff method and simultaneously inoculated in the VersaTREK Myco System (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH) and Lowenstein-Jensen medium. Positive cultures were identified as MTC members with the Cobas Amplicor *M. tuberculosis* test (Roche Diagnostics, Grenzach-Whylen, Germany). MTC isolates were cryopreserved at -70°C in Middlebrook 7H9 medium (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH), recovered by reinoculation in the same medium and propagated in Lowenstein-Jensen medium from which colonies were picked and DNA extracted for genotyping.

Drug susceptibility was determined with the MYCO TB Susceptibility Testing kit (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH), in which a standard dilution of each isolate was inoculated in Middlebrook 7H9 medium containing the drugs assayed at two concentrations: streptomycin 2 and 6 $\mu\text{g/ml}$; isoniazid 0.1 and 0.4 $\mu\text{g/ml}$; rifampicin 5 and 1 $\mu\text{g/ml}$; ethambutol 5 and 8 $\mu\text{g/ml}$. Each test was controlled with the *M. tuberculosis* H37Rv sensitive strain and the ATCC 35820, 35822, 35837 and 35838 strains as controls for streptomycin-, isoniazid-, ethambutol-, and rifampicin-resistance, respectively. To validate each assay, resistant cultures were compared with drug-free controls.

Table 1. Population density, PTB incidence and MTC isolates per sanitary jurisdiction (January 2006 to March 2010)

Name	Sanitary jurisdiction				Incidence and isolates analyzed*		
	Municipalities	Area (km ²)	Inhabitants	Inhabitants/km ²	Cases (%)†	Incidence rate‡	MTC isolates (%)§
I	2	1,724.1	1,054,522	611.6	352 (26.3)	7.9	39 (16.5)
II	11	21,757.9	216,348	9.9	28 (2.1)	3.0	8 (3.4)
III	13	13,447.0	273,705	20.4	28 (2.1)	2.4	3 (1.3)
IV	12	12,410.1	239,800	19.3	122 (9.1)	12.0	39 (16.5)
V	9	8,900.0	372,945	41.9	329 (24.6)	20.8	53 (22.4)
VI	11	2,306.8	338,193	146.6	480 (35.8)	33.4	95 (40.1)
Total	58	60,545.9	2,495,513	41.2	1339 (100.0)	12.6	237 (100.0)

*MTC, *Mycobacterium tuberculosis* complex.

†PTB cases confirmed by positive acid-fast bacilli smear.

‡PTB cases per 100,000 inhabitants.

§MTC cultures recovered and analyzed by spoligotyping.

Spoligotyping

From 432 MTC strains isolated at the Public Health State Laboratory, 237 (54.9%) were sampled by convenience (Figure 1): 39 from jurisdiction I, eight from jurisdiction II, three from jurisdiction III, 39 from jurisdiction IV, 53 from jurisdiction V and 95 from jurisdiction VI. Sample size was approximately proportional to the number of PTB cases recorded in each jurisdiction (Table 1). The MTC isolates selected were those maintained by subculture that yielded enough DNA for genotyping. MTC DNA was extracted with the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method (Honore-Bouakline et al. 2003). Spoligotyping was carried out according to the manufacturer's instructions with the Isogen kit which includes a nitrocellulose membrane with 43 immobilized spacer sequences of the direct repeat (DR) region (Life Science, Maarsse, Netherlands). The spacers were amplified using primers DRa (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3') and DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'). *M. tuberculosis* H37Rv and CDC1551 and *M. bovis* BCG DNAs were used as positive controls. Hybridization of the PCR products was detected with the Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System (Amersham International plc, Buckinghamshire, United Kingdom). Spoligotypes were identified with the online MIRU-VTRNplus application (Weniger et al. 2010). MTC lineages and families

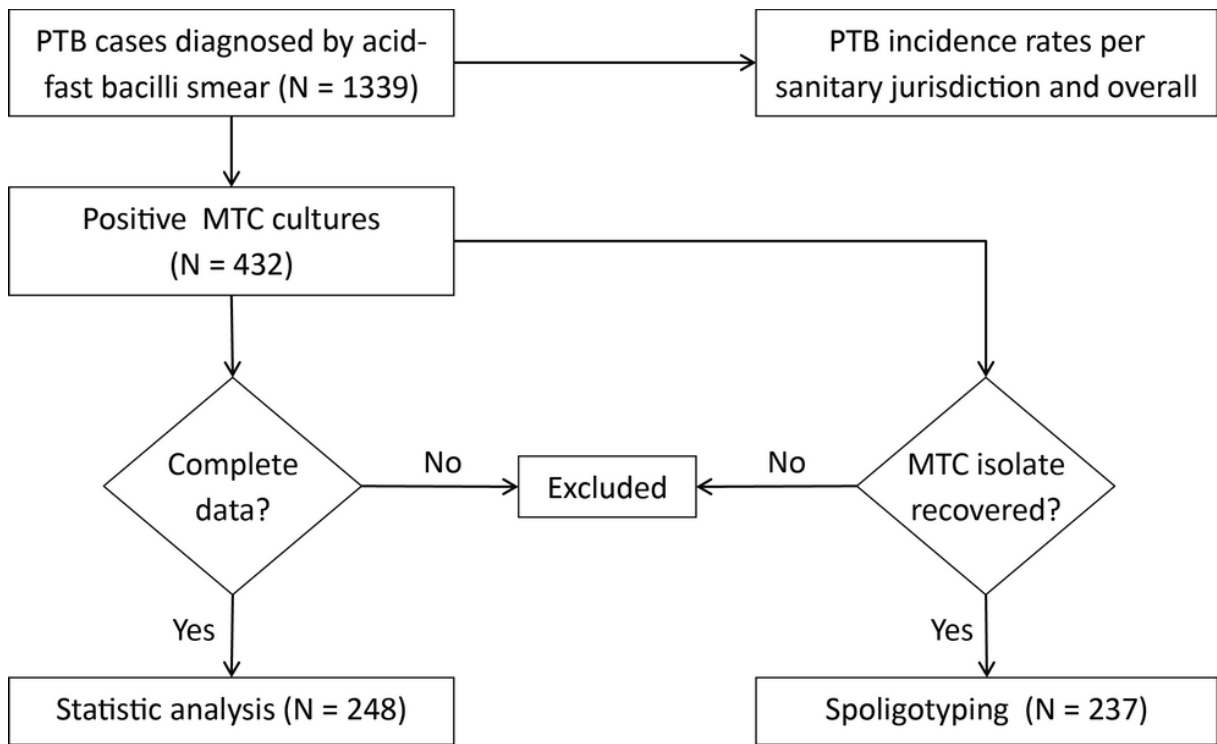


Figure 1. Flow diagram indicating the PTB cases, the cultured recovered and spoligotyped MTC isolates, and the statistical, geographic and genotypic analyses performed for this study

were assigned after identifying the best matches among genotypes from the internal reference database with a categorical coefficient of 1.7. For additional tree-based identification, a dendrogram of spoligotype patterns was generated using the un-weighted pair group method with the neighbor joining algorithm. Spoligotype patterns were also compared with those in the SITVIT2 database (Institut Pasteur de Guadeloupe, <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) (Brudey et al. 2006b) and the Mbovis.org database (Veterinary Laboratories Agency, <http://www.mbovis.org/index.php>).

Statistical analysis and geographic distribution of MTC species, lineages and families

Statistical analysis was carried out with the SPSS 18 software (IBM Corporation, Somers, NY). The Pearson χ^2 test was used to assess differences in sociodemographic and clinical variables among geographic zones, lineages and drug resistance. Differences in the ages of cases among geographic zones were assessed by one-way ANOVA. P values ≤ 0.05 were considered statistically significant. PTB cases and MTC lineages and families were linked to geographical coordinates provided by the Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática at city and community scale (National Institute of Statistics and Geography. 2010). MTC species, lineages and families were mapped using ArcMap 9.2 software (Esri, Redlands, CA)

Results

Pulmonary TB incidence per sanitary jurisdiction and region

From January 2006 to March 2010 the PTB incidence rate for the state of San Luis Potosí was 12.6, with remarkable differences per jurisdiction.

Jurisdictions I, II and III had lower incidence rates (7.9, 3.0, and 2.4, respectively); jurisdictions IV and V had intermediate rates (12.0 and 20.8, respectively), and jurisdiction VI, located in the southeastern end of the state, had the maximum rate (33.4). The combined incidence rate of the three jurisdictions with higher rates (IV, V and VI) was almost four times above that of jurisdictions with the lower rates (I, II and III) (Figure 2A).

In view of these differences we divided the state in three regions: the low incidence region (jurisdictions I, II and III with a combined rate of 6.2); the intermediate region (jurisdictions IV and V with a combined rate of 17.3); and the high incidence region (jurisdiction VI, with a rate of 33.4) (Figure 2B, Table 2).

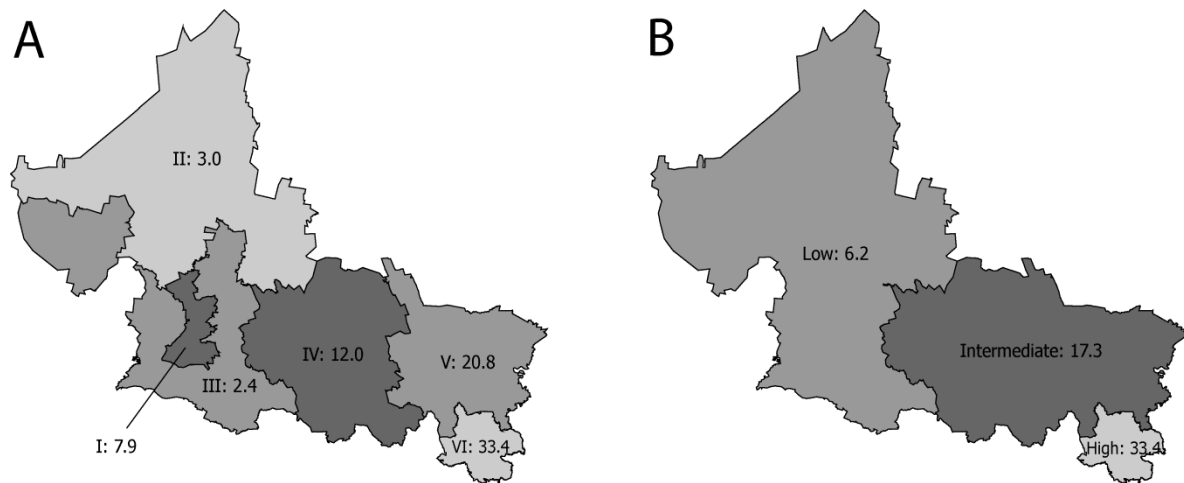


Figure 2. PTB incidence rates by jurisdiction and region

(A) Incidence rate by sanitary jurisdiction. Roman numerals followed by Arabic numerals indicate each one of the six sanitary jurisdictions of the state of San Luis Potosí and their corresponding PTB incidence rates (per 100,000 inhabitants) in 2008. (B) Regions of low (jurisdictions I, II and III), intermediate (jurisdictions IV and V), and high (Jurisdiction VI) incidence, with their corresponding rates

Table 2. Sociodemographic and clinical variables of the PTB cases in the low-, intermediate- and high-incidence regions of the state

Variable	Incidence region*				P†
	Low (6.2)	Intermediate (17.3)	High (33.4)	Overall (12.6)	
Number of PTB cases	63	83	102	248	---
Sex					
Male	40 (63.5) ‡	47 (56.6)	68 (66.7)	155 (62.5)	0.670
Female	23 (36.5)	36 (43.4)	34 (33.3)	93 (37.5)	0.861
Median age					
Years (range)	45 (18-86)	48 (15-80)	55 (16-95)	50 (15-95)	0.031
Occupation					
Farm worker	15 (23.8)	25 (30.1)	43 (42.2)	83 (33.5)	0.116
Housewife	18 (28.6)	31 (37.3)	28 (27.5)	77 (31.0)	0.449
Unemployed	11 (17.5)	12 (14.5)	19 (18.6)	42 (16.9)	0.779
Employee	12 (19.0)	4 (4.8)	3 (2.9)	19 (7.7)	0.001
Independent	5 (7.9)	8 (9.6)	7 (6.9)	20 (8.1)	0.819
Another	2 (3.2)	3 (3.6)	2 (2.0)	7 (2.8)	0.779
Formal education					
None	13 (20.6)	21 (25.3)	36 (35.3)	70 (28.2)	0.522
Incomplete primary	21 (33.3)	29 (34.9)	33 (32.4)	83 (33.5)	0.638
Primary	16 (25.4)	21 (25.3)	20 (19.6)	57 (23.0)	0.951
Secondary	11 (17.5)	12 (14.5)	11 (10.8)	34 (13.7)	0.192
College	2 (3.2)	0 (0)	2 (2.0)	4 (1.6)	0.301
Habitat					
Rural	11 (17.5)	45 (54.2)	88 (86.3)	144 (58.1)	< 0.001
Urban	52 (82.5)	38 (45.8)	14 (13.7)	104 (41.9)	< 0.001
Marginalization index					
Very high	0 (0)	9 (10.8)	0 (0)	9 (3.6)	< 0.001
High	12 (19)	18 (21.7)	102 (100.0)	132 (53.2)	< 0.001
Medium	2 (3.2)	33 (39.8)	0 (0)	35 (14.1)	< 0.001
Low	1 (1.6)	23 (27.7)	0 (0)	24 (9.7)	< 0.001
Very low	48 (76.2)	0 (0)	0 (0)	48 (19.4)	< 0.001
Previous history of TB					
No	59 (93.7)	75 (90.4)	90 (88.2)	224 (90.3)	0.951
Yes	4 (6.3)	8 (9.6)	12 (11.8)	24 (9.7)	0.549
Contact with TB cases					
Yes	8 (12.7)	24 (28.9)	29 (28.4)	61 (24.6)	0.086
No	55 (87.3)	59 (71.1)	73 (28.4)	187 (75.4)	0.449
Concomitant disease					
None	34 (54.0)	37 (44.6)	50 (49.0)	121 (48.8)	0.741
Diabetes	20 (31.7)	19 (22.9)	14 (13.7)	53 (21.4)	0.047
Malnutrition	4 (6.3)	15 (18.1)	22 (21.6)	41 (16.5)	0.061
Alcoholism	1 (1.6)	7 (8.4)	15 (14.7)	23 (9.3)	0.026
HIV-AIDS	4 (6.3)	1 (1.2)	0 (0)	5 (2.0)	0.017
Other	0 (0)	4 (4.8)	1 (1.0)	5 (2.0)	0.082
Acid-fast bacilli smear					
Positive	56 (88.9)	78 (94.0)	100 (98.0)	234 (94.4)	0.016
Negative	7 (11.1)	5 (6.0)	2 (2.0)	14 (5.6)	0.584

*Number of cases per 100,000 inhabitants in parenthesis.

† χ^2 . One-way ANOVA, for age difference.

‡Numbers in parenthesis are percentages between variable categories, except in the median age where they are ranges

In the high incidence region the median age of confirmed PTB cases (55 years) was ten years higher and significantly different ($P = 0.031$) to that of the low incidence region, and seven years higher than that of the intermediate incidence region. The proportion of patients living in rural communities increased significantly ($P < 0.001$) from the low (17.5%) to the intermediate (54.2%) and high incidence (86.3%) regions. The proportion of patients residing in municipalities of high marginalization also increased significantly ($P < 0.001$) from the low (19.0%) to the intermediate (21.7%) and high incidence (100.0%) regions.

Features of the PTB cases

The overall median age of PTB cases in the state was 50 years. Two thirds (62.5%) were men, one half (50.4%) were unemployed and employed construction workers or farm workers, and one third (31.0%) were housewives. Nearly two thirds (61.7%) had either incomplete primary education or no formal education at all. More than half (58.1%) resided in rural localities and 53.2% in highly marginalized municipalities (Table 2).

Most cases (90.3%) did not have a previous history of TB and 75.0% declared not to have contacted other PTB cases. One half (51.2%) had a concomitant disease; the most frequent was diabetes (21.4%), followed by malnutrition (16.5%) and alcoholism (9.3%).

Diabetes-PTB association decreased significantly ($P = 0.047$) from the low (31.7%) to the intermediate (22.9%) and high incidence (13.7%) regions. In contrast, malnutrition-PTB association did not increase significantly ($P = 0.061$) from the high incidence region (6.3%) to the intermediate (18.1%) and low incidence (21.6%) regions. Alcoholism as a concomitant disease increased significantly ($P = 0.026$) from the low incidence region (1.6%) to the intermediate (8.4%) and high incidence (14.7%) regions. Marginalization is directly related to malnutrition and alcoholism and inversely related to diabetes since the first two concomitant diseases predominate in the high incidence region and diabetes in the low incidence region.

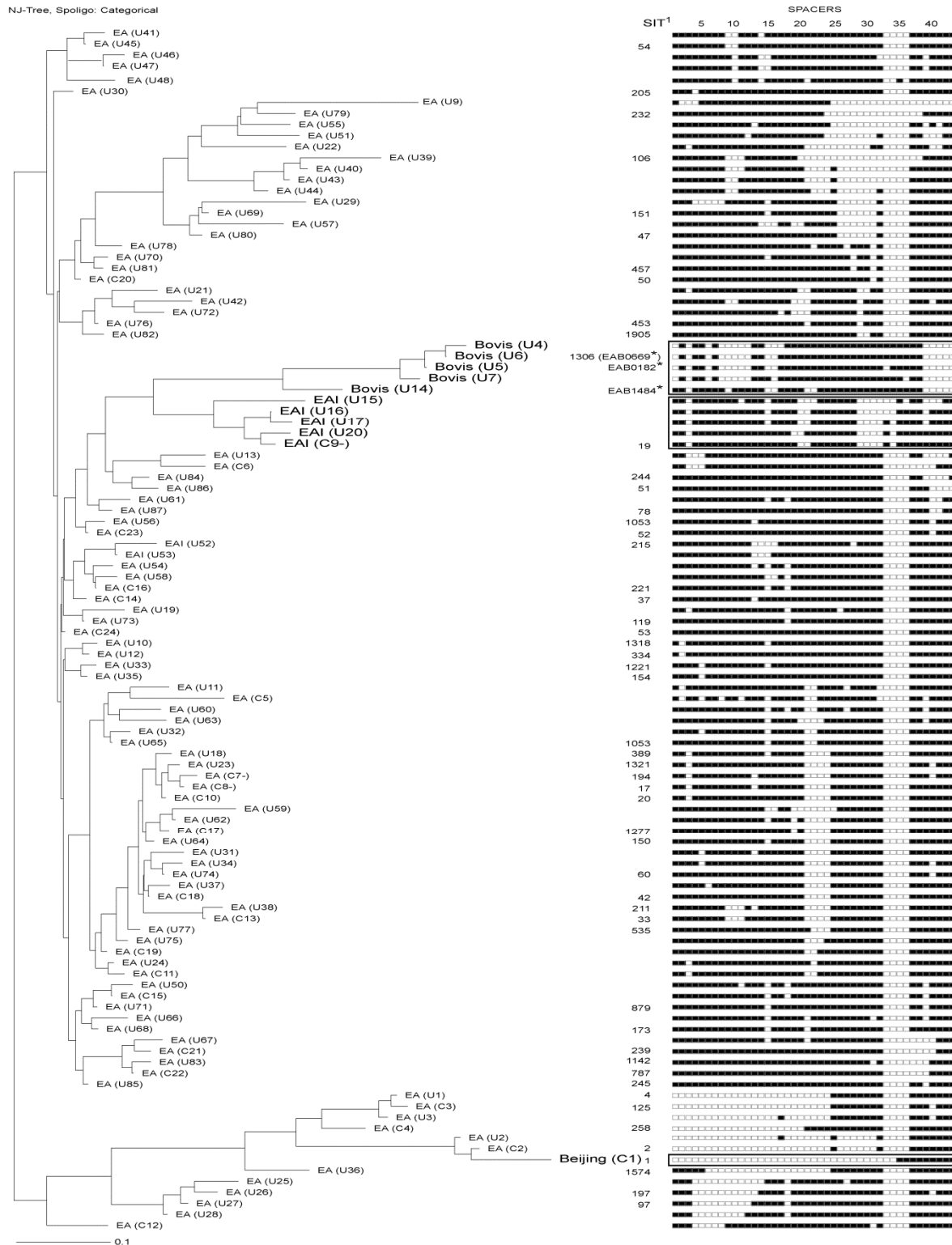


Figure 3. Dendrogram, families and spoligotype patterns of the 109 MTC genotypes identified

M. tuberculosis isolates of the Euro-American lineage are indicated with smaller font labels and those of other lineages and *M. bovis* isolates are indicated with larger font labels and their spoligotype patterns enclosed in rectangles. SIT: Spoligo

international type numbers from the SpolDB4 database. *M. bovis* spoligotype identifiers (marked with asterisks) from the Mbovis.org database

Lineages, families and clusters of the MTC isolates

Spoligotypes of the 237 isolates analyzed corresponded to two MTC species: 232 to *M. tuberculosis* (97.8%) and five to *M. bovis* (2.1%). Four lineages and 109 genotypes were identified (Figure 3). Fifty five genotypes (50.5%) had already been registered (53 in SpolDB4 and three in the Mbovis.org database; one of the five *M. bovis* genotypes had been registered in both databases).

Of the *M. tuberculosis* isolates, 221 (95.3%) had Euro-American lineage spoligotypes, among which 118 (53.4%) were SIT53, SIT42, SIT20, SIT221, SIT239, SIT50, SIT787, SIT17 and SIT258, and 55 isolates (24.9%) had previously undetected (“orphan”) Euro-American genotypes. Eleven isolates had spoligotypes characteristic of other lineages and families: eight (3.4%) corresponded to the EAI-Manila family of the Indo-Oceanic lineage, and three isolates with identical spoligotypes (1.3%) to the Beijing family of the East-Asian lineage. Of the 109 genotypes identified, 85 (78.0%) appeared in a single isolate and the remaining 24 (22.0%) in clusters of two up to 68 isolates (Table 3).

One hundred and fifty two isolates (64.1%) were grouped in clusters. The two largest clusters were formed by 68 isolates of SIT53 genotype and 14 isolates of SIT42 genotype (Table 3).

Euro-American isolates were distributed all over the state (Figure 4A). Beijing isolates were located in the San Luis Potosí City metropolitan area (Figure 4B), EAI-Manila isolates in the easternmost jurisdictions V and VI, and *M. bovis* isolates in five southern rural communities from jurisdictions I, IV and V (Figure 4B).

Thus in the state of San Luis Potosí there is great genetic diversity in the circulating MTC strains, among which the Euro-American lineage predominates.

Lineages and families of drug-resistant MTC isolates

Twenty-three of the 237 spoligotyped isolates were resistant to one or more drugs: nine were resistant to isoniazid, two to rifampicin, two to other drugs, and 10 were MDR (Table 4). Eleven of the 13 single-drug-resistant isolates were of the Euro-American lineage. Among the MDR isolates, nine were of the Euro-American lineage and one was of the Indo-Oceanic (EAI-Manila) lineage. One rifampicin-resistant isolate was of the EAI-Manila family and one isoniazid-resistant isolate was of the Beijing family. Thirteen single drug-resistant and eight MDR isolates came from jurisdictions V and VI.

In summary, 9.7% of the isolates were resistant to one or more drugs and 4.2% were MDR; 3.8% were resistant only to isoniazid, 0.8% only to rifampicin and 0.8% to other drugs. Although most (84.6%) of the single drug-resistant isolates and 90% of the MDR ones were of the Euro-American lineage, association between drug resistance of any kind with the lineage or family of the isolates was not significant ($P = 0.653$)

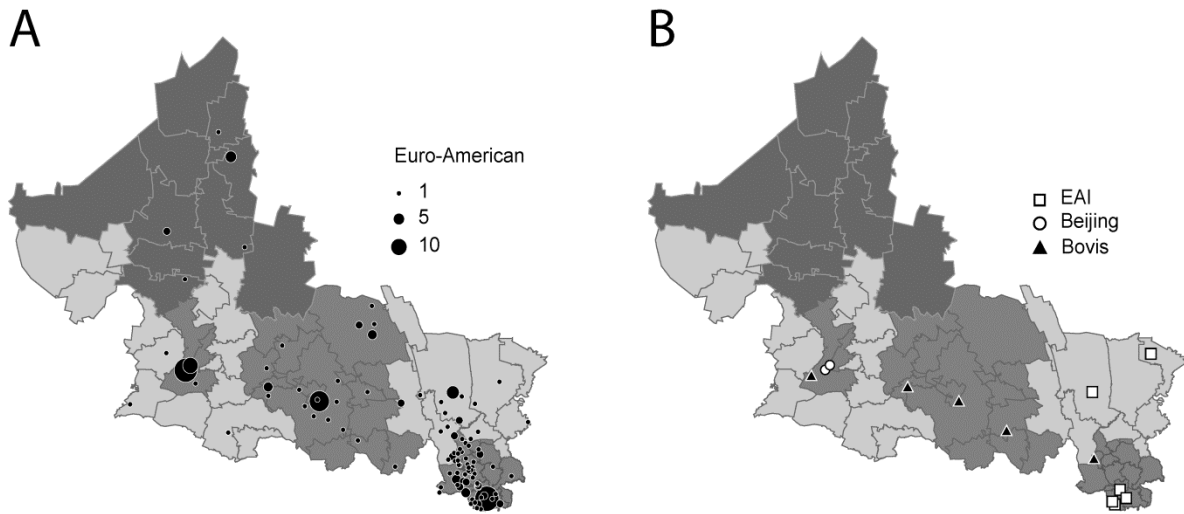


Figure 4. Geographic distribution of the Euro-American and other MTC lineages found

(A) Distribution of the Euro-American lineage. (B) Distribution of the EAI, Beijing and Bovis lineages. The symbols indicate the localities with PTB cases associated to each lineage; the area of each circle is proportional to the number of cases per locality.

Table 4. Lineages of the drug-resistant MTC isolates

Lineage	Single-drug resistance			MDR	Total
	Isoniazid	Rifampicin	Other drugs*		
Euro-American	8 (3.4%)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	9 (3.8%)	20 (8.4%)
Indo-Oceanic (EAI)	0	1 (0.4%)	0	1 (0.4%)	2 (0.8%)
East-Asian (Beijing)	1 (0.4%)	0	0	0	1 (0.4%)
Total	9 (3.8)	2 (0.8%)	2 (0.8%)	10 (4.2%)	23 (9.7%)

*Isolates resistant to one first line drug other than isoniazid or rifampicin

Discussion

Low socioeconomic status, a TB determinant, includes risk factors such as food insecurity, poor housing and cultural, financial and geographic barriers for access to health services (Hargreaves et al. 2011). We confirmed that in San Luis Potosí PTB incidence correlates with low socioeconomic status since nearly two thirds of the patients resided in rural communities and more than half of them lived in highly marginalized municipalities.

Overall PTB incidence in the state (12.6) is remarkably different to that of each sanitary jurisdiction and led us to divide the state in three incidence regions (Figure 2). The low incidence region comprises jurisdictions I, II and III; the intermediate incidence region comprises jurisdictions IV and V. The high incidence region corresponds to jurisdiction VI; located in the southeastern part of the state, it is a tropical, predominantly rural and highly marginalized area, with 48% of indigenous population (Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2010) and a population density 1.5 higher than that of the other jurisdictions combined, except for jurisdiction I, where the capital city is located (National Council of Population 2010).

Marginalization indexes differentiate municipalities by the impact of variables threatening life quality such as house overcrowding, low educational level and lack of electricity, running water and sanitary services (Anzaldo and Prado). In San Luis Potosí we confirmed that regional TB incidence correlates with the socioeconomic gradient, as is known to occur within countries and within communities, the poorest ones being affected most (Lonnroth et al. 2009).

Although residents of urban areas are believed to be at higher risk of TB (Hargreaves et al. 2011), most of the cases in the high incidence region reside in rural communities. This finding may be due to risk factors such as overcrowding, indoor pollution, and poor ventilation in the rural communities affected.

Marginalization is directly related to the incidence of malnutrition and alcoholism and inversely related to the incidence of diabetes since the first two concomitant diseases predominate in the high incidence region and diabetes in the low incidence region.

Sociodemographic and clinical variables in the low incidence region are similar to those in Monterrey and Acapulco (Molina-Torres et al. 2010; Nava-Aguilera et al. 2011), two Mexican cities of relatively low marginalization. In contrast, such variables in the high incidence region resemble more those of highly marginal rural regions of the Mexican state of Chiapas (Sanchez-Perez et al. 2010) where the average age of PTB cases is around 40 years, whereas in the high incidence region of San Luis Potosí it is close to 53 years. Both the transmission-mutation index derived from the spoligoforest analysis and the transmission chains identified by MIRU-VNTR genotyping indicate that recent transmission contributes marginally to the epidemiology of TB (E. López-Rocha et al., manuscript in preparation), whereas the advanced age of the cases and the high proportion of positive acid-fast bacilli smears (94.4%) indicates delayed disease detection. These findings support the notion that in San Luis Potosí endogenous reactivation contributes to TB epidemiology much more than recent transmission (Borgdorff et al. 2001).

One tenth of the MTC isolates in San Luis Potosí are resistant to one or more drugs; 4.2% are MDR, a proportion below the national average of 5.8% (World Health Organization 2008) and lower than that of the American continent (7.2%) (Panamerican Health Organization 2008). No statistically significant association of drug resistance and MTC lineage was found.

Most of the spoligotyped MTC isolates corresponded to *M. tuberculosis* and only 2.1% to *M. bovis*. *M. tuberculosis* isolates had 104 different genotypes among which only 52 (50.0%) had been registered in SpolDB4, and correspond to three lineages: Euro-American, Indo-Oceanic and East-Asian. A comprehensive study of MTC genotypes based on the analysis of large sequence polymorphisms found that Euro-American is the predominant *M. tuberculosis* lineage in Latin America (Gagneux et al. 2006). The same lineage has been shown to be prevalent in the Mexican cities of Orizaba (Jimenez-Corona et al. 2009) and Monterrey (Molina-Torres et al. 2010), and we also found it to be the most prevalent in San Luis Potosí (95.3%) with SIT53, SIT42, SIT20, SIT221, SIT239, SIT50, SIT787, SIT17 and SIT258 as its main genotypes

In San Luis Potosí 21.8% of the *M. tuberculosis* genotypes are grouped in clusters, the largest one being that with 68 isolates of the SIT53 genotype, and the second largest with 14 isolates of the SIT42 genotype. The SIT53 genotype, belonging to the ill-defined T1 sub lineage, is ubiquitous and the most frequent in SpolDB4 (Brudey et al. 2006b); the SIT42 genotype is also ubiquitous and ranks sixth in the same database. In the Mexican city of Monterrey the largest cluster corresponds to the SIT53.

The least frequent *M. tuberculosis* lineages in San Luis Potosí are the Indo-Oceanic (EAI-Manila family, 3.4%) and the East-Asian (Beijing family, 1.3%). The EAI-Manila family —endemic in Southeast Asia, South India and East Africa— was recognized in Filipino immigrants in the United States and later shown to be highly prevalent in the Philippines (Douglas et al. 2003). It was identified in Mexico for the first time in Orizaba, Veracruz (Martinez-Gamboa et al. 2008). Four of our eight EAI isolates correspond to the ubiquitous and common SIT19 genotype and could also have originated from the Philippines, given the commercial links of that region with Mexico from 1565 to 1815 through the Manila-Acapulco galleon (Schurz 1917). This hypothesis is consistent with the recent finding that one fourth of the *M. tuberculosis* isolates in Acapulco correspond to the EAI family (Nava-Aguilera et al. 2011), where the largest cluster has the SIT19 genotype previously found in Monterrey (Molina-Torres et al. 2010), and now by us in a cluster with four isolates.

Our three Beijing isolates have the SIT1 genotype and, although a transmission chain cannot be discarded, their low prevalence suggests they arose from independent transmission events. SIT1, the second most frequent genotype in SpolDB4 (Brudey et al. 2006b), is ubiquitous —it has been identified in 29 countries and eight geographic areas—, epidemic (propagation index = 44.2), highly virulent (Hanekom et al. 2007) and appears to have selective advantages over other genotypes (Cowley et al. 2008). Only one Mexican PTB case by a Beijing strain from Orizaba, Veracruz, has been published (Jimenez-Corona et al. 2009). Although the presence of this genotype in San Luis Potosí is worrying, its low frequency suggests that up to now its transmission is negligible.

The genetic diversity of the MTC appears to be geographically structured (Gagneux et al. 2006), since some strains preferably infect certain human populations and the association between pathogens and their hosts appear to be stable (Hirsh et al. 2004). These data led to the notion that the worldwide TB pandemic is the sum of genetically different outbreaks (Brudey et al. 2006b). Since the Euro-American lineage is distributed all over the state, the Beijing family is limited to the capital metropolitan area and the EAI-Manila family to the eastern part of the state, the TB epidemic in San Luis Potosí may be interpreted as a part of the wider TB epidemic in Latin America, with an outbreak of the EAI lineage and some Beijing cases.

All our five *M. bovis* isolates have different spoligotypes and come from rural communities located in the dairy region of the state. The prevalence of human TB of bovine origin in San Luis Potosí may be much higher than 2.1% since bovine TB has been eradicated from only one Mexican state (National Service of Agri-food Health and Quality. 2010), and all the MTC isolates recovered for this study were initially cultured in Lowenstein-Jensen medium, more appropriate for *M. tuberculosis* than for *M. bovis* (Corner and Nicolacopoulos 1988). Therefore, the surveillance of human TB caused by *M. bovis* must be reinforced in the state health program.

The MTC strains included in this study were only those that were kept and recovered at the Public Health State Laboratory, where most state TB cases are concentrated. Although scarce, cases from individuals affiliated to the Mexican Social Security Institute or other organizations may have been overlooked. On the other hand, minor mistakes in the assignment of MTC lineages and families may have occurred, since the dendrogram-based similarities used by us to identify the isolates are known to be 94.1% accurate (Allix-Beguec et al. 2008b).

The prevalence of human TB due to *M. bovis* correlates with TB prevalence in cattle, and most human cases are related to consumption or handling of contaminated dairy products (Cosivi et al. 1998). Although the prevalence of human TB of bovine origin in Mexico is unknown, 5.3% of the MTC strains isolated from sputum samples of PTB cases in a zone endemic for bovine TB in the Mexican

state of Querétaro had *M. bovis* spoligotypes (Perez-Guerrero et al. 2008). In the same endemic zone a study on asymptomatic farm workers identified *M. bovis* spoligotypes in 10.8% of sputum and 5.3% of urine samples (Milian-Suazo et al. 2010). Other population studies in Mexico found *M. bovis* spoligotype frequencies of 0.6% in Monterrey (Molina-Torres et al. 2010) and 0.4% in Acapulco (Nava-Aguilera et al. 2011).

Conclusions

This is the first study on the molecular epidemiology of TB which covers a complete state in Mexico. In the state of San Luis Potosí, PTB incidence correlates with low socioeconomic status and the prevalent MTC strains show high genetic diversity and appear to be part of the wider TB epidemic in Latin America. Our findings show the need to implement TB control plans adapted to each incidence region in the state, including routine monitoring of the circulating MTC genotypes and reinforcing *M. bovis* surveillance.

References

- Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S (2008b) Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *J Clin Microbiol* 46:2692-2699
- Anzaldo C, Prado M Methodology for estimation of the marginalization index [in Spanish]. Consejo Nacional de Población, México, DF. México
- Babor T, Higgins-Biddle J, Saunders J, Monteiro M (2001) The alcohol use disorders identification test. Guidelines for Use in Primary Care. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, de Haas PE, van Soolingen D (2001) Transmission of Mycobacterium tuberculosis depending on the age and sex of source cases. *Am J Epidemiol* 154:934-943
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, et al. (2006b) Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6:23
- Castellanos-Joya M, García-Avilés MA, Tellez-Medina HA (2008) Tuberculosis in Mexico [in Spanish] *Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*

- Corner LA, Nicolacopoulos C (1988) Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Aust Vet J* 65:202-205
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX (1998) Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4:59-70
- Cowley D, Govender D, February B, Wolfe M, Steyn L, Evans J, Wilkinson RJ, Nicol MP (2008) Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Cape Town, South Africa. *Clin Infect Dis* 47:1252-1259
- Douglas JT, Qian L, Montoya JC, Musser JM, Van Embden JD, Van Soolingen D, Kremer K (2003) Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 41:2723-2726
- Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Dang DA, et al. (2003) Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 41:1963-1970
- Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM (2006) Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2869-2873
- Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CR, Kidd M, Beyers N, Victor TC, van Helden PD, Warren RM (2007) A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol* 45:1483-1490
- Hargreaves JR, Boccia D, Evans CA, Adato M, Petticrew M, Porter JD (2011) The social determinants of tuberculosis: from evidence to action. *Am J Public Health* 101:654-662
- Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM (2004) Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4871-4876
- Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL (2003) Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol* 41:2323-2329
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010) Censo de Población y Vivienda 2005. Principales resultados por localidad. Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- Jimenez-Corona ME, Garcia-Garcia L, Leon AP, Bobadilla-del Valle M, Torres M, Canizales-Quintero S, Palacios-Merino C, Molina-Hernandez S, Martinez-Gamboa RA, Juarez-Sandino L, Cano-Arellano B, Ferreyra-Reyes L, Cruz-Hervert LP, Baez-Saldana R, Ferreira-Guerrero E, Sada E, Marquina B, Sifuentes-Osornio J (2009) Research on conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Orizaba, Veracruz, 1995-2008 [in Spanish]. *Salud Publica Mex* 51 Suppl 3:S470-478

- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-914
- Lonroth K, Jaramillo E, Williams BG, Dye C, Raviglione M (2009) Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med* 68:2240-2246
- Martinez-Gamboa A, Ponce-de-Leon A, Galindo-Fraga A, Bobadilla-del-Valle M, Kato-Maeda M, Robertson BD, Young DB, Small PM, Sifuentes-Osornio J (2008) Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains with an intact *pks15/1* gene in a rural community of Mexico. *Arch Med Res* 39:809-814
- Milian-Suazo F, Perez-Guerrero L, Arriaga-Diaz C, Escartin-Chavez M (2010) Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Prev Vet Med* 97:37-44
- Molina-Torres CA, 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* 48:448-455
- National Council of Population (2010) Mexico Population Projections: 2005-2030 [in Spanish]. The Council
- National Institute of Statistics and Geography. (2010) Vectorial data set of the national geostatistical frame [in Spanish]. The Institute
- National Service of Agri-food Health and Quality. (2010) Strategic Plan for the Campaign against the Bovine Tuberculosis in Mexico, 2008-2012 [in Spanish]. The Service, México, DF
- Nava-Aguilera E, Lopez-Vidal Y, Harris E, Morales-Perez A, Mitchell S, Flores-Moreno M, Villegas-Arrizon 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
- Panamerican Health Organization (2008) Tuberculosis in the Americas. 2008 Regional Report [in Spanish]. The Organization, Washington, DC
- Perez-Guerrero L, Milian-Suazo F, Arriaga-Diaz C, Romero-Torres C, Escartin-Chavez M (2008) Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico [in Spanish]. *Salud Publica Mex* 50:286-291
- Ponce-De-Leon A, Garcia-Garcia Md Mde L, Garcia-Sancho MC, Gomez-Perez FJ, Valdespino-Gomez JL, Olaiz-Fernandez G, Rojas R, Ferreyra-Reyes L, Cano-Arellano B, Bobadilla M, Small PM, Sifuentes-Osornio J (2004) Tuberculosis and diabetes in southern Mexico. *Diabetes Care* 27:1584-1590
- Sanchez-Perez HJ, Diaz-Vazquez A, Najera-Ortiz JC, Balandrano S, Martin-Mateo M (2010) Multidrug-resistant pulmonary tuberculosis in Los Altos, Selva and Norte regions, Chiapas, Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 14:34-39
- Schurz WL (1917) The Manila galleon and California. *Southwestern Historical Quarterly* 21:107-126
- Secretaría de Salud. (2005) Modification to the Official Mexican Standard NOM-006-SSA2-1993, for the prevention and control of tuberculosis in primary health attention [in Spanish]. La Secretaría, Diario Oficial de la Federación, pp 1-12

- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2000) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 23 Suppl 1:S4-19
- van der Spuy GD, Warren RM, Richardson M, Beyers N, Behr MA, van Helden PD (2003) Use of genetic distance as a measure of ongoing transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 41:5640-5644
- van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD (1999) Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 341:1174-1179
- van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD (1993) Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 31:1987-1995
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D (2010) MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 38:W326-331
- World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Vol 894. WHO, Geneva, Switzerland
- World Health Organization (2008) Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. The Organization, Geneva
- World Health Organization (2009) Global tuberculosis control: Epidemiology, Strategy, Financing. WHO, Geneva, Switzerland

CAPÍTULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* Y CADENAS DE TRANSMISIÓN RECIENTE IDENTIFICADAS POR GENOTIPIFICACIÓN VNTR EN SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO

Resumen

CONTEXTO. Previamente demostramos la diversidad genética de las cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) aisladas de casos de tuberculosis pulmonar (TBP) en el estado de San Luis Potosí, México. En este trabajo ampliamos el estudio previo, estimamos la transmisión de la TBP e identificamos las cadenas de transmisión reciente y las cepas emergentes del CMTB. MÉTODOS. Se determinaron los espoligotipos, especies, linajes y familias de las cepas del CMTB de 332 casos de TBP diagnosticados entre 2006 y 2011 (muestra 46% mayor a la del estudio previo). El número total de casos de TBP diagnosticados en el periodo e identificados entre los contactos fue recuperado de la base de datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Módulo Tuberculosis. Los índices de diversidad genética de Nei y de Simpson fueron determinados a partir del conjunto de espoligotipos y el índice de transmisión-mutación (TMI) con las variables del *spoligoforest*. Los aislados involucrados en cadenas de transmisión reciente fueron identificados por sus patrones de 15 loci MIRU-VNTR entre los de espoligoclústeres, i.e., grupos de aislados con espoligotipos idénticos y vínculos geográficos. Los índices discriminatorios de los genotipos VNTR fueron calculados con la fórmula de Hunter-Gaston y las cepas emergentes del CMTB identificadas con el método de Storey aplicado a los espoligotipos. RESULTADOS. Entre los aislados del CMTB 324 tuvieron espoligotipos de *M. tuberculosis* (97.6%) y ocho de *M. bovis* (2.4%); sólo 73 de los 140 espoligotipos identificados están registrados en bases de datos internacionales. Doscientos veinticuatro aislados se agruparon en espoligoclústeres, siendo los principales SIT53 (n = 96) y SIT42 (n = 20). Predominó el Linaje 4 (Euro-Americano) con 304 aislados, seguido del Linaje 1 (Indo-Oceánico) con 14 aislados y el Linaje 2 (Asiático Oriental) con seis aislados. Valores de los índices: H = 0.91 (Nei), S = 0.09 (Simpson), TMI = 0.11. Entre los 1,648 casos diagnosticados en el periodo se detectaron 61 casos de

TBP entre los contactos investigados. Entre los 32 espigocústeres del CMTB identificados estuvieron geográficamente relacionados siete, formados por 31 aislados (9.3% del total) en cústeres de 2 a 14 aislados. Entre los espigocústeres se identificaron 25 genotipos VNTR y seis parejas de aislados implicados en cadenas de transmisión (3.7% del total): tres parejas con contactos probados y tres sin contactos probados; dos de las tres últimas parejas corresponden a la familia Beijing. Índice discriminatorio de Gunter-Gaston para los 15 loci MIRU-VNTR, HGDI = 0.997. CONCLUSIONES. El número de espigotipos, linajes y familias del CMTB y los índices de Nei y Simpson confirman la diversidad de las cepas del CMTB circulantes en San Luis Potosí. La baja proporción de casos detectados entre los contactos (7.4%) y el TMI = 0.11 indican que la epidemiología de la TBP no se debe a transmisión reciente sino principalmente a reactivación endógena. La genotipificación VNTR identificó seis cadenas de transmisión (3.6% de los aislados, i.e., tres veces menos que el valor del TMI). Las cepas emergentes identificadas con el método de Storey son SIT53 y SIT42; sin embargo, dos de las seis cadenas de transmisión son de la cepa Beijing, que parece estar emergiendo.

PALABRAS CLAVE: Epidemiología molecular, transmisión reciente, VNTR.

Introducción

La tuberculosis (TB) sigue siendo un problema de salud pública global de enormes dimensiones. En 2011 se estimaron 8.7 millones de casos nuevos y murieron 1.4 millones de personas a causa de esta enfermedad, entre ellas 500,000 mujeres y 500,000 niños (World Health Organization. 2012). Un objetivo central de la Stop TB Strategy es lograr el acceso universal de servicios de salud de alta calidad a todos los enfermos de TB mediante el apoyo para desarrollar herramientas que permitan el control oportuno y efectivo de la enfermedad y la dirección de esfuerzos a las necesidades de los contactos de los enfermos, que en México son pobres y vulnerables (Lopez-Rocha et al. 2013).

En el estado de San Luis Potosí la principal medida de control y prevención de la TB pulmonar (TBP) pretende cortar la transmisión de los casos bacilíferos mediante el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES). Esta estrategia supone que el contagio es el principal factor para el mantenimiento de la enfermedad, pero no diferencia acciones para combatir la enfermedad debida a transmisión reciente de la debida a reactivación endógena, pues la vigilancia epidemiológica actual incluye la investigación extensiva de los contactos pero no la genotipificación, mediante la cual nuestro grupo determinó la gran diversidad genética del CMTB en el estado (Lopez-Rocha et al. 2013).

Planteamiento del problema

Entre las actividades de prevención y control de la TBP la investigación de contactos, el diagnóstico de enfermedad activa o latente y el tratamiento profiláctico son tan importantes como la identificación, el tratamiento y la curación de los casos de TBP activa.

A partir del descubrimiento de los primeros marcadores genéticos del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) la tipificación molecular de los aislados ha permitido identificar casos no relacionados y ha transformado la forma en que se evalúa la transmisión reciente (Small et al. 1994) pues permite trazar contactos que no dilucida la investigación clásica (van Deutekom et al. 2004). Sin embargo, así como como la investigación de casos es insuficiente para determinar toda la red de contactos de los casos índice, no basta la genotipificación para determinar la extensión de la transmisión reciente.

La investigación sistemática de espiligoclústeres con vínculos epidemiológicos (i.e., aislados del CMTB agrupados por tener espiligotipos idénticos y la misma localización geográfica) en combinación con la tipificación MIRU-VNTR añade valor a la información recogida por la epidemiología clásica de la TBP, pues detecta cadenas de transmisión que no puede identificar la investigación convencional de contactos y sirve para vigilar la transmisión reciente y monitorear el control de la enfermedad (McNabb et al. 2004) en la toma de decisiones que diferencien y prioricen los esfuerzos entre grupos sociodemográficos y territoriales.

Justificación

La tasa de incidencia de la TBP en México es relativamente baja —23 casos por 100,000 habitantes en 2011— y se ha mantenido prácticamente sin cambio durante los seis años del periodo 2006-2011 (World Health Organization 2013). En el estado de San Luis Potosí la tasa promedio de incidencia de TBP fue 12.7 en el periodo 2006-2011, pero su rango fue de 2.4 a 33.4 en las diferentes jurisdicciones sanitarias (Lopez-Rocha et al. 2013).

Estas notables desigualdades ocurren en todo el país, pues en 2011 las tasas de incidencia variaron desde 4.5 en el estado de Tlaxcala hasta 54.8 en el estado de Baja California (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades 2013). En México por tanto persiste una distribución inequitativa de los factores de riesgo y las condiciones socioeconómicas que han colocado al país entre los de alta prioridad para el control de la TB en las Américas (Panamerican Health Organization 2008).

En este trabajo ampliamos nuestro estudio reciente en el que demostramos la gran diversidad genética del CMTB en San Luis Potosí mediante el análisis de espigotipos; adicionalmente estimamos aquí el índice de transmisión-mutación (TMI) basado en el conjunto de los espigotipos observados, e identificamos las cadenas de transmisión reciente mediante el examen de los patrones MIRU-VNTR de los aislados del CMTB agrupados en espigocústeres.

Material y métodos

Territorio, población y periodo estudiado

Entre enero de 2006 y abril de 2011 fueron diagnosticados 1,648 casos de TBP en el estado de San Luis Potosí (Fig. 1). La información sobre los contactos declarados entre los casos oficiales, los contactos investigados y la proporción de casos detectados entre los contactos fue recuperada de la base de datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Módulo Tuberculosis con autorización de los Servicios de Salud de San Luis Potosí (Tabla 1)

En este estudio incluimos una muestra por conveniencia de 332 aislados provenientes de las seis jurisdicciones sanitarias del estado (Tabla 2),

conservados en la colección de cepas del Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí. El número de aislados del CMTB que pudieron recuperarse por jurisdicción sanitaria fue aproximadamente proporcional al de la incidencia de la TBP en cada jurisdicción (Lopez-Rocha et al. 2013).

Los casos de TBP ocurrieron en pacientes de todo el estado sometidos a vigilancia epidemiológica pasiva, mayores de 15 años, con tos productiva de dos o más semanas de evolución y baciloscopía positiva. Todos los pacientes fueron incluidos en el esquema de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) por personal especializado de la Secretaría de Salud del estado. Los contactos fueron investigados por brigadas dedicadas del Programa Estatal de la Tuberculosis. El Comité de Ética e Investigación de los Servicios de Salud aprobó el estudio.

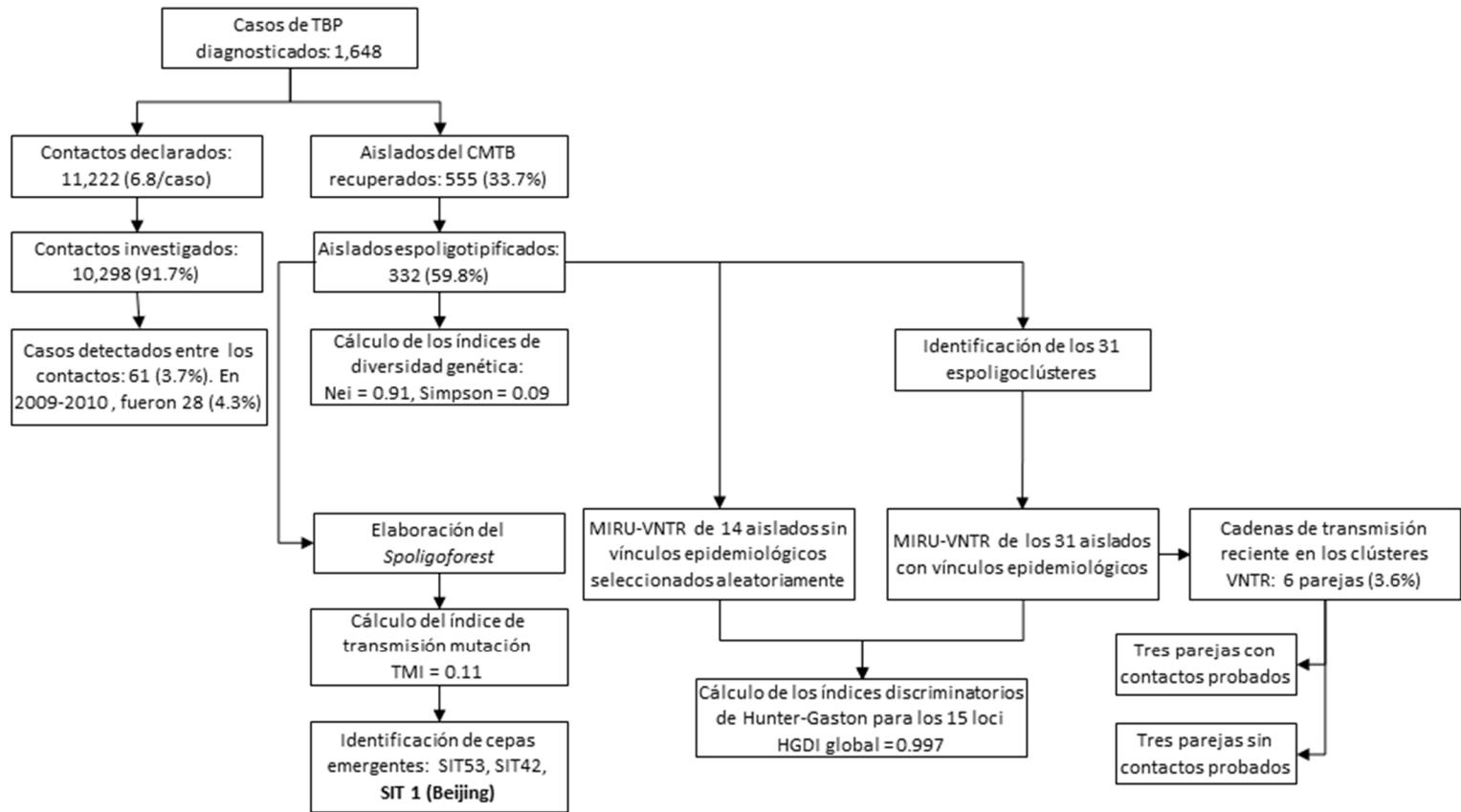


Figura 1. Etapas del estudio

Tabla 1. Distribución anual de casos de TBP activa, contactos y casos detectados y de aislados del CMTB recuperados y espigotipificados

Año	Casos oficiales ^a	Contactos y casos detectados entre ellos					Especímenes cultivados ^b	Aislados del CMTB				
		Contactos declarados (D)	Contactos investigados (I)	I/D (%)	Casos detectados			Recuperados		Espigotipificados		
					N	%		n	n/casos (%)	n	n/aislados (%)	n/casos (%)
2006	317	2071	1750	84.5	11	3.5	992	126	39.7	33	26.2	10.4
2007	292	2093	1929	92.2	11	3.8	1101	145	49.7	70	48.3	24.0
2008	318	2326	2097	90.2	10	3.1	1055	119	37.4	92	77.3	28.9
2009 ^c	348	2152	2023	94.0	22	6.3	699	51	14.7	46	90.2	13.2
2010	294	1968	1892	96.1	6	2.0	1131	67	22.8	61	91.0	20.7
2011 ^d	79	612	597	97.5	1	1.3	488	47	59.5	30	63.8	38.0
Total/ Promedio	1648	11222	10288	91.7	61	3.7	5466	555	33.7	332	59.8	20.1

^a Boletín de Epidemiología (2006-2011).

^b En la Sección de Micobacterias del LESP.

^c Sólo se incluyen los resultados de cultivos realizados de enero a marzo y de octubre a diciembre pues en 2009 se suspendieron los cultivos de abril a septiembre.

^d Sólo se incluyen los resultados de cultivos realizados de enero a abril de 2011.

Tabla 2. Aislados del CMTB por jurisdicción sanitaria

Jurisdicción	No. de aislados (%)
I	53(16.0)
II	10 (3.0)
III	6 (1.8)
IV	50 (15.1)
V	68 (20.5)
VI	145 (43.7)
Total	332 (100.0)

Cultivo del esputo

Muestras de esputo descontaminadas fueron cultivadas simultáneamente en medio Lowenstein-Jensen con métodos estándar y en el Sistema VersaTREK Myco System (TREK Diagnostics Systems, Cleveland, OH). Los cultivos positivos fueron identificados como miembros del CMTB mediante la prueba molecular Cobas Amplicor *M. tuberculosis* (Roche Diagnostics, Grenzach-Whylen, Germany). Los aislados fueron crio-preservados a -70°C en Medio Middlebrook 7H9 (TREK Diagnostics Systems, Cleveland, OH), recuperados por reinoculación en el mismo medio y propagados en medio Lowenstein-Jensen.

Espoligotipificación y asignación de genotipos

De los 555 aislados recuperados en el Laboratorio Estatal de Salud Pública, fueron muestreados por conveniencia los 332 (59.8%) recuperados por resiembra. El ADN fue extraído con el método CTAB (Honore-Bouakline et al. 2003). La espoligotipificación fue realizada con el kit Isogen según las instrucciones del fabricante (Life Science, Maarssen, Netherlands); el kit incluye una membrana de nitrocelulosa con 43 sondas inmovilizadas de secuencias espaciadoras de la región de repetidos directos (DR) del genoma de las micobacterias del CMTB. La espoligotipificación se hizo con el método de Kamerbeek et al. (1997). El ADN de tres cepas de referencia —*M. tuberculosis* H37Rv, CDC 1551 y *M. bovis* BCG— fue utilizado como control. La hibridación de los productos de PCR fue detectada con el kit Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham International plc, Buckinghamshire, United Kingdom). Los espoligotipos fueron identificados con la aplicación en línea MIRU-VNTR $plus$ (Weniger et al. 2010). Los linajes del CMTB fueron asignados después de identificar las mejores coincidencias entre los genotipos de la base de datos de referencia de dicha aplicación con un coeficiente categórico de 1.7. Identificaciones adicionales fueron basadas en el dendrograma de patrones de espoligotipos generado con el método de un-weighted pair group con el algoritmo neighborjoining. Los patrones VNTR también fueron comparados con los de la base de datos SITVIT2 (Institut Pasteur de Guadeloupe, <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDEMO>) (Brudey et al. 2006b) y la base de datos de Mbovis.org (Veterinary Laboratories Agency,

<http://www.mbovis.org/index.php>). Los linajes del CMTB fueron denominados además según la clasificación de Gagneux (Comas et al. 2009).

Cuantificación de la diversidad genética

La diversidad genética fue cuantificada de dos maneras. La primera fue el índice de Nei, medida de biodiversidad ampliamente usada en estudios poblacionales de micobacterias, que es calculado con la fórmula:

$$H = \frac{2n(1 - \sum_{i=1}^g p_i^2)}{2n - 1}$$

donde n es el número de aislados y p es la proporción de cada espoligotipo, g (Nei 1978).

La segunda fue el índice de diversidad de Simpson, empleado en genética de poblaciones para estudiar patrones globales de variación, que indica la probabilidad de que dos aislados tomados al azar pertenezcan al mismo tipo (Simpson 1949), calculado con la fórmula:

$$S = \sum_{i=1}^g \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

donde g es cada espoligotipo y n es el número de aislados.

Índice de transmisión-mutación y detección de cepas emergentes

Para calcular el índice de transmisión-mutación (TMI), que integra la heterogeneidad de los espoligotipos con su ritmo de mutación, usamos la ecuación de Tanaka y Francis (2005):

$$TMI = \mu \frac{n - g + v_1}{v_1}$$

donde μ es una estimación independiente del ritmo de mutación del patrón de espaciadores, n es el número de aislados, g es el número de genotipos encontrados y v_1 es el número de eventos de mutación simple inferidos del análisis de la representación gráfica (*spoligoforest*) de los clústeres de aislados con espoligotipos idénticos.

El conjunto de espoligotipos fue evaluado con el programa *Spoligoforest* (<http://www.emi.unsw.edu.au/~tanakalab/spolTools/>), que generó el gráfico *spoligoforest* (Fig. 2) constituido por nodos circulares que representan clústeres de *g* espoligotipos cuya área es proporcional al número de aislados con el mismo patrón.

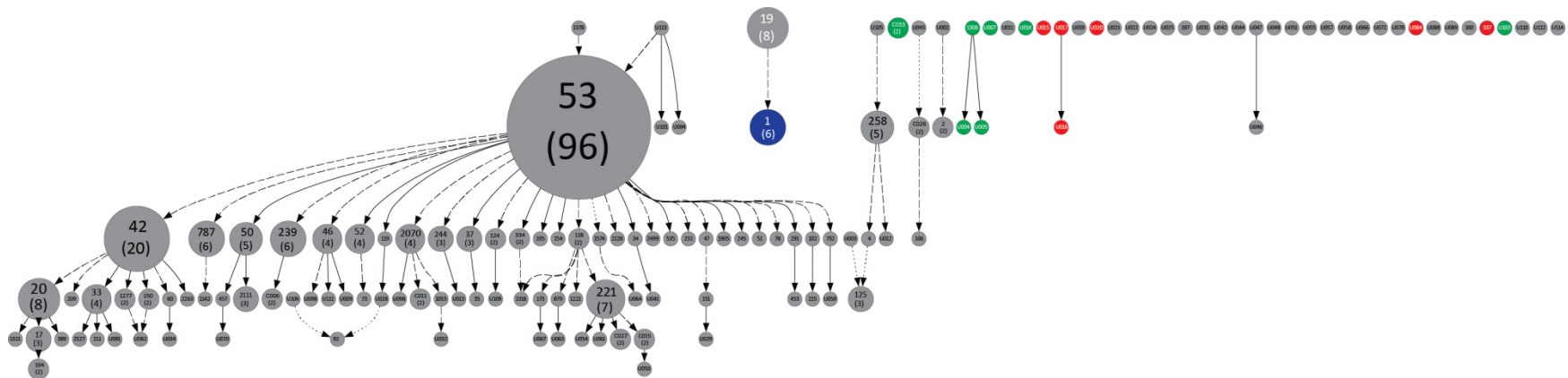


Figura 2. Spoligoforest de los aislados del CMTB

Los nodos circulares, identificados con el genotipo SIT correspondiente, representan clústeres de aislados con espoligotipos idénticos cuya área es proporcional al número de aislados que los conforman (indicado entre paréntesis). Los genotipos no registrados en SpolDB4 tienen el número de identificación usado en nuestro laboratorio. Los genotipos probablemente relacionados por un evento de mutación simple están conectados con flechas que indican descendencia. La probabilidad de descendencia ponderada como 1 es indicada por conexiones con líneas sólidas; la ponderada como ≥ 0.5 con líneas entrecortadas y la ponderada como < 0.5 con líneas puntea.

Los pares de espoligotipos posiblemente relacionados por un evento de mutación simple (delección simple en el caso de los espoligotipos) se conectan mediante líneas. En la representación gráfica, v_1 equivale al número de genotipos conectados menos uno (Reyes et al. 2008).

Las cepas emergentes son aquellas cuya velocidad de propagación es significativamente más rápida que el ritmo de transmisión basal. Para identificarlas usamos la prueba de Storey mediante la aplicación en línea DESTUS (<http://www.emi.unsw.edu.au/~tanakalab/spolTools/>) (Tanaka and Francis 2006) con un valor de corte $q = 0.001$ (i.e., tolerancia de falsos positivos del 0.1%).

Selección de espoligoclústeres potencialmente involucrados en cadenas de transmisión

Se entiende que la transmisión reciente está delimitada en tiempo y lugar y ocurre en la misma comunidad dentro de los dos años previos a la presentación de síntomas. Para realizar la tipificación VNTR seleccionamos los aislados de espoligoclústeres con vínculos geográficos, es decir, de enfermos que vivían en la misma localidad. Excluimos los aislados con espoligotipos únicos y, por su importancia epidemiológica, también tipificamos todos los aislados del clúster de la familia Beijing. También seleccionamos aleatoriamente 14 aislados entre los espoligotipos de casos sin vinculación geográfica ni epidemiológica.

Genotipificación VNTR

Realizamos la genotipificación MIRU-VNTR como ya se ha descrito (Cowan et al. 2002; Supply et al. 2006), amplificando los siguientes 15 loci: 424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2165, 2401, 2163b, 2996, 3192, 3690, 4052, 4156 y empleando ADN de *M. tuberculosis* H37Rv como control.

Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa (Invitrogen) al 2% con buffer de borato de sodio (Brody and Kern 2004) en una cámara de electroforesis Sub Cell (BioRad, Hercules, California, USA) y teñidos con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El número de copias repetidas en tándem de cada MIRU fue determinado por el tamaño del amplicón calculado con el software QuantityOne. El genotipo VNTR fue expresado como una cadena de dígitos

correspondiente al número de copias del repetido en tándem de cada locus ensayado. Para efectos de ilustración, la Fig. 3 muestra un electroferograma típico con el cual se cuantificaron las copias del locus ETRC en un lote de aislados CMTB

El índice discriminatorio de Hunter-Gaston de cada locus MIRU-VNTR y del conjunto de los 15 loci fue calculado con la fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^g n_j(n_j - 1)$$

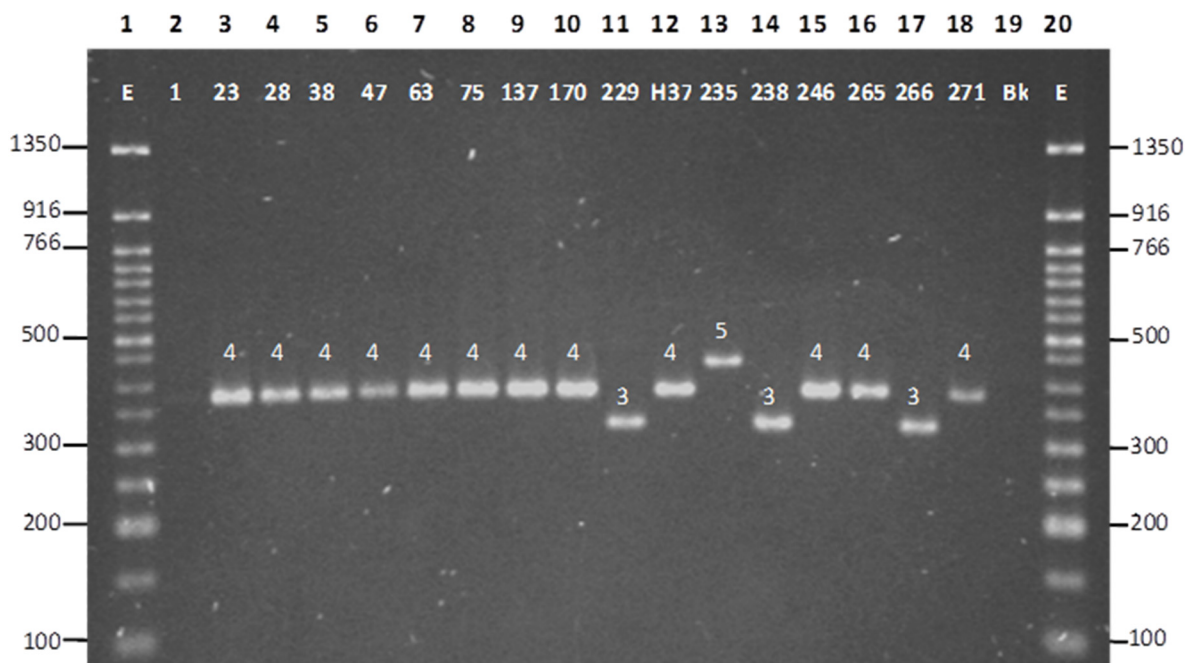


Figura 3. Electroferograma típico para cuantificar las copias del locus MIRU-ETR en 16 aislados del CMTB

La numeración consecutiva de los carriles corresponde a los números de la fila superior que están colocados encima de la imagen del gel. Los caracteres blancos de la segunda fila (parte superior del gel) identifican las muestras de las mezclas de PCR aplicadas en cada carril. Carriles 1 y 20, E (escala de 50 pb). Carriles 2-11 y 13-18, claves de los aislados del CMTB incluidos. Carril 12, H37 (control positivo; *M. tuberculosis* H37Rv). Carril 19, Bk, control negativo (mezcla sin DNA).

donde N es el número total de aislados en la muestra, g es el número de tipos VNTR (i.e., número de copias de los repetidos en tándem) y n_j es el número de aislados pertenecientes al j ésimo genotipo.

Resultados

Etapas del estudio

Como muestra la Fig. 1, el Programa Estatal de Tuberculosis confirmó 1,648 casos de TBP e investigó 6.8 contactos por cada caso diagnosticado en el periodo estudiado. Se detectaron 61 casos de TBP entre los contactos investigados. De los 5,466 especímenes cultivados se recuperaron 555 aislados (33.7% del total de casos diagnosticados). De ellos espoligotificamos 332 aislados (59.8%). Con los diferentes patrones de espaciadores de repetidos directos calculamos los índices de diversidad genética e identificamos los espoligoclústeres para elaborar el spoligoforest (Fig.2), calcular el TMI y realizar la prueba de Storey.

Identificamos siete espoligoclústeres conformados por los 31 aislados que tuvieron vinculación epidemiológica y geográfica. Mediante el análisis de dichos aislados por tipificación MIRU-VNTR identificamos las cadenas de transmisión reciente. Calculamos el índice discriminatorio de Hunter-Gaston sumando los genotipos MIRU-VNTR en un total de 45 aislados: los 31 de los espoligoclústeres y los de 14 casos no agrupados en espoligoclústeres tomados aleatoriamente.

Diversidad genética del CMTB y espoligoclústeres

Para estimar la diversidad genética e identificar los aislados potencialmente implicados en cadenas de transmisión, espoligotificamos 105 aislados adicionales a los 227 incluidos en nuestro trabajo previo (Lopez-Rocha et al. 2013), que totalizan 332 aislados (Tabla 2). Tuvieron espoligotipos de *M. tuberculosis* 324 aislados (97.6%) y de *M. bovis* ocho aislados (2.4%) (Tabla 3). Entre los 140 espoligotipos identificados, 70 están registrados en la base de datos SpolDB4 (SITVIT); uno de *M. bovis* (U0006) registrado en la base Mbovis.org y otros tres de *M. bovis* (U0004, U0005 y U0007) registrados en la base de Mbovis.org pero no en SpolDB4. En total 73 genotipos (52.1%) están registrados en una de las dos bases de datos mencionadas.

El 67.5% (224/332) de los aislados se agrupó en 32 espilogoclústeres. Los dos espilogoclústeres principales fueron del genotipo SIT53 (96 aislados, 28.9%) y SIT42 (20 aislados, 6.0%) (Tabla 3).

Entre los 324 aislados de *M. tuberculosis* predominó el Linaje 4 (Euro-Americano) con 304 aislados (93.8%) seguido del Linaje 1 (Indo-Oceánico) con 14 aislados de la familia Manila (4.3%) y el Linaje 2 (Asiático Oriental) con seis aislados de la familia Beijing (1.9%) (Tabla 4).

Los índices de diversidad genética calculados a partir de los espilogotipos fueron Nei, $H = 0.91$, y Simpson, $S = 0.09$.

Espilogoclústeres

Para seleccionar los aislados potencialmente implicados en cadenas de transmisión reciente identificamos primero los siete espilogoclústeres relacionados geográficamente, conformados por 31 aislados (Tabla 5).

A continuación describimos los espilogotipos identificados. El espilogoclúster Beijing, formado por seis aislados del genotipo SIT1 de casos sin relación epidemiológica probada. Tres espilogoclústeres formados por sendas parejas de aislados de los genotipos SIT46, SIT258 y un tipo huérfano, de casos con relación epidemiológica probada. Tres espilogoclústeres con 19 aislados de casos sin relación probada: uno con 14 aislados del genotipo SIT53, otro con tres aislados del genotipo SIT19 y el tercero con dos aislados del genotipo SIT221.

Los aislados de los espilogoclústeres constituyeron el 9.3% de la muestra —valor cercano al 11% del TMI— y se distribuyeron casi equitativamente en las tres regiones de incidencia del estado: 12 en la de región de baja incidencia, 10 en la de incidencia intermedia y nueve en la de alta incidencia (Tabla 5).

Índice de transmisión-mutación

La Tabla 6 describe las variables empleadas para calcular el TMI, y la Fig. 2 muestra el spologoforest con el cual calculamos el número de eventos de mutación (μ_1). El valor del TMI = 0.11, que integra la heterogeneidad de los patrones de los espilogotipos con su ritmo de mutación, indica que la transmisión reciente contribuye escasamente a la epidemiología de la TBP y es consistente con la

diversidad genética de los aislados del CMTB como con el pequeño tamaño promedio de los clústeres ($n = 2.4$).

Tabla 4. Especies, linajes y familias del CMTB identificados por espoligotipificación

Especie	Linaje	Familia	n (%)
<i>M. tuberculosis</i>	4 (Euro-Americano)	Ghana	140 (42.2)
		LAM	64 (19.3)
		Uganda I & II	43 (13.0)
		Haarlem	30 (9.0)
		X	18 (5.4)
		S	8 (2.4)
		Cameroon	1 (0.3)
	1 (Indo-Oceánico)	EAI	14 (4.2)
2 (Asiático-Oriental)	Beijing	6 (1.8)	
<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	Bovis	8 (2.4)
Total			332 (100.0)

Tabla 5. Casos de TBP de los 31 aislados del CMTB agrupados en siete espilogoclústeres potencialmente implicados en cadenas de transmisión

Espilogoclúster			Paciente			Datos relevantes de los casos								
No.	SIT	Linaje (Gagneux)	ID	Edad	Sexo	Escolaridad	Ocupación	Enfermedad concomitante	Localidad	Municipio	Región de incidencia	Ámbito	Grado de marginación.	Contacto ^a
1	1	2	75	43	M	Bachillerato	Jornalero	Ninguna	Soledad de Graciano Sánchez	Soledad de Graciano Sánchez	Baja	Urbano	Muy bajo	No
			137	21	F	Primaria incompleta	Ama de casa	Ninguna	Soledad de Graciano Sánchez	Soledad de Graciano Sánchez	Baja	Urbano	Muy bajo	
			246	75	F	Primaria incompleta	Jornalero	Ninguna	Guaxcuaco	Tamazunchale	Alta	Rural	Alto	No
			271	67	M	Primaria incompleta	Jubilado	Alcoholismo	Huazalingo	Tamazunchale	Alta	Rural	Alto	
			265	27	M	--	--	--	La Hincada	Ciudad Valles	Intermedia	Rural	Bajo	
2	19	1	401	69	F	Primaria completa	Ama de casa	Diabetes	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	No
			23	49	M	Primaria incompleta	Comerciante	Ninguna	Ixtla	Tamazunchale	Alta	Rural	Alto	
			170	59	M	Ninguna	Jornalero	Desnutrición	Zopilopa	Tamazunchale	Alta	Rural	Alto	
			218	45	M	--	--	--	Tamazunchale	Tamazunchale	Alta	Urbano	Alto	
3	46	4	238	17	M	Ninguna	Desempleado	Ninguna	Mos	Xilitla	Alta	Rural	Alto	Sí
			266	36	F	Ninguna	Desempleada	Ninguna	Mos	Xilitla	Alta	Rural	Alto	
			33	74	M	Ninguna	Desempleado	Insuficiencia cardíaca	Matehuala	Matehuala	Baja	Urbano	Muy bajo	
4	53	4	87	46	M	Primaria incompleta	Desempleado	Diabetes	Matehuala	Matehuala	Baja	Urbano	Muy bajo	No
			34	65	M	Ninguna	Jornalero	Ninguna	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	
			76	45	M	Primaria completa	Desempleado	Diabetes	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	
			135	72	M	Primaria incompleta	Cantero	Ninguna	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	
			172	29	M	Primaria completa	Desempleado	Ninguna	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	
			212	24	M	--	--	--	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	
			210	63	F	Ninguna	Ama de casa	Ninguna	Rioverde	Rioverde	Intermedia	Urbano	Medio	
			35	59	F	Ninguna	Ama de casa	Ninguna	Rioverde	Rioverde	Intermedia	Urbano	Medio	
			79	31	M	Primaria incompleta	Albañil	Desnutrición	Rioverde	Rioverde	Intermedia	Urbano	Medio	
			204	19	F	--	Ama de casa	Ninguna	Rioverde	Rioverde	Intermedia	Urbano	Medio	
			97	54	M	Secundaria incompleta	Recluso	Ninguna	Ciudad Valles	Ciudad Valles	Intermedia	Urbano	Bajo	
			113	67	M	Secundaria incompleta	Desempleado	Ninguna	Ciudad Valles	Ciudad Valles	Intermedia	Urbano	Bajo	
			203	55	F	Secundaria incompleta	Ama de casa	Ninguna	Ciudad Valles	Ciudad Valles	Intermedia	Urbano	Bajo	
			5	258	4	28	50	M	Superior	Desempleado	Alcoholismo	Tamazunchale	Tamazunchale	
29	38	M				Primaria completa	Bolero	Alcoholismo	Tamazunchale	Tamazunchale	Alta	Urbano	Alto	
6	Huérfano	4	38	26	M	Inicio secundaria	Jornalero	Diabetes	Calzada de San Rafael	Ciudad del Maíz	Intermedio	Rural	Alto	Sí
			63	53	F	Ninguna	Ama de casa	Ninguna	Calzada de San Rafael	Ciudad del Maíz	Intermedio	Rural	Alto	
7	221	4	425	76	M	Ninguna	Jornalero	Desnutrición	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	No
			430	60	M	Ninguna	Albañil	Diabetes y alcoholismo	San Luis Potosí City	San Luis Potosí	Baja	Urbano	Muy bajo	

^a Los contactos fueron investigado en primera instancia interrogando a los enfermos

Tabla 6. Variables del *spoligoforest* empleadas para calcular el índice de transmisión-mutación (TMI)

Variable	Símbolo	Valor
Número de aislados	n	332
Número de espoligotipos	g	140
Espoligoclústeres	c	32
Número de aislados en clústeres	n_c	224
Tamaño promedio de los clústeres	n/g	2.4
Número de genotipos únicos (<i>singletons</i>)	u	108
Número de eventos de mutación de un paso	u_1	102 – 1
Estimación de la tasa de mutación del espoligotipo	μ	0.039
	TMI	0.11

Genotipos VNTR y cadenas de transmisión reciente

Entre los aislados de los espoligoclústeres resolvimos 25 genotipos VNTR. Los aislados del Linaje 4 se ubicaron en ramas diferentes a la del Linaje 1 (familia Manila) y del Linaje 2, (familia Beijing), como muestra el dendrograma polifásico (Fig. 4). Por otra parte, 14 aislados del clúster SIT53 (familia Ghana) tuvieron genotipos VNTR separados en tres ramas, lo cual confirma que las cepas de esta familia no pueden distinguirse mediante espoligotipificación.

De esta manera identificamos seis clústeres VNTR que representan sendas cadenas de transmisión reciente (Tabla 7). Los contactos de los casos han sido comprobados en las tres cadenas formadas por parejas de aislados con genotipos VNTR idénticos, pero no en las restantes, formadas por parejas de aislados que difieren sólo en una copia de un locus.

Las parejas de cepas del CMTB con genotipos idénticos de las tres cadenas de transmisión de enfermos con relación epidemiológica probada son: 1) las cepas 28 y 29 con genotipo SIT258, familia Uganda del Linaje 4, aisladas de dos hermanos que habitan el mismo domicilio en Tamazunchale; 2) las cepas 38 y 63, familia Uganda del Linaje 4 con genotipo no registrado en SpolDB4, aisladas de dos pacientes que habitan el mismo domicilio en una comunidad de Ciudad del Maíz; y 3) las cepas 238 y 266, familia Haarlem del Linaje 4 con genotipo SIT46 e idéntico patrón de farmacorresistencia, aisladas de una madre y su hijo residentes de Xilitla.

Las parejas de aislados del CMTB de las tres cadenas sin relación epidemiológica probada son: 1) las cepas 425 y 430, familia X del Linaje 4 con genotipo SIT 221, que difieren en una copia en el locus 2996, aisladas en la ciudad de San Luis Potosí; 2) las cepas 75 y 137, familia Beijing del Linaje 2 que difieren sólo en una copia del locus 2163b, aisladas en Soledad de Graciano Sánchez; y 3) las cepas 246 y 271 también de la familia Beijing, que difieren sólo en una copia del locus 2996, aisladas en Tamazunchale.

La Tabla 8 muestra los genotipos VNTR de los 14 aislados con diferentes genotipos tomados aleatoriamente en la muestra estudiada. Entre ellos hay dos

espoligoclústeres, SIT 20 (n = 2) y SIT 53 (n = 5), sin vínculos de lugar o tiempo. No encontramos clústeres VNTR en esta muestra.

La Tabla 9 muestra los índices discriminatorios de los 15 loci MIRU-VNTR analizados. El índice discriminatorio del conjunto de los loci es 0.997. Los loci con mayor diversidad alélica y por tanto más discriminatorios ($D \geq 0.7$) son, en orden descendente: 2163 (QUB11b), 802 (MIRU40), 4052 (QUB26), 1955 (Mtub21) y 3690 (Mtub31). Los menos discriminatorios ($D \leq 0.6$) son, también en orden descendente: 2401 (Mtub30), 577 (ETRC), 580 (MIRU04) y 1644 (MIRU16).

Cepas emergentes

La prueba de Storey, empleada para detectar las cepas emergentes entre los espoligoclústeres y contrastarla con la tipificación VNTR, identificó dos cepas emergentes: SIT53 ($p = 1.05 \times 10^{-30}$) y SIT42 ($p = 1.76 \times 10^{-4}$).

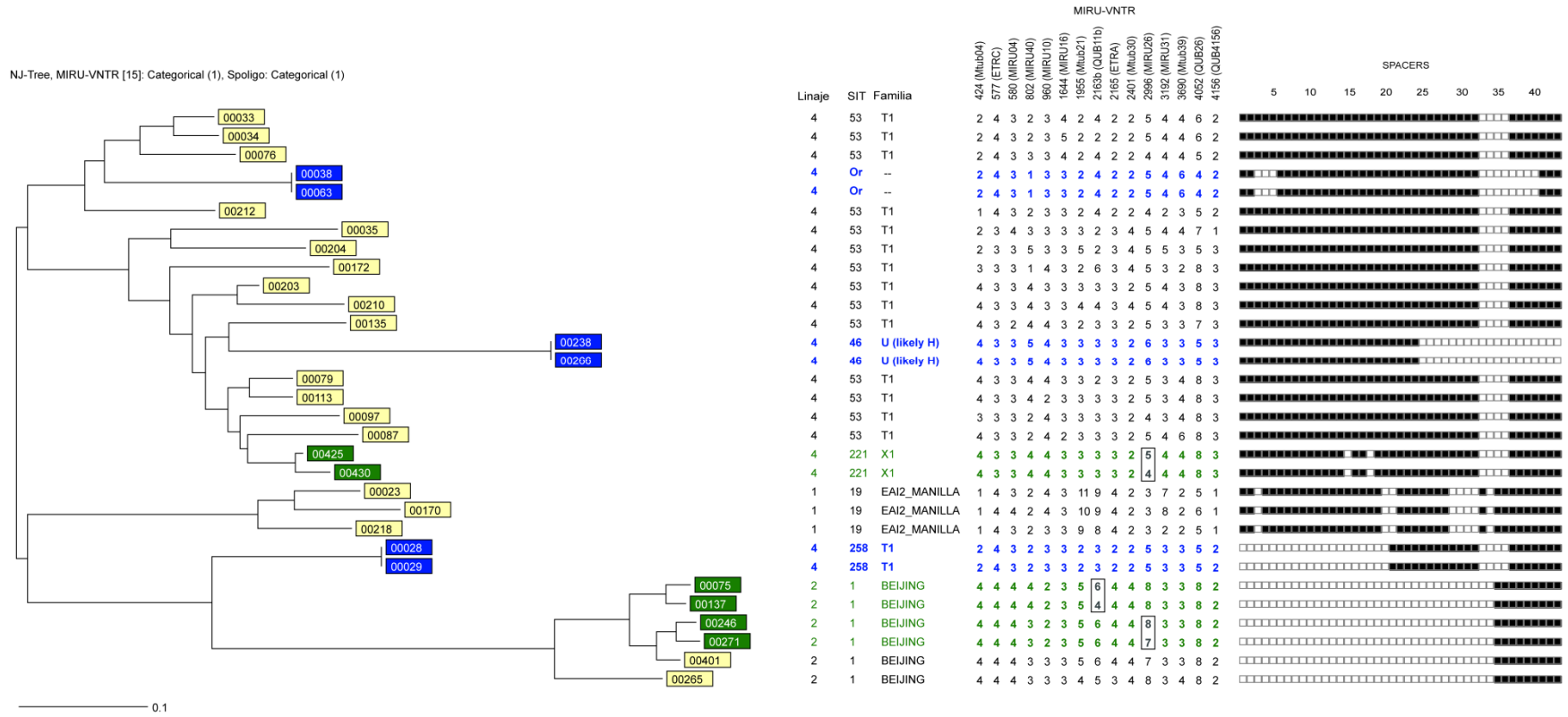


Figura 4. Dendrograma polifásico derivado de los espoligotipos y los códigos VNTR de los aislados del CMTB que forman espoligoclústeres

En el lado izquierdo de la figura se encuentra el dendrograma VNTR de las 31 cepas analizadas (identificadas en cada rectángulo con la clave asignada a cada aislado en el laboratorio; en azul se indican las parejas de aislados con patrones VNTR idénticos y en verde los aislados con patrones casi idénticos. Las cuatro columnas colocadas a la derecha del dendrograma muestran sucesivamente 1) el Linaje según Gagneux, 2) clave del espoligotipo (Spoligo-International-Type, SIT), 3) la familia del espoligotipo, 4) el código VNTR y 5) el patrón de espaciadores de los repetidos directos. Las parejas de aislados con genotipos VNTR idénticos o casi idénticos que constituyen las cadenas de transmisión reciente se detallan en la Tabla 7

Tabla 7. Las seis cadenas de transmisión reciente identificadas por genotipificación MIRU-VNTR

Cadena	Datos de los casos				Espoligoclúster		Códigos VNTR (número de copias en tándem de los 15 loci)														
	ID	Fecha del diagnóstico	Edad (años)	Relación entre los enfermos	Familia	SIT	424	577	580	802	960	1644	1955	2163B	2165	2401	2996	3192	3690	4052	4156
A	28	20/05/2008	50	Hermanos convivientes	C04-uganda	258	2	4	3	2	3	3	2	3	2	2	5	3	3	5	2
	29	21/05/2008	38				2	4	3	2	3	3	2	3	2	2	5	3	3	5	2
B	63	06/12/2006	53	Contactos	C06-uganda	--	2	4	3	1	3	3	2	4	2	2	5	4	6	4	2
	38	29/08/2008	26				2	4	3	1	3	3	2	4	2	2	5	4	6	4	2
C	238 ^a	05/01/2006	17	Hijo y madre convivientes	C30-u	46	4	3	3	5	4	3	3	3	3	2	6	3	3	5	3
	266 ^a	20/06/2005	36				4	3	3	5	4	3	3	3	3	2	6	3	3	5	3
D	425	30/06/2008	76	No documentado	C16-x	221	4	3	3	4	4	3	3	3	2	5	4	4	8	3	
	430	12/08/2008	60				4	3	3	4	4	3	3	3	2	4	4	4	8	3	
E	137	12/11/2007	21	No documentado	C01-beijing	1	4	4	4	4	2	3	5	4	4	8	3	3	8	2	
	75	08/09/2008	43				4	4	4	4	2	3	5	6	4	4	8	3	3	8	2
F	246	20/05/2010	75	No documentado	C01-beijing	1	4	4	4	3	2	3	5	6	4	4	8	3	3	8	2
	271	19/11/2010	67				4	4	4	3	2	3	5	6	4	4	7	3	3	8	2

^a Cepas MDR.

Tabla 8. Genotipos de los 14 aislados sin relación geográfica seleccionados aleatoriamente

ID	SIT	Fecha de diagnóstico	Localidad	Municipio	Espoligotipo	Código VNTR
211	17	13/12/2009	San Francisco	Rioverde	1101111111110111111100001111111100001111111	343141342273242
47	19	19/10/2009	Ciudad Valles	Ciudad Valles	11011111111111111111001111111000010111111111	144243984238251
205	20	08/05/2007	Mexquitic de Carmona	Mexquitic de Carmona	11011111111111111111100001111111100001111111	432122322161262
208	20	21/01/2010	Ahuehuevo Primero Centro	Matlapa	11011111111111111111100001111111100001111111	442122342161272
229	46	14/07/2006	Suchiaco	Coxcatlán	11111111111111111111111100000000000000000000	433543223434343
215	50	25/01/2010	San Luis Potosí	San Luis Potosí	1111111111111111111111111111111110100001111111	233233353553363
198	53	10/07/2007	Rancho el Pescadito	Coxcatlán	11111111111111111111111111111111100001111111	244244232252362
200	53	12/01/2007	El Cedral	Tampacán	11111111111111111111111111111111100001111111	244344252353552
206	53	09/05/2007	San Pedro de las Anonas	Aquismón	11111111111111111111111111111111100001111111	43343333254353
209	53	22/12/2009	El Fuerte	Santa María del Río	11111111111111111111111111111111100001111111	43343332254549
213	53	15/01/2010	Xilitla	Xilitla	11111111111111111111111111111111100001111111	431311463463383
194	239	23/04/2007	Ciudad Valles	Ciudad Valles	11111111111111111111111111111111100000000111	243133242253542
60	787	03/10/2006	Tamazunchale	Tamazunchale	11111111111111111111111111111111100000001111	253344222354452
201	---	20/11/2007	Ebano	Ébano	1111111100011111111100001000000000001111111	443343342353132

Tabla 9. Índices discriminatorios de Hunter-Gaston (HGDI) de los loci MIRU-VNTR^a

Locus	HGDI
2163b (QUB11b)	0.811
802 (MIRU40)	0.793
4052 (QUB26)	0.767
1955 (Mtub21)	0.737
3690 (Mtub31)	0.737
2996 (MIRU26)	0.686
3192 (MIRU31)	0.677
2165 (ETRA)	0.654
960 (MIRU10)	0.652
424 (Mtub04)	0.639
4156 (QUB4156)	0.619
2401 (Mtub30)	0.575
577 (ETRC)	0.529
580 (MIRU04)	0.502
1644 (MIRU16)	0.419
General	0.997

^a Calculado con los 45 aislados tipificados por MIRU-VNTR (31 con y 14 sin vínculos epidemiológicos).

Discusión

Este estudio combina por primera vez la epidemiología clásica con la genotipificación mediante espoligotipos y patrones VNTR para identificar las cadenas de transmisión reciente de la TBP en el estado de San Luis Potosí.

La espoligotipificación de los aislados de 332 casos de TBP confirmó que las dos especies del CMTB causantes de TBP en el estado de San Luis Potosí son *M. tuberculosis* y en menor grado *M. bovis*, y confirman y amplían nuestros hallazgos sobre la diversidad genética del CMTB (Lopez-Rocha et al. 2013). Los bajos valores del TMI y del número de clústeres VNTR confirman la escasa contribución de la transmisión reciente e indican por tanto que la reactivación endógena es el factor principal que contribuye a la epidemiología de la TBP. Detectamos además tres cadenas de transmisión entre parejas de casos con relación epidemiológica probada y otras tres entre parejas de casos sin relación probada. Como dos de estas últimas cadenas son de la cepa Beijing, parece que esta familia está emergiendo en San Luis Potosí.

En cuanto a la diversidad genética, los resultados generales son similares a los de nuestro estudio previo (Lopez-Rocha et al. 2013), excepto por un aumento en la proporción de los aislados Beijing y Manila, así como en el número de aislados agrupados en clústeres y en el de los espoligoclústeres. El linaje predominante de *M. tuberculosis* es el Linaje 4, cuyos genotipos SIT53, SIT42 y SIT20 son comunes y ubicuos. Una proporción menor es representada por la familia Manila (SIT19) del Linaje 1 y la familia Beijing (SIT1) del Linaje 2, aunque la última es de mayor relevancia epidemiológica.

La gran diversidad genética del CMTB, ya demostrada cualitativamente (Lopez-Rocha et al. 2013), ahora fue determinada cuantitativamente con los índices de Nei y de Simpson, calculados a partir del conjunto de espoligotipos. Del análisis del *spoligoforest* obtuvimos el valor del TMI que confirma una baja transmisión reciente, consistente con la alta diversidad genética observada.

La selección de los casos de TBP por criterios epidemiológicos y geográficos identificó siete espoligoclústeres, con 31 aislados potencialmente

implicados en cadenas de transmisión que luego tipificamos por MIRU-VNTR que, como esperábamos, tuvo mayor resolución y un alto índice discriminatorio.

La genotipificación VNTR identificó 19 *singletons* y seis clústeres formados por sendas parejas de aislados. De estos seis clústeres, tres están formados por parejas con genotipos VNTR idénticos y vínculos epidemiológicos comprobados; los otros tres están formados por parejas con genotipos casi idénticos (con una variación en una copia de un solo locus) sin vínculos epidemiológicos probados. No encontramos clústeres VNTR entre los 14 aislados sin vínculos epidemiológicos seleccionados aleatoriamente, lo cual indica que la transmisión reciente es improbable entre pacientes de diferentes localidades y apoya el uso de espilogoclústeres relacionados geográficamente para la búsqueda de cadenas de transmisión reciente por la tipificación VNTR entre ellos.

Que las parejas con genotipos casi idénticos efectivamente constituyen cadenas de transmisión reciente se apoya en el estudio de (Savine et al. 2002) que demostró un evento de mutación aleatoria en un locus de la micobacteria que infectó al mismo paciente crónico analizado en el curso de varios meses y, por otro lado, el antecedente de que los patrones VNTR de aislados de casos con vínculos epidemiológicos evidentes varían en un locus (van Deutekom et al. 2005).

Los 12 aislados implicados en las seis cadenas de transmisión representan el 3.6% de los aislados incluidos en el estudio, i.e., casi un tercio del valor del TMI. Esta diferencia cuantitativa respecto al TMI depende del menor tamaño de la muestra tipificada por MIRU-VNTR y del mayor poder de resolución de la genotipificación VNTR respecto a la espilogotipificación (Allix-Beguec et al. 2008a).

La baja transmisión reciente en el estado de San Luis Potosí es sustentada por otros hallazgos. El diagnóstico tardío de los casos de TBP, evidenciado por la alta proporción de baciloscopías positivas y la edad avanzada de los pacientes (mediana = 50 años) apoya la noción de que la reactivación endógena contribuye a la epidemiología de la TBP mucho más que la transmisión reciente (Lopez-Rocha et al. 2013). En el periodo 2009-2010 el Programa Estatal de Vigilancia Epidemiológica investigó el 95% de los contactos declarados por los casos índice

(Tabla 1). Entre los contactos fueron diagnosticados 28 enfermos adicionales, lo cual sugiere que si cada caso índice tuviese un contacto, a lo sumo el 8.7% de los casos estaría implicado en cadenas de transmisión en el periodo. Aunque esta cifra de transmisión reciente puede ser sobreestimada porque no todos los grupos de contactos comparten la misma cepa, está entre el 3.6% determinado por VNTR y el 11% predicho por el TMI.

Estimar la transmisión reciente por análisis gráfico de los espoligoclústeres tiene la limitación de que los espoligotipos tienden a la convergencia por homoplasia (i.e., adquisición del mismo genotipo por eventos independientes), de manera que dos aislados aparentemente vinculados por un evento de mutación simple pueden resultar de eventos independientes (Reyes et al. 2012). Esta propiedad de los espoligotipos puede sobreestimar la transmisión reciente aunque es una aproximación que puede ser contextualizada con otras evidencias.

La estimación de la transmisión reciente por genotipificación (cualquiera que sea el marcador) tiene un sesgo sistemático que subestima el tamaño de los clústeres y por ende la transmisión reciente, pues en estudios poblacionales los aislados tipificados no representan una muestra aleatoria de todos los casos de una comunidad dada y están limitados a una ventana temporal restringida (Glynn et al. 1999).

Los casos de TBP incluidos en este estudio proceden del programa de vigilancia epidemiológica del estado, representan al menos tres cuartas partes del total de los casos, e incluyen una proporción mínima de los de otras instituciones de atención a la salud con programas de vigilancia epidemiológica propios, entre las cuales predomina el Instituto Mexicano del Seguro Social (General Direction of Health Information 2013)

El 84% de todos los casos de TB multidrogoresistentes (MDR) en clústeres detectados en Europa son de la familia Beijing, que está emergiendo en varias regiones del mundo (Europa del Este, África de Sur y los países de la ex Unión Soviética), es la cepa endémica predominante en otras regiones y en gran parte de Asia (European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis 2006). Las dos

cadena de transmisión con parejas de la familia Beijing (la E, diagnosticada el 12/11/2007 y 8/09/2008; y la F, diagnosticada el 20/05/2010 y 19/11/2010) representan un tercio de los seis clústeres VNTR identificados, lo cual sugiere fuertemente que esta familia del CMTB también está emergiendo en San Luis Potosí. La prueba de Storey no detectó a la familia Beijing como emergente quizás porque se basa en que en un *spoligoforest* con el mismo número de aislados de dos genotipos comparables se está propagando a mayor velocidad que el que tiene menos eventos mutacionales y funcionaría en poblaciones en las que se deriven genotipos adicionales de la familia Beijing, lo cual no ocurre en la población analizada.

El bajo valor del TMI probablemente sobreestima la transmisión reciente pues la genotipificación VNTR de los espiligoclústeres con vínculos geográficos sugiere que el 3.6% de los enfermos están involucrados en eventos de transmisión reciente, valor que a su vez puede constituir una subestimación. Por otro lado, no todos los pacientes relacionados comparten necesariamente cepas del mismo genotipo, pues los estudios en localidades con diferente demografía indican que las discrepancias pueden ser del 61% al 70% (Behr et al. 1998; McNabb et al. 2004; Borrell et al. 2009). Por lo tanto, probablemente es sobreestimado el número de pacientes involucrados en cadenas de transmisión inferido de la proporción de casos entre los contactos (7.4%).

En otras regiones del mundo el rango de las tasas de transmisión reciente es del 18% al 25% (van Deutekom et al. 2004; Moonan et al. 2012; Ferdinand et al. 2013). Las diferencias con nuestros resultados pueden atribuirse a las diferentes características sociodemográficas de las poblaciones estudiadas que podrían determinar las dinámicas de transmisión reciente. En nuestro estado predominan los casos en personas de nivel socioeconómico bajo, habitantes de zonas marginadas con una mediana de edad de 50 años. Las principales enfermedades concomitantes son diabetes, desnutrición y alcoholismo, con mínima representación de co-infección con VIH, uso de drogas e indigencia (Lopez-Rocha et al. 2013). Un estudio de genotipificación RFLP IS6110 en Holanda estimó en 20% la transmisión reciente, pero en el 55% de los casos en

clústeres pareció ocurrir casualmente entre drogadictos, indigentes e infectados con VIH, la mayoría inmigrantes con una edad media de 38 años (van Deutekom et al. 2004). Un estudio de espigotipos y MIRU-VNTR 12 determinó que la cuarta parte de los casos de TBP en Estados Unidos es atribuible a transmisión reciente (Moonan et al. 2012) y otro en la isla de Guadeloupe estimó una transmisión reciente de 18.2% en una muestra con más de 40% de inmigrantes, edad mediana de 40 años y alta proporción de coinfección por VIH (38.2%) (Ferdinand et al. 2013).

En otras regiones de México los valores del TMI son mayores, aunque cercanos al encontrado por nosotros. En la ciudad de Orizaba, el análisis RFLP IS6110 atribuye el 29% de los casos a transmisión reciente, aunque demostró contactos sólo en el 7.3% (Garcia-Garcia et al. 2000). El estudio de espigotipificación en Acapulco atribuye el 68% de los casos a partir del índice de transmisión reciente ($RTIn - 1$) (Nava-Aguilera et al. 2011), medida que sólo depende del tamaño de la muestra y el número de genotipos (Small et al. 1994); sin embargo, con el análisis de los espigotipos de ese estudio nosotros estimamos un $TMI = 0.17$. En el estudio de Monterrey, que no precisa la proporción de casos entre los contactos (Molina-Torres et al. 2010) nosotros calculamos un $TMI = 0.15$.

Nuestros resultados indican que en el estado de San Luis Potosí la transmisión reciente de la TBP es baja y la vigilancia epidemiológica actual insuficiente para detectar los casos oportunamente. Esta deficiencia sería subsanada en parte empleando la epidemiología molecular para identificar los casos con vínculos no detectables con la epidemiología convencional.

Como en esta región predomina la reactivación endógena sobre la transmisión reciente de la TBP, el TAES debería complementarse con la detección de los casos latentes y la prevención de la reactivación endógena

En San Luis Potosí los casos con vínculos epidemiológicos no son confirmados por genotipificación porque no todos son cultivados. Muchos estudios demuestran que la genotipificación identifica contactos no descubiertos durante la investigación epidemiológica. La investigación complementaria contactos-

genotipificación jugará un papel crucial, mayor al de la epidemiología convencional, para predecir la transmisión reciente (McNabb et al. 2004).

Diversos estudios han estimado la utilidad y el impacto de diversas estrategias de trazabilidad de contactos. Uno de estos es la investigación en dos fases mediante la cual la entrevista habitual de trazabilidad de contactos es seguida por una segunda entrevista a los enfermos con aislados del CMTB agrupados en espilogoclústeres (Sintchenko and Gilbert 2007). De esta manera detectaron el 58% de los enfermos infectados en un lapso de dos años después de la exposición, en comparación con el 32% de la epidemiología convencional. En San Luis Potosí la estrategia de dos fases podría aumentar la identificación de vínculos epidemiológicos no convencionales y prevenir más infecciones secundarias.

Desconocemos qué proporción del 7.4% de los casos detectados por trazabilidad de contactos se agrupa en espilogoclústeres porque el actual sistema de vigilancia no los confirma por cultivo y por tanto no determina el número de contactos por caso índice, ni la proporción de contactos que se dan en lugares a los que no llega la investigación convencional de contactos. También desconocemos los contactos de los enfermos de las tres cadenas de transmisión con patrones VNTR casi idénticos.

El predominio de la reactivación endógena sobre la transmisión reciente de la TBP en el estado de San Luis Potosí quizás deriva principalmente de las dos condiciones concomitantes que predominan en la población afectada: desnutrición (Macallan 1999) y diabetes (Wu et al. 2010). Tomar en cuenta ambas condiciones permitiría diseñar intervenciones apropiadas de prevención y control.

Un número desconocido de casos de TBP se desarrolla porque no se investigan los contactos en lugares no tradicionales. En lugares de baja incidencia como nuestro estado el diagnóstico temprano ayudaría a prevenir la transmisión (Cronin et al. 2002), mediante una reforma a la vigilancia epidemiológica de la TB pulmonar con un programa de cultivo y la genotipificación en dos etapas ya mencionada (Sintchenko and Gilbert 2007). Esta reforma ayudaría 1) a descubrir y curar a los pacientes bacilíferos que estén propagando la enfermedad y concurren

a lugares tradicionalmente no investigados por la epidemiología convencional, 2) a descubrir cepas emergentes y 3) a trazar la evolución de los genotipos en el estado. Asimismo ayudaría establecer rutinariamente el cultivo y la genotipificación de todos los casos identificados entre los contactos.

Referencias

- Allix-Beguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P (2008a) Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46:1398-1406
- Behr MA, Hopewell PC, Paz EA, Kawamura LM, Schechter GF, Small PM (1998) Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 158:465-469
- Borrell S, Espanol M, Orcau A, Tundo G, March F, Cayla JA, Jansa JM, Alcaide F, Martin-Casabona N, Salvado M, Martinez JA, Vidal R, Sanchez F, Altet N, Coll P, Gonzalez-Martin J (2009) Factors associated with differences between conventional contact tracing and molecular epidemiology in study of tuberculosis transmission and analysis in the city of Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 47:198-204
- Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36:214-216
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, et al. (2006b) *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6:23
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (2013) Cifras Oficiales Tuberculosis 1990-2010. Vol. 2013. Secretaría de Salud de México, México D.F.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S (2009) Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* 4:e7815
- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT (2002) Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 40:1592-1602
- Cronin WA, Golub JE, Lathan MJ, Mukasa LN, Hooper N, Razeq JH, Baruch NG, Mulcahy D, Benjamin WH, Magder LS, Strickland GT, Bishai WR (2002) Molecular epidemiology of tuberculosis in a low- to moderate-incidence state: are contact investigations enough? *Emerg Infect Dis* 8:1271-1279
- Dirección General de Información en Salud (DGIS) (2013) Base de datos de egresos hospitalarios por morbilidad en Instituciones Públicas. Vol. 2013. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS)
- European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis (2006) Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 12:736-743

- Ferdinand S, Millet J, Accipe A, Cassadou S, Chaud P, Levy M, Theodore M, Rastogi N (2013) Use of genotyping based clustering to quantify recent tuberculosis transmission in Guadeloupe during a seven years period: analysis of risk factors and access to health care. *BMC Infect Dis* 13:364
- Garcia-Garcia M, Palacios-Martinez M, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona ME, Jimenez-Corona A, Balandrano-Campos S, Olivera-Diaz H, Valdespino-Gomez JL, Small PM (2000) The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 4:12-17
- Glynn J, Vyonycky E, Fine P (1999) Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques. *American Journal of Epidemiology* 149:366-371
- Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL (2003) Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol* 41:2323-2329
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-914
- Lopez-Rocha E, Juarez-Alvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, Hernandez-Nieto J, Enciso-Moreno JA, Lopez-Revilla R (2013) Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosi, Mexico. *BMC Res Notes* 6:172
- Macallan DC (1999) Malnutrition in tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:153-157
- McNabb SJ, Kammerer JS, Hickey AC, Braden CR, Shang N, Rosenblum LS, Navin TR (2004) Added epidemiologic value to tuberculosis prevention and control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am J Epidemiol* 160:589-597
- Molina-Torres CA, 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* 48:448-455
- Moonan PK, Ghosh S, Oeltmann JE, Kammerer JS, Cowan LS, Navin TR (2012) Using genotyping and geospatial scanning to estimate recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission, United States. *Emerg Infect Dis* 18:458-465
- Nava-Aguilera E, Lopez-Vidal Y, Harris E, Morales-Perez A, Mitchell S, Flores-Moreno M, Villegas-Arrizon 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
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Panamerican Health Organization (2008) Tuberculosis in the Americas. 2008 Regional Report [in Spanish]. The Organization, Washington, DC
- Reyes JF, Chan CH, Tanaka MM (2012) Impact of homoplasy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 12:811-818
- Reyes JF, Francis AR, Tanaka MM (2008) Models of deletion for visualizing bacterial variation: an application to tuberculosis spoligotypes. *BMC Bioinformatics* 9:496

- Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, Supply P (2002) Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 40:4561-4566
- Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. Nature 163:688-688
- Sintchenko V, Gilbert GL (2007) Utility of genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in the contact investigation: a decision analysis. Tuberculosis (Edinb) 87:176-184
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK (1994) The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 330:1703-1709
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, 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 44:4498-4510
- Tanaka MM, Francis AR (2005) Methods of quantifying and visualising outbreaks of tuberculosis using genotypic information. Infect Genet Evol 5:35-43
- Tanaka MM, Francis AR (2006) Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 103:15266-15271
- van Deutekom H, Hoijng SP, de Haas PE, Langendam MW, Horsman A, van Soolingen D, Coutinho RA (2004) Clustered Tuberculosis Cases Do They Represent Recent Transmission and Can They Be Detected Earlier? American journal of respiratory and critical care medicine 169:806-810
- van Deutekom H, Supply P, de Haas PE, Willery E, Hoijng SP, Locht C, Coutinho RA, van Soolingen D (2005) Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. J Clin Microbiol 43:4473-4479
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D (2010) MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic Acids Res 38:W326-331
- World Health Organization (2013) Mexico Tuberculosis Profile 2011. Vol. 2013. World Health Organization
- World Health Organization. (2012) Global Tuberculosis Report 2012. World Health Organization, Geneva
- Wu P, Lau EH, Cowling BJ, Leung CC, Tam CM, Leung GM (2010) The transmission dynamics of tuberculosis in a recently developed Chinese city. PLoS One 5:e10468

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

Con este trabajo completamos, por primera vez, el estudio de la epidemiología molecular de la TBP en un estado completo de México.

Demostramos que las inequidades socioeconómicas en los municipios del estado tienen un impacto significativo sobre la, así mismo, desigual incidencia de la enfermedad (así como en sus enfermedades concomitantes) por regiones (Lopez-Rocha et al. 2013) y que las acciones de prevención y control de la TB deben adaptarse a estas diferencias.

Por primera vez en San Luis Potosí, identificamos que al menos un 2.4% de los casos de TBP son causados por *M. bovis* y que esta proporción seguramente es mayor dado que fueron detectados por un sistema de vigilancia epidemiológica no diseñado para diagnosticar esta especie.

Determinamos la gran diversidad genética del CMTB en el estado. La inmensa mayoría de los aislados estudiados son de la especie *M. tuberculosis* en los cuales predomina el Linaje Euro-Americano, con mucho menores proporciones de los linajes Indo-Oceánico y Asiático-Oriental.

Como la epidemiología clásica detectó una muy baja proporción de casos entre los contactos de los casos índice, el análisis de espoligotipos arrojó un TMI de 0.11 y la tipificación MIRU-VNTR sólo detectó cadenas de transmisión en 3.6% de los casos, concluimos que la situación actual de la epidemiología de la TB no se debe tanto a la transmisión reciente sino principalmente a la reactivación endógena de TBL.

Dado que dos de las seis cadenas de transmisión reciente pertenecen al genotipo Beijing del Linaje Asiático-Oriental, este genotipo parece estar emergiendo en el estado y puede representar un riesgo epidemiológico mayormente en las zonas de alta incidencia donde los factores de riesgo de reactivación y transmisión son más elevados.

Los casos de TBP pulmonar incluidos en este estudio representan alrededor de las tres cuartas partes del total de casos notificados (General Direction of Health Information 2013). Este dato y el hecho de que la muestra estudiada no

haya sido aleatoria y estuviese restringida a un periodo de tiempo limitado, hace que la estimación de espilogoclústeres tenga un sesgo sistemático que subestima su tamaño y, por ende, la extensión de la transmisión reciente mediante el cálculo del TMI (Glynn et al. 1999).

Sin embargo, este sesgo puede ser compensado por la propiedad de los espilogotipos de tender a la convergencia por homoplasia, lo cual en última instancia sobreestima la transmisión reciente. De cualquier manera el TMI como estimación de la extensión reciente representa una aproximación que pudimos contextualizar con las otras evidencias ya discutidas.

Si bien la muestra para la tipificación MIRU-VNTR fue rigurosamente seleccionada, sigue siendo una fracción pequeña de los casos notificados y por tanto la estimación de la transmisión reciente con este método adolece de la misma limitación de subestimación potencial por el escaso tamaño de la muestra.

No podemos conocer la proporción de los casos agrupados en clústeres entre los detectados por trazabilidad clásica de contactos ya que el actual sistema de vigilancia epidemiológica no los confirma por cultivo.

También desconocemos los contactos de los enfermos de las tres cadenas de transmisión identificadas por sus patrones MIRU-VNTR casi idénticos.

Hemos demostrado que en San Luis Potosí la epidemiología molecular tiene el potencial de incrementar la detección de casos primarios, la identificación de cadenas de transmisión, la estimación de la transmisión reciente y la detección y control de cepas emergentes. Como permite determinar la especie causante de la enfermedad también tiene el potencial de proporcionar información para el control, prevención y manejo de la población que padece TB por *M. bovis*.

Los hallazgos y las implicaciones de este estudio nos han llevado a proponer un Sistema Estatal de Vigilancia Epidemiológica de la TB que remonte las principales limitaciones del sistema actual de vigilancia epidemiológica mediante las siguientes acciones:

1. Cultivo rutinario de los especímenes de casos sospechosos tanto en medio Lowenstein-Jensen (óptimo para *M. tuberculosis*) y, en paralelo, en medio Stonebrick (óptimo para *M. bovis*).

2. Espoligotipificación universal de los casos cultivados positivos al CMTB.
3. Genotipificación programática por MIRU-VNTR según el algoritmo basado en las relaciones epidemiológicas de los casos en espoligoclústeres.
4. Confirmación por cultivo y genotipificación de todos los casos detectados entre los contactos.
5. Detección de los casos de TB latente propensos a desarrollar TB activa.

REFERENCIAS GENERALES

- (2000) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 23 Suppl 1:S4-19
- Alvarez-Gordillo GC, Dorantes-Jimenez JE (1998) [Shortened directly observed treatment of pulmonary tuberculosis]. *Salud Publica Mex* 40:272-275
- Alvarez-Gordillo GC, Halperin-Frisch D, Blancarte-Melendres L, Vazquez-Castellanos JL (1995) [Risk factors for antitubercular drug resistance in Chiapas, Mexico]. *Salud Publica Mex* 37:408-416
- Allix-Beguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P (2008a) Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46:1398-1406
- Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S (2008b) Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 46:2692-2699
- Anzaldo C, Prado M Methodology for estimation of the marginalization index [in Spanish]. Consejo Nacional de Población, México, DF. México
- Babor T, Higgins-Biddle J, Saunders J, Monteiro M (2001) The alcohol use disorders identification test. Guidelines for Use in Primary Care. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Behr MA, Hopewell PC, Paz EA, Kawamura LM, Schechter GF, Small PM (1998) Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 158:465-469
- Bloom BR, Flynn J, McDonough K, Kress Y, Chan J (1994) Experimental approaches to mechanisms of protection and pathogenesis in *M. tuberculosis* infection. *Immunobiology* 191:526-536
- Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, de Haas PE, van Soolingen D (2001) Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* depending on the age and sex of source cases. *Am J Epidemiol* 154:934-943
- Borrell S, Espanol M, Orcau A, Tudo G, March F, Cayla JA, Jansa JM, Alcaide F, Martin-Casabona N, Salvado M, Martinez JA, Vidal R, Sanchez F, Altet N, Coll P, Gonzalez-Martin J (2009) Factors associated with differences between conventional contact tracing and molecular epidemiology in study of tuberculosis transmission and analysis in the city of Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 47:198-204

- Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36:214-216
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM (2006a) SpolDB4 Sorted by Binary Spoligotype Description
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, et al. (2006b) *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6:23
- Bustamante-Montes LP, Bellido-Barcenas F, Riojas-Rodriguez H, Borja-Aburto VH, Yanez-Velasco L, Becerra-Posada F (1996) [Sociodemographic characteristics of people who died from pulmonary tuberculosis in Veracruz, Mexico, 1993]. *Salud Publica Mex* 38:323-331
- Camirero-Luna J (2003) Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, Paris, France
- Camirero J (2007) [The old battle between the human species and Koch's bacillae. Can one dream of eradicating tuberculosis?]. *An Sist Sanit Navar* 30 Suppl 2:163-180
- Castellanos-Joya M, García-Avilés MA, Tellez-Medina HA (2008) Tuberculosis in Mexico [in Spanish] *Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades* (2013) *Cifras Oficiales Tuberculosis 1990-2010. Vol. 2013. Secretaría de Salud de México, México D.F.*
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S (2009) Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* 4:e7815
- Consejo Nacional de Población (2012) Anexo B. Índices de intensidad migratoria por entidad federativa y municipio Índices de intensidad migratoria México-Estados Unidos 2010, México, D.F., pp 191
- Corner LA, Nicolacopoulos C (1988) Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Aust Vet J* 65:202-205
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX (1998) Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4:59-70
- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT (2002) Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 40:1592-1602
- Cowley D, Govender D, February B, Wolfe M, Steyn L, Evans J, Wilkinson RJ, Nicol MP (2008) Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Cape Town, South Africa. *Clin Infect Dis* 47:1252-1259
- Cox R, Mirkin SM (1997) Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5237-5242
- Cronin WA, Golub JE, Lathan MJ, Mukasa LN, Hooper N, Razeq JH, Baruch NG, Mulcahy D, Benjamin WH, Magder LS, Strickland GT, Bishai WR (2002) Molecular epidemiology of tuberculosis in a low- to moderate-incidence state: are contact investigations enough? *Emerg Infect Dis* 8:1271-1279

- Dirección General de Información en Salud (DGIS) (2013) Base de datos de egresos hospitalarios por morbilidad en Instituciones Públicas. Vol. 2013. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS)
- Douglas JT, Qian L, Montoya JC, Musser JM, Van Embden JD, Van Soolingen D, Kremer K (2003) Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 41:2723-2726
- Driscoll JR (2009) Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Methods Mol Biol 551:117-128
- Espinal MA, Perez EN, Baez J, Henriquez L, Fernandez K, Lopez M, Olivo P, Reingold AL (2000) Infectiousness of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-1-infected patients with tuberculosis: a prospective study. Lancet 355:275-280
- European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis (2006) Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. Emerg Infect Dis 12:736-743
- Evans J, Segal H (2010) Novel multiplex allele-specific PCR assays for the detection of resistance to second-line drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 65:897-900
- Ferdinand S, Millet J, Accipe A, Cassadou S, Chaud P, Levy M, Theodore M, Rastogi N (2013) Use of genotyping based clustering to quantify recent tuberculosis transmission in Guadeloupe during a seven years period: analysis of risk factors and access to health care. BMC Infect Dis 13:364
- Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Dang DA, et al. (2003) Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. J Clin Microbiol 41:1963-1970
- Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM (2006) Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 103:2869-2873
- Garcia-Garcia M, Palacios-Martinez M, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona ME, Jimenez-Corona A, Balandrano-Campos S, Olivera-Diaz H, Valdespino-Gomez JL, Small PM (2000) The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. Int J Tuberc Lung Dis 4:12-17
- Glynn J, Vyonycky E, Fine P (1999) Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques. American Journal of Epidemiology 149:366-371
- Greene JA (2004) An ethnography of nonadherence: culture, poverty, and tuberculosis in urban Bolivia. Cult Med Psychiatry 28:401-425
- Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CR, Kidd M, Beyers N, Victor TC, van Helden PD, Warren RM (2007) A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. J Clin Microbiol 45:1483-1490
- Hargreaves JR, Boccia D, Evans CA, Adato M, Petticrew M, Porter JD (2011) The social determinants of tuberculosis: from evidence to action. Am J Public Health 101:654-662

- Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM (2004) Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4871-4876
- Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL (2003) Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol* 41:2323-2329
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010) Censo de Población y Vivienda 2005. Principales resultados por localidad. Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- Jimenez-Corona ME, Garcia-Garcia L, Leon AP, Bobadilla-del Valle M, Torres M, Canizales-Quintero S, Palacios-Merino C, Molina-Hernandez S, Martinez-Gamboa RA, Juarez-Sandino L, Cano-Arellano B, Ferreyra-Reyes L, Cruz-Hervert LP, Baez-Saldana R, Ferreira-Guerrero E, Sada E, Marquina B, Sifuentes-Osornio J (2009) Research on conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Orizaba, Veracruz, 1995-2008 [in Spanish]. *Salud Publica Mex* 51 Suppl 3:S470-478
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-914
- Lonnroth K, Jaramillo E, Williams BG, Dye C, Raviglione M (2009) Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med* 68:2240-2246
- Lopez-Rocha E, Juarez-Alvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, Hernandez-Nieto J, Enciso-Moreno JA, Lopez-Revilla R (2013) Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosi, Mexico. *BMC Res Notes* 6:172
- Macallan DC (1999) Malnutrition in tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:153-157
- Martinez-Gamboa A, Ponce-de-Leon A, Galindo-Fraga A, Bobadilla-del-Valle M, Kato-Maeda M, Robertson BD, Young DB, Small PM, Sifuentes-Osornio J (2008) Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains with an intact pks15/1 gene in a rural community of Mexico. *Arch Med Res* 39:809-814
- Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Wallace RJ, Jr., Bates JH, Crawford JT (1991) Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29:2030-2033
- McNabb SJ, Kammerer JS, Hickey AC, Braden CR, Shang N, Rosenblum LS, Navin TR (2004) Added epidemiologic value to tuberculosis prevention and control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am J Epidemiol* 160:589-597
- Milian-Suazo F, Perez-Guerrero L, Arriaga-Diaz C, Escartin-Chavez M (2010) Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Prev Vet Med* 97:37-44
- Molina-Torres CA, 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* 48:448-455

- Moonan PK, Ghosh S, Oeltmann JE, Kammerer JS, Cowan LS, Navin TR (2012) Using genotyping and geospatial scanning to estimate recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission, United States. *Emerg Infect Dis* 18:458-465
- Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, et al. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235:1616-1622
- National Council of Population (2010) Mexico Population Projections: 2005-2030 [in Spanish]. The Council
- National Institute of Statistics and Geography. (2010) Vectorial data set of the national geostatistical frame [in Spanish]. The Institute
- National Service of Agri-food Health and Quality. (2010) Strategic Plan for the Campaign against the Bovine Tuberculosis in Mexico, 2008-2012 [in Spanish]. The Service, México, DF
- Nava-Aguilera E, Lopez-Vidal Y, Harris E, Morales-Perez A, Mitchell S, Flores-Moreno M, Villegas-Arrizon 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
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Panamerican Health Organization (2008) Tuberculosis in the Americas. 2008 Regional Report [in Spanish]. The Organization, Washington, DC
- Perez-Guerrero L, Milian-Suazo F, Arriaga-Diaz C, Romero-Torres C, Escartin-Chavez M (2008) Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico [in Spanish]. *Salud Publica Mex* 50:286-291
- Ponce-De-Leon A, Garcia-Garcia Md Mde L, Garcia-Sancho MC, Gomez-Perez FJ, Valdespino-Gomez JL, Olaiz-Fernandez G, Rojas R, Ferreyra-Reyes L, Cano-Arellano B, Bobadilla M, Small PM, Sifuentes-Osornio J (2004) Tuberculosis and diabetes in southern Mexico. *Diabetes Care* 27:1584-1590
- Quitugua TN, Seaworth BJ, Weis SE, Taylor JP, Gillette JS, Rosas, II, Jost Jr KC, Jr., Magee DM, Cox RA (2002) Transmission of drug-resistant tuberculosis in Texas and Mexico. *J Clin Microbiol* 40:2716-2724
- Raviglione MC (2010) Tuberculosis : the essentials. Informa Healthcare, New York
- Reyes JF, Chan CH, Tanaka MM (2012) Impact of homoplasy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 12:811-818
- Reyes JF, Francis AR, Tanaka MM (2008) Models of deletion for visualizing bacterial variation: an application to tuberculosis spoligotypes. *BMC Bioinformatics* 9:496
- Sanchez-Perez HJ, Diaz-Vazquez A, Najera-Ortiz JC, Balandrano S, Martin-Mateo M (2010) Multidrug-resistant pulmonary tuberculosis in Los Altos, Selva and Norte regions, Chiapas, Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 14:34-39
- Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Loch C, Supply P (2002) Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 40:4561-4566
- Schurz WL (1917) The Manila galleon and California. *Southwestern Historical Quarterly* 21:107-126

- Secretaría de Salud. (2005) Modification to the Official Mexican Standard NOM-006-SSA2-1993, for the prevention and control of tuberculosis in primary health attention [in Spanish]. La Secretaría, Diario Oficial de la Federación, pp 1-12
- Secretaría de Salud. (2011) Programa de Acción Prevención y Control de la Tuberculosis Boletín Caminando a la Excelencia Cierre 2010, México, D.F., pp 149
- Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T, Kirikae T (2007) Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 45:179-192
- Shafer RW, Small PM, Larkin C, Singh SP, Kelly P, Sierra MF, Schoolnik G, Chirgwin KD (1995) Temporal trends and transmission patterns during the emergence of multidrug-resistant tuberculosis in New York City: a molecular epidemiologic assessment. J Infect Dis 171:170-176
- Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon LA, Camacho-Mezquita FE, Bobadilla-del-Valle JM, Infante-Suarez ML, Ramirez-Fernandez N, Hernandez-Gomez L, Nelson AM (1995) [Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican patients. I. Clinical features and risk factors]. Rev Invest Clin 47:273-281
- Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. Nature 163:688-688
- Sintchenko V, Gilbert GL (2007) Utility of genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in the contact investigation: a decision analysis. Tuberculosis (Edinb) 87:176-184
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK (1994) The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 330:1703-1709
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, 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 44:4498-4510
- 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 36:762-771
- Tanaka MM, Francis AR (2005) Methods of quantifying and visualising outbreaks of tuberculosis using genotypic information. Infect Genet Evol 5:35-43
- Tanaka MM, Francis AR (2006) Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 103:15266-15271
- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res 12:4127-4138
- van der Spuy GD, Warren RM, Richardson M, Beyers N, Behr MA, van Helden PD (2003) Use of genetic distance as a measure of ongoing transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 41:5640-5644
- van Deutekom H, Hoijng SP, de Haas PE, Langendam MW, Horsman A, van Soolingen D, Coutinho RA (2004) Clustered Tuberculosis Cases Do They Represent Recent Transmission and Can They Be Detected Earlier? American journal of respiratory and critical care medicine 169:806-810

- van Deutekom H, Supply P, de Haas PE, Willery E, Hoijng SP, Locht C, Coutinho RA, van Soolingen D (2005) Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* 43:4473-4479
- van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD (1999) Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 341:1174-1179
- van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD (1993) Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 31:1987-1995
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D (2010) MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 38:W326-331
- World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Vol 894. WHO, Geneva, Switzerland
- World Health Organization (2008) Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. The Organization, Geneva
- World Health Organization (2009) Global tuberculosis control: Epidemiology, Strategy, Financing. WHO, Geneva, Switzerland
- World Health Organization (2013) Mexico Tuberculosis Profile 2011. Vol. 2013. World Health Organization
- World Health Organization. (2012) Global Tuberculosis Report 2012. World Health Organization, Geneva
- Wu P, Lau EH, Cowling BJ, Leung CC, Tam CM, Leung GM (2010) The transmission dynamics of tuberculosis in a recently developed Chinese city. *PLoS One* 5:e10468

ANEXO 1
PRODUCTOS GENERADOS

Artículo publicado (Capítulo II)

Estela López-Rocha, Julio Juárez-Álvarez, Lina Riego-Ruiz, Leonor Enciso-Moreno, Francisco Ortega, Julián Hernández-Nieto, José A Enciso-Moreno, Rubén López-Revilla (2013) Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosí, México. BMC Research Notes 6:172.

Manuscrito del segundo artículo que será sometido a publicación (Capítulo III)

Estela López-Rocha, Julio Juárez-Álvarez, Lina Riego-Ruiz, Leonor Enciso-Moreno, Francisco Ortega, Julián Hernández-Nieto, José A Enciso-Moreno, Rubén López-Revilla (2014) Diversidad genética del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y cadenas de transmisión reciente identificadas por genotipificación VNTR en San Luis Potosí, México.

Artículos en memorias de reuniones científicas

López-Rocha E, Riego-Ruiz L, López-Revilla R, Perches S, Juárez-Álvarez J, Ortega F, de la Maza L, García Y, Enciso Y, Enciso A. Identificación de *Mycobacterium bovis* en casos de tuberculosis pulmonar activa en San Luis Potosí, México. IV Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. Abril de 2010, Comité Interinstitucional de Investigación en Salud.

López-Rocha E, Riego L, López-Revilla R, Perches S, Juárez-Álvarez J, Ortega F, de la Maza L, Enciso L, García Y, Enciso A. Primera cepa de *Mycobacterium tuberculosis* genotipo Beijing identificada en el estado de San Luis Potosí, México. IV Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. Abril de 2010, Comité Interinstitucional de Investigación en Salud.

López-Rocha E, Riego L, López-Revilla R, Perches S, Juárez-Álvarez J, Ortega F, Hernández J, de la Maza L, Enciso L, García Y, Enciso A. Species, families

and clusters of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates identified by spoligotyping in San Luis Potosí, México. VI Simposio Fronteras del Conocimiento Dr. Joseph Colston y V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Zacatecas, Zac. 22 al 25 de agosto de 2010. Unidad de Investigación Médica del IMSS-Zacatecas.

López-Rocha E, Riego L, López-Revilla R, Perches S, Juárez-Álvarez J, Ortega F, Hernández J, de la Maza L, Enciso L, García Y, Enciso A. Human pulmonary tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in rural communities of San Luis Potosí, Mexico, identified by spoligotyping. VI Simposio fronteras del conocimiento Dr. Joseph Colston y V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Zacatecas, Zac. 22 al 25 de agosto de 2010. Unidad de Investigación Médica del IMSS-Zacatecas.

López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno A, Enciso-Moreno L, Ortega F, Hernández J, López-Revilla R. Genotipos de los aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a antifímicos en San Luis Potosí. V Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P, 14 y 15 de abril de 2011. Comité Interinstitucional de Investigación en Salud.

Juárez-Alvarez J, López-Rocha E, Riego L, Enciso Moreno A, López-Revilla R. En San Luis Potosí las cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* son heterogéneas y tienen baja transmisión reciente. V Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P, 14 y 15 de abril de 2011. Comité Interinstitucional de Investigación en Salud.

López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso A, Enciso L, Ortega F, Hernández J, López-Revilla R. Cadenas de transmisión de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* identificadas por MIRU-VNTR en el estado de San Luis Potosí, México. VI Foro Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. 29 y 30 de marzo de 2012. Comité Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud.

Juárez-Álvarez J, López-Rocha E, Riego-Ruiz L, Ortega F, Hernández J, Enciso E, López-Revilla R. Epidemiología de la tuberculosis pulmonar en el estado de San Luis Potosí, 2006-2010. VI Foro Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. 29 y 30 de marzo de 2012. Comité Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud.

López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso JA, Enciso L, Ortega F, Hernández J, López-Revilla R. Cadenas de transmisión reciente de tuberculosis pulmonar identificadas por MIRU-VNTR en San Luis Potosí, México. VII Simposio Fronteras del Conocimiento en Tuberculosis y otras Micobacteriosis, "Dr. Joseph Colston" Hermosillo, Son., 29 y 30 de marzo 2012. Universidad de Sonora.

Juárez-Alvarez J, López-Rocha E, Riego L, Enciso JA, López-Revilla R. La transmisión reciente contribuye poco a la persistencia de la tuberculosis pulmonar en San Luis Potosí, México. VII Simposio Fronteras del Conocimiento en Tuberculosis y otras Micobacteriosis "Dr. Joseph Colston". Hermosillo, Son., 29 y 30 de marzo 2012. Universidad de Sonora.

López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso JA, Enciso L, Ortega F, Hernández J, López-Revilla R. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing, genotipo emergente que amenaza el control de la tuberculosis en el estado de San Luis Potosí. VII Foro Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. 29 y 30 de abril de 2013. Comité Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud.

Participación en reuniones científicas

Estela López-Rocha, Lina Riego-Ruiz, Rubén López-Revilla, Susana Perches, Julio Juárez-Álvarez, Francisco Ortega, Luis de la Maza, Yolanda García, Leonor Enciso y Antonio Enciso. Identificación de *Mycobacterium bovis* en casos de tuberculosis pulmonar activa en San Luis Potosí, México. Cartel. IV Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. Abril de 2010. Segundo lugar en el área de investigación básica.

Estela López-Rocha, Lina Riego, Rubén López-Revilla, Susana Perches, Julio

Juárez-Álvarez, Francisco Ortega, Luis de la Maza, Leonor Enciso, Yolanda García y Antonio Enciso Primera cepa de *Mycobacterium tuberculosis* genotipo Beijing identificada en el estado de San Luis Potosí, México. Cartel. IV Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. Abril de 2010

López-Rocha E, Riego L, López-Revilla R, Perches S, Juárez-Álvarez J, Ortega F, Hernández J, de la Maza L, Enciso L, García Y, Enciso A. Cartel Species, families and clusters of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates identified by spoligotyping in San Luis Potosí, México. Cartel. VI Simposio fronteras del conocimiento Dr. Joseph Colston y V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Zacatecas, Zacatecas 22 al 25 de agosto de 2010.

López-Rocha E, Riego L, López-Revilla R, Perches S, Juárez-Álvarez J, Ortega F, Hernández J, de la Maza L, Enciso L, García Y, Enciso A Human pulmonary tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in rural communities of San Luis Potosí, Mexico, identified by spoligotyping. Cartel. VI Simposio fronteras del conocimiento Dr. Joseph Colston y V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Zacatecas, Zacatecas 22 al 25 de agosto de 2010

Estela López-Rocha, Julio Juárez-Álvarez, Lina Riego-Ruiz, Antonio Enciso-Moreno, Leonor Enciso-Moreno, Francisco Ortega, Julián Hernández, Rubén López-Revilla. Genotipos de los aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a antífmicos en San Luis Potosí. Cartel. V Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P, 14 y 15 de abril de 2011. Segundo lugar en el área de investigación básica.

Julio Juárez-Alvarez, Estela López-Rocha, Lina Riego, Antonio Enciso Moreno, Rubén López-Revilla En San Luis Potosí las cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* son heterogéneas y tienen baja transmisión reciente. Cartel. V Foro Interinstitucional de Investigación en Salud, San Luis

- Potosí, S.L.P, 14 y 15 de abril de 2011. Tercer lugar en el área de investigación epidemiológica.
- López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso JA, Enciso L, Ortega F, Hernández J, López-Revilla R Cadenas de transmisión reciente de tuberculosis pulmonar identificadas por MIRU-VNTR en San Luis Potosí, México. Cartel. VI Foro Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. 29 y 30 de marzo de 2012
- Julio Juárez-Alvarez, Estela López-Rocha, Lina Riego, Ortega F., Hernández J., Antonio Enciso Moreno, Rubén López-Revilla Epidemiología de la Tuberculosis en el Estado de San Luis Potosí 2006-2010. Cartel. VI Foro Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. 29 y 30 de marzo de 2012. Tercer lugar en el área de investigación epidemiológica.
- López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso JA, Enciso L, Ortega F, Hernández J, López-Revilla R. Cadenas de transmisión reciente de tuberculosis pulmonar identificadas por MIRU-VNTR en San Luis Potosí, México. Cartel. VII Simposio Fronteras del Conocimiento en Tuberculosis y otras Micobacteriosis “Dr. Joseph Colston” Hermosillo, Son., 29 y 30 de marzo 2012
- Julio Juárez-Alvarez, Estela López-Rocha, Lina Riego, Antonio Enciso Moreno, Rubén López-Revilla La transmisión reciente contribuye poco a la persistencia de la tuberculosis en San Luis Potosí, México. Cartel. VII Simposio Fronteras del Conocimiento en Tuberculosis y otras Micobacteriosis “Dr. Joseph Colston” Hermosillo, Son., 29 y 30 de marzo 2012
- López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso JA, Enciso L, Ortega F, Hernández J, López-Revilla R. *Mycobacterium Tuberculosis* Beijing, genotipo emergente que amenaza el control de la tuberculosis en el estado de San Luis Potosí. Cartel. VII Foro Interinstitucional de Bioética e Investigación en Salud, San Luis Potosí, S.L.P. 29 y 30 de abril de 2013.

ANEXO 2
CONVENIO IPICYT-SSA

CONVENIO DE COLABORACIÓN QUE CELEBRAN POR UNA PARTE EL ORGANISMO DESCENTRALIZADO DE LA ADMINISTRACIÓN PÚBLICA ESTATAL DENOMINADO **SERVICIOS DE SALUD DE SAN LUIS POTOSÍ**, REPRESENTADO POR SU TITULAR EL **DR. JUAN SÁNCHEZ RAMOS**, QUIEN SE ENCUENTRA ASISTIDO DEL **DR. FRANCISCO JAVIER POSADAS ROBLEDO**, DIRECTOR DE POLÍTICAS Y CALIDAD EN SALUD, A QUIENES CONJUNTAMENTE EN LO SUCESIVO SE DENOMINARÁ “**LOS SSSLP**” Y POR LA OTRA PARTE **EL INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA A.C.**, REPRESENTADO POR SU TITULAR, EL **DR. DAVID RÍOS JARA** ASISTIDO POR LA **DRA. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ** EN SU CARÁCTER DE INVESTIGADORA TITULAR “A” DE LA DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR, A QUIENES CONJUNTAMENTE EN LO SUCESIVO SE DENOMINARÁ “**EL IPICYT**” AL TENOR DE LAS SIGUIENTES:

DECLARACIONES

1. “LOS SSSLP”, A TRAVÉS DE SU REPRESENTANTE, EL DR. JUAN SÁNCHEZ RAMOS, DECLARAN:

- I.1 QUE DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO ADMINISTRATIVO EMITIDO POR EL C. GOBERNADOR CONSTITUCIONAL DEL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ, PROMULGADO EN EL PERIÓDICO OFICIAL DEL ESTADO CON FECHA 11 DE SEPTIEMBRE DE 1996, LOS SERVICIOS DE SALUD DE SAN LUIS POTOSÍ SON UN ORGANISMO DESCENTRALIZADO DE LA ADMINISTRACIÓN PÚBLICA DEL ESTADO CON PERSONALIDAD JURÍDICA Y PATRIMONIO PROPIO, ASÍ COMO CON FUNCIONES DE AUTORIDAD EN LOS TÉRMINOS DEL ARTÍCULO 1º DEL DECRETO CITADO.
- I.2 QUE DE ACUERDO CON EL ARTÍCULO 2, FRACCIÓN I, DEL DECRETO QUE LO CREÓ, TIENE POR OBJETO PRESTAR SERVICIOS DE SALUD A LA POBLACIÓN ABIERTA EN CUMPLIMIENTO A LA LEY GENERAL Y ESTATAL DE SALUD.
- I.3 QUE SU REPRESENTANTE, EL DR. JUAN SÁNCHEZ RAMOS, FUE DESIGNADO DIRECTOR GENERAL DE LOS SERVICIOS DE SALUD DE SAN LUIS POTOSÍ POR LA JUNTA DE GOBIERNO DE DICHO ORGANISMO, EXPIDIÉNDOLE EN CONSECUENCIA SU NOMBRAMIENTO CON FECHA 18 DE FEBRERO DE 2009 EL C. GOBERNADOR CONSTITUCIONAL DEL ESTADO, POR LO QUE SE ENCUENTRA PLENAMENTE FACULTADO PARA SUSCRIBIR EL PRESENTE CONVENIO EN LOS TÉRMINOS DEL ARTÍCULO 12, FRACCIONES I Y XII DEL DECRETO CITADO.
- I.4 PARA LOS EFECTOS DEL PRESENTE INSTRUMENTO SEÑALA COMO SU DOMICILIO EL UBICADO EN LA CALLE DE JESÚS GOYTORTUA NÚMERO 340, FRACCIONAMIENTO TANGAMANGA DE ESTA CIUDAD.

2. “EL IPICYT” DECLARA:

- II.1 QUE ES UNA ENTIDAD PARAESTATAL DE LA ADMINISTRACIÓN PÚBLICA FEDERAL ASIMILADA AL RÉGIMEN DE LAS EMPRESAS DE PARTICIPACIÓN ESTATAL MAYORITARIA, RECONOCIDA COMO CENTRO PÚBLICO DE INVESTIGACIÓN COORDINADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, CONSTITUÍDA DE ACUERDO CON LAS LEYES DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS MEDIANTE ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO 1663, TOMO 81, DEL PROTOCOLO DEL LIC. LEOPOLDO DE LA GARZA MARROQUÍN, NOTARIO PÚBLICO NÚMERO 33 EN EL PRIMER DISTRITO JUDICIAL DE SAN LUÍS POTOSÍ, S.L.P., FECHADA EL 24 DE NOVIEMBRE DEL AÑO 2000. QUE SUS ESTATUTOS HAN SIDO SUSTITUIDOS DE CONFORMIDAD CON EL ARTÍCULO SEGUNDO TRANSITORIO DEL NUEVO INSTRUMENTO DE CREACIÓN DE FECHA 29 DE ENERO DE 2004, PASADO ANTE LA FE DEL LIC. MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ NAVARRO, NOTARIO PÚBLICO NÚMERO 14 CON EJERCICIO EN ESTA CIUDAD CAPITAL, BAJO LA ESCRITURA NÚMERO 4346, DEL TOMO 1150, INSCRITO ANTE EL REGISTRO PÚBLICO DE LA PROPIEDAD Y DE COMERCIO BAJO EL NÚMERO 34151 A FOJA 267 DEL TOMO 486.
- II.2. QUE TIENE COMO SUS OBJETIVOS:
- A. REALIZAR ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN EL ÁREA DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.
 - B. CONTRIBUIR AL FORTALECIMIENTO DE LA INFRAESTRUCTURA CIENTÍFICA REGIONAL Y NACIONAL DENTRO DE UN MARCO DE LA MÁS AMPLIA LIBERTAD ACADÉMICA EN SUS ACTIVIDADES DE DOCENCIA, INFORMACIÓN Y DIVULGACIÓN, CONFORME A LOS PRINCIPIOS DE LIBERTAD DE CÁTEDRA, DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EXPRESIÓN.
 - C. AMPLIAR LA COLABORACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA CON INSTITUCIONES AFINES, TANTO DE LA REGIÓN COMO OTRAS NACIONALES E INTERNACIONALES PARA DESARROLLAR PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DIVULGACIÓN, ASÍ COMO PARA FORMAR RECURSOS HUMANOS ESPECIALIZADOS EN TAREAS DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA DE ALTO NIVEL.
- II.3. QUE LA REPRESENTACIÓN LEGAL DE “EL IPICYT” RECAE EN SU DIRECTOR GENERAL, DR. DAVID RÍOS JARA, SEGÚN LO DISPUESTO EN EL ARTÍCULO TRIGÉSIMO SEXTO, FRACCIÓN IX DE SU INSTRUMENTO DE CREACIÓN.
- II.4. QUE PARA LOS EFECTOS DEL PRESENTE CONVENIO SEÑALA COMO SU DOMICILIO: CAMINO A LA PRESA SAN JOSÉ NÚMERO 2055, COLONIA LOMAS CUARTA SECCIÓN, CÓDIGO POSTAL 78216, EN LA CIUDAD DE SAN LUÍS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO.
3. AMBAS PARTES DECLARAN QUE ES SU DESEO COMPROMETERSE AL TENOR DE LAS SIGUIENTES

CLÁUSULAS

PRIMERA. EL OBJETIVO DEL PRESENTE INSTRUMENTO ES ESTABLECER UN CONVENIO DE COLABORACIÓN PARA DAR CUMPLIMIENTO A LAS METAS Y COMPROMISOS ESTABLECIDOS EN DOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN SOBRE TUBERCULOSIS EN EL ESTADO ESTRECHAMENTE LIGADOS, LOS CUALES HAN SIDO APROBADOS PARA RECIBIR FINANCIAMIENTO DEL FONDO MIXTO CONACYT-ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ:

1. **“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS EN SAN LUIS POTOSÍ”** (FMSLP-2008-C02-107371), CUYA RESPONSABLE TÉCNICA ES LA DRA. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ, Y
2. **“ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA UTILIDAD DE LAS PRUEBAS TST Y QUANTIFERON (QTF) PARA DETERMINAR EL RIESGO DE INFECCIÓN EN CONTACTOS PRIMARIOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS ACTIVA DE SAN LUIS POTOSÍ”** (FMSLP-2008-C02-107445), CUYA RESPONSABLE TÉCNICA ES LA DRA. CARMEN JUDITH SERRANO ESCOBEDO.

SEGUNDA. PARA INSTRUMENTAR LAS ACTIVIDADES A QUE HACE REFERENCIA EL PÁRRAFO ANTERIOR, LOS OBJETIVOS Y TAREAS A DESARROLLAR ASÍ COMO LAS FECHAS EN QUE DEBERÁN REALIZARSE, SE ENUMERAN EN EL **ANEXO**, CORRESPONDIENTES A CADA UNO DE LOS PROYECTOS MENCIONADOS.

TERCERA. LOS SSSLP APORTARÁN DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO DE ENERO DE 2009 A DICIEMBRE DE 2011 LAS INSTALACIONES, EL EQUIPO, LOS DOCUMENTOS Y EL PERSONAL DE SUS UNIDADES NECESARIOS PARA EL CUMPLIMIENTO DE LAS ACTIVIDADES Y METAS DE LOS PROYECTOS CON ACUERDO AL **ANEXO**.

CUARTA. COMO EL PRESENTE CONVENIO ES PRODUCTO DE LA BUENA FÉ DE LAS PARTES, ÉSTAS ACUERDAN RESOLVER EN AMIGABLE COMPOSICIÓN CUALQUIER DUDA, DISCREPANCIA O CONTROVERSIA QUE PUEDA SURGIR DE SU INTERPRETACIÓN U OBSERVACIÓN.

POR LO QUE LEÍDO QUE HA SIDO POR CADA UNA DE LAS PARTES, LO RATIFICAN Y FIRMAN DE CONFORMIDAD POR TRIPLICADO EN LA CIUDAD DE SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P. A LOS 08 DÍAS DEL MES DE MAYO DEL AÑO DE 2009, PARA CONSTANCIA.

POR “LOS SSSLP”

DR. JUAN SÁNCHEZ RAMOS

DIRECTOR GENERAL

DR. FRANCISCO JAVIER POSADAS ROBLEDO

POR “EL IPICYT”

DR. DAVID RÍOS JARA

DIRECTOR GENERAL

DRA. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ

PERSONAL DE LOS SS-SLP CUYA PARTICIPACIÓN EFICAZ Y SOSTENIDA ES NECESARIA PARA CUMPLIR LAS METAS Y COMPROMISOS DEL PROYECTO “EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS EN SAN LUIS POTOSÍ” DURANTE EL PERÍODO COMPRENDIDO DE MAYO DE 2009 A DICIEMBRE DE 2011 INCLUSIVE

A. Subdirector de Epidemiología de los SS-SLP

Dr. Marcelo Aranda Álvarez

Actividades específicas

- 1) Realizará el enlace con los jefes de las jurisdicciones sanitarias para llevar a cabo las actividades en las unidades de salud a las que pertenezcan los pacientes con TBP incluidos en el proyecto así como las actividades de campo.
- 2) Definirá las estrategias a seguir en caso de presentarse desviaciones del proyecto en las jurisdicciones sanitarias.

Productos que generará

- 1) Resultados epidemiológicos.
- 2) Seguimiento de los casos y contactos

B. Coordinadora del Programa Estatal de Tuberculosis SS-SLP

Dra. Susana Perches González

Actividades específicas

- 1) Coordinará y supervisará las actividades de campo del personal de TB en las jurisdicciones sanitarias.
- 2) Supervisará que los casos con TBP se encuentren bajo el esquema TAES.
- 3) Supervisará el seguimiento de los pacientes con TBP con los médicos tratantes de las unidades correspondientes.
- 4) Informará con oportunidad las desviaciones encontradas en las actividades de campo así como del tratamiento y seguimiento para definir las estrategias a seguir.
- 5) Solicitará a las jurisdicciones sanitarias la información correspondiente de los casos de TBP.
- 6) Enlazará a la responsable del proyecto con el departamento correspondiente para solicitar la información requerida.
- 7) Recabará y ordenará la información generada en el trabajo de campo.
- 8) Entregará la información generada a la responsable del proyecto para su análisis.

Productos que generará

- 1) Reportes organizados de los análisis estadísticos.

- 2) Base de datos de los pacientes con TBP.
- 3) Mapas y registros de localización de los pacientes.

**C. Estudiante del doctorado en biología molecular del IPICYT
M.S.P. Ma. Estela López Rocha**

Actividades específicas

1. Coordinará el grupo del IPICYT con el del LESP-SLP.
2. Será capacitada en la UIMZ-IMSS en los métodos de tipificación molecular de MTB (RFLP, SPOLIGOTYPING, MIRU)
3. Procesará las muestras de DNA de MTB para obtener las huellas digitales de los aislados.
4. Realizará el análisis de los patrones de fingerprinting y preparará los dendrogramas respectivos para asociarlos con los datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes.
5. Participará en el análisis de los resultados y en la redacción de su tesis doctoral y de los artículos resultantes.
6. Coordinará la recopilación de resultados, organización de datos y elaboración de los reportes técnicos correspondientes.

Productos que generará

1. Resultado de la genotipificación bacteriana de los aislados de *M. tuberculosis* de los pacientes infectados (TBP)
2. Manuscritos co-revisados para su publicación
3. Base de datos de los pacientes con tuberculosis con resultados de la información epidemiológica y de la genotipificación
4. Tesis de doctorado

D. Médico especialista en tuberculosis

Designación pendiente por los SS-SLP

Actividades específicas

- 1) Evaluará clínicamente a los pacientes con TBP y Combe positivo.
- 2) Participará en las evaluaciones de las placas de rayos X.

Productos que generará

Resultados clínicos de pacientes con TBP.

E. Brigadas del Programa Estatal de Tuberculosis de los SS-SLP

Productos que generarán

- 1) Información completa de los datos clínicos, epidemiológicos y sociodemográficos de los casos de tuberculosis y sus contactos de enero de 2006 a diciembre de 2011.
- 2) Identificarán a los pacientes con tuberculosis y aplicarán el tratamiento adecuado bajo el esquema de TAES.
- 3) Recolectarán las muestras de esputo y las enviarán al LESP para que sean procesadas.
- 4) Información de los pacientes con TBPA identificados en el trabajo de campo

**F. Cuatro pasantes de enfermería o medicina
Designación pendiente por los SS-SLP**

Actividades específicas

Reforzar la búsqueda intencionada de casos nuevos de tuberculosis y sus contactos en las jurisdicciones I (SLP), V (Valles) y VI (Tamazunchale).

**G. Director del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP-SLP)
Dr. Luis Octavio Porras Núñez**

Actividades específicas

Coordinar y verificar que se lleven a cabo las actividades correspondientes del Jefe del Sistema de Calidad y del Coordinador de Epidemiología.

**H. Jefe del Sistema de Calidad del LESP-SLP
MC Julio Alfredo Juárez Álvarez**

Actividades específicas

- 1) Coordinará el equipo del LESP-SLP.
- 2) Mejorará el diseño de la base de datos del cepario de MTB del LESP-SLP.
- 3) Filtrará y depurará los datos para generar la información periódica del cepario.
- 4) Realizará análisis estadísticos de la información clínica y sociodemográfica.
- 5) Elaborará gráficas y tablas con los resultados del análisis de la base de datos.
- 6) Coordinará y supervisará la elaboración de los informes periódicos del LESP-SLP.

Productos que generará

- 1) Base de datos mejorada del cepario de MTB del LESP-SLP (datos clínicos y sociodemográficos de los casos; baciloscopías, cultivo, resistencia a antifímicos y colección de DNA).
- 2) Cepario ampliado y generación de la colección de DNA de MTB.
- 3) Participantes capacitados en los ensayos de resistencia a antifímicos.
- 4) Informes periódicos de los resultados del grupo del LESP-SLP.

**J. Jefe del Laboratorio de Tuberculosis del LESP-SLP
QFB Francisco Ortega Aguilar**

Actividades específicas

- 1) Participará en el aislamiento y cultivo de MTB de los pacientes con TBPA identificados en el trabajo de campo.
- 2) Organizará un respaldo del cepario y la genoteca, supervisando y asegurando la cadena fría para su mantenimiento.
- 3) Realizará la descontaminación y el cultivo de las muestras de expectoración BAAR positivas, con revisión periódica hasta observar su crecimiento
- 4) Realizará la tinción para bacilos ácido alcohol resistente (BAAR)
- 5) Realizará ensayos de susceptibilidad a antifímicos de primera línea (estreptomycin, rifampicina, isoniazida, etambutol y pirazinamida)
- 6) Participará en la realización del perfil de multidrogo-resistencia de los aislados de MTB mediante la técnica de Azul de Alamar.
- 7) Realizará la prueba de sensibilidad al NAP que permite la identificación presuntiva de MTB
- 8) Llevará a cabo la extracción y purificación del DNA de las cepas aisladas para su posterior análisis con técnicas de biología molecular.
- 9) Entregará a la encargada del proyecto del IPICYT, el DNA de las cepas de MTB del cepario (2006-2008) y de los casos nuevos de 2009-2011.

Productos que generará

Informes y análisis de los resultados del proyecto.

K. QFB Beatriz Ramírez Flores, Química auxiliar del Laboratorio de Tuberculosis (LESP-SLP)

Actividades específicas

- 1) Participará en el aislamiento y cultivo de MTB de los pacientes con TBPA identificados en el trabajo de campo.
- 2) Organizará un respaldo del cepario y la genoteca, supervisando y asegurando la cadena fría para su mantenimiento.
- 3) Realizará la descontaminación y el cultivo de las muestras de expectoración BAAR positivas, con revisión periódica hasta observar su crecimiento
- 4) Realizará la tinción para bacilos ácido alcohol resistente (BAAR)
- 5) Realizará ensayos de susceptibilidad a antifímicos de primera línea (estreptomycin, rifampicina, isoniazida, etambutol y pirazinamida)
- 6) Participará en la realización del perfil de multidrogo-resistencia de los aislados de MTB mediante la técnica de Azul de Alamar.
- 7) Realizará la prueba de sensibilidad al NAP que permite la identificación presuntiva de MTB

8) Llevará a cabo la extracción y purificación del DNA de las cepas aisladas para su posterior análisis con técnicas de biología molecular.

Productos que generará

Informes y análisis de los resultados del proyecto.

ANEXO 3
PROGRAMA DE VIGILANCIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS

PROGRAMA DE VIGILANCIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS

Propuesto a los Servicios de Salud de San Luis Potosí

Rubén López-Revilla¹, Estela López-Rocha^{1,2} y Julio Juárez-Álvarez^{1,2}

¹Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT)

²Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí

Introducción

La elaboración de este documento fue acordada en la reunión de trabajo celebrada en julio de 2012 en la Dirección de Políticas y Calidad en Salud de los Servicios de Salud Pública de San Luis Potosí para plantear la creación del Programa Estatal de Vigilancia Molecular de la Tuberculosis (PEVMTB).

El documento describe la situación de la epidemiología molecular de la TB en el estado, la organización y los beneficios esperados del PEVMTB.

Epidemiología molecular de la tuberculosis en San Luis Potosí

Características sociodemográficas y clínicas de la tuberculosis pulmonar (TBP)

1. Tasa de incidencia estatal en el periodo 2006-2010: 12.6 (casos por 100,000 habitantes).
 - a. Similar al promedio nacional.
 - b. Difiere en cada jurisdicción sanitaria (rango: 2.4-33.4, VI > V > IV > I > II > III).
 - c. Tres regiones de incidencia: baja (6.2, jurisdicciones I, II y III), intermedia (17.3, jurisdicciones IV y V), alta (33.4, jurisdicción VI).
2. Más prevalente en municipios marginados.
3. Predomina en jornaleros, desempleados y amas de casa; pobres, poco educados.
4. Diagnosticada tardíamente.
5. Principales enfermedades concomitantes:
 - a. Diabetes en las regiones de incidencia baja e intermedia.
 - b. Desnutrición y alcoholismo en la región de alta incidencia.

Espoligotipos, farmacorresistencia y transmisión reciente

1. En el estado circulan dos especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB):
 - a. *M. tuberculosis* (97.6% de los casos de TBP).
 - b. *M. bovis* (2.4% de los casos de TBP).
2. El CMTB tiene gran diversidad genética:
 - a. Índice de Nei, H = 0.91.
 - b. Índice de Simpson, S = 0.09.
3. Hay tres linajes de *M. tuberculosis*:
 - a. Linaje 4 (Euroamericano, 93.8%).
 - b. Linaje 1 (East-Asian-Indian, Manila, 4.3%).
 - c. Linaje 2 (East Asian, Beijing, 1.9%).
4. Los clústeres Euroamericanos predominantes son:

- a. SIT 53 (Ghana, 28.9%).
- b. SIT 42 (LAM, 6.0%).
5. Las cepas de *M. tuberculosis* son muy heterogéneas.
6. Los espoligoclústeres principales son ubicuos y comunes.
7. El clúster Beijing se localiza en la zona conurbada de la capital y en Tamazunchale.
8. El clúster *M. bovis* se localiza en comunidades rurales del sur.
9. Son resistentes a antifímicos el 10% y MDR el 4% de los aislados; la mayoría de la Huasteca.
10. La reactivación endógena contribuye a la epidemiología de la TBP más que la transmisión reciente.

Genotipificación VNTR y cadenas de transmisión reciente

1. Este es el primer estudio de la epidemiología molecular de la TBP que abarca todo un estado mexicano e identifica las cadenas de transmisión reciente.
2. Confirma que la reactivación endógena —no la transmisión reciente— es el factor principal de la epidemiología de la TBP, dado que:
 - a. La proporción de casos entre contactos en el periodo enero 2006 y abril de 2011 fue del 3.6%.
 - b. El índice de transmisión mutación (TMI), un indicador de transmisión reciente calculado mediante análisis de espoligoclústeres, es de 11%.
 - c. El diagnóstico es tardío (mediana de edad: 50 años).
3. MIRU-VNTR identifica cadenas de transmisión reciente sin contactos probados (sólo tres de las seis cadenas detectadas tenían contactos probados).
4. Parece estar emergiendo la cepa Beijing, implicada en dos de las seis cadenas de transmisión reciente.

Recomendaciones derivadas de los avances alcanzados

1. Diseñar y ejecutar intervenciones apropiadas para prevenir la reactivación endógena asociada a desnutrición y diabetes, incluyendo el diagnóstico de TB latente.
2. Establecer el cultivo y la genotipificación rutinaria de los aislados del CMTB en dos etapas (espoligotipificación → MIRU-VNTR) para:
 - a. Detectar oportunamente las cadenas de transmisión
 - b. Identificar las cepas emergentes
 - c. Trazar la evolución de los genotipos del CMTB circulantes en el estado
3. Reforzar la vigilancia, la epidemiología molecular y el seguimiento de la TB pulmonar y extrapulmonar por *M. bovis*.

Beneficios esperados del PEVMTB

El diseño del PEVMTB se basa en la organización y el impacto para controlar y prevenir la TB que han tenido los programas de epidemiología molecular en otros países. A continuación enumeramos los principales beneficios esperados del PEVMTB:

1. Identificación de los casos de TB implicados en cadenas de transmisión reciente y los debidos a reactivación endógena de infecciones latentes.

2. Identificación inmediata y control más rápido de los brotes de TB.
3. Mejoría sustancial de las estrategias y acciones de control y prevención diferencial para la reactivación endógena y la transmisión reciente.
4. Establecimiento de un mecanismo adicional para evaluar la situación epidemiológica de la TB y de los programas para abatirla.
5. La genotipificación rutinaria permitiría al LESP establecer los algoritmos necesarios para prevenir los falsos positivos debidos a:
 - a. Contaminación cruzada de los cultivos.
 - b. Errores en la recolección o identificación de los especímenes (que en EE UU representan 1-3% de los casos de TB reportados).

Organización del programa

Infraestructura y logística existente

El PEVMTB aprovecharía la infraestructura y logística establecidas y operantes para la Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis en el estado, es decir:

1. La detección y registro de los casos de tuberculosis,
2. La recolección y envío de las muestras al LESP según los criterios y definiciones operativas existentes, y
3. El cultivo y diagnóstico por PCR de los aislados del CMTB.

Actividades adicionales necesarias para la operación del PEVMTB

Las acciones necesarias para operar el PEVMTB representan continuar, con acciones adicionales mínimas, el proyecto “Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en el estado de San Luis Potosí” en el cual han colaborado exitosamente los Servicios de Salud Pública y el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del IPICYT (LBMP-IPICYT), del cual ha surgido esta propuesta.

Las tareas del PEVMTB, enumeradas a continuación, serían ejecutadas por el LESP, el Programa Estatal de Tuberculosis y el LBMP-IPICYT.

Tareas del Laboratorio Estatal de Salud Pública

1. Cubrir los gastos de materiales y reactivos para la genotipificación que realizaría el LBMP-IPICYT.
2. Extraer el DNA de los aislados del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) confirmados por PCR genérica:
 - a. De los casos de la Vigilancia Epidemiológica de TB pulmonar (como se hizo para el proyecto).
 - b. De los casos sospechosos de TB extrapulmonar (tarea de carga adicional mínima).

Como mencionamos en el informe del proyecto, prevemos que continúe la detección de unos 10 aislados del CMTB por mes. La extracción del DNA de este número de aislados no toma más de tres horas.

Actualmente el Laboratorio de Tuberculosis (LTB) del LESP cuenta con el equipo (propio y en préstamo por el IPICYT) y los analistas capacitados para esta tarea.

Esta tarea puede adaptarse al flujo de trabajo del LTB si se aprovechan los cortes mensuales de las resiembras para enviar los aislados al control de calidad

del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud.

Tareas del Programa Estatal de Tuberculosis (Subdirección de Epidemiología)

1. Revisión y rastreo epidemiológico de los casos de TB implicados en probables cadenas de transmisión reciente (i.e., cuyos aislados del CMTB compartan el mismo genotipo MIRU-VNTR), especialmente los que parezcan no tener vínculos epidemiológicos.
2. Revisión y rastreo epidemiológico de los casos de TB por *M. bovis* y la familia Beijing de *M. tuberculosis*:
 - a. *M. bovis* especialmente por su impacto como causante de formas de TB pulmonar, pero sobre todo extrapulmonar, entre los trabajadores de la cuenca lechera y sus familias.
 - b. La familia Beijing de *M. tuberculosis* por su alta transmisibilidad y virulencia, su tendencia a la farmacoresistencia y por su aparente emergencia en el territorio estatal.

Tareas del Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del IPICYT

1. Identificación de las especies, linajes y familias del CMTB mediante genotipificación de resolución media (por espoligotipos) a partir del DNA de todos los aislados recuperados en el LESP de los casos de TB pulmonar y extrapulmonar.
2. Identificación de las cadenas de transmisión reciente mediante genotipificación de alta resolución (MIRU-VNTR) de los grupos de aislados con espoligotipos idénticos (espoligoclústeres) que tengan vínculos geográficos o epidemiológicos.
3. Identificación de las cadenas de transmisión reciente por MIRU-VNTR en casos de brotes de TB pulmonar o extrapulmonar, en ausencia de espoligotipos y espoligoclústeres.
4. Administrar la base de datos con la información clínica, microbiológica, sociodemográfica y geográfica de los casos incluidos en el PEVMTB.

ANEXO 4
COPIA DEL ARTÍCULO PUBLICADO

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosí, México

Estela López-Rocha^{1,2}, Julio Juárez-Álvarez^{1,2}, Lina Riego-Ruiz¹, Leonor Enciso-Moreno³, Francisco Ortega-Aguilar², Julián Hernández-Nieto², José A Enciso-Moreno³ and Rubén López-Revilla^{1*}

Abstract

Background: Although epidemiologic and socioeconomic criteria and biomedical risk factors indicate high-priority for tuberculosis (TB) control in Mexico, molecular epidemiology studies of the disease in the country are scarce.

Methods: Complete sociodemographic and clinical data were obtained from 248 of the 432 pulmonary TB (PTB) cases confirmed from 2006 to 2010 on the population under epidemiological surveillance in the state of San Luis Potosí, México. From most PTB cases with complete data *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) isolates were recovered and their spoligotypes, lineages and families, geographic distribution and drug resistance determined.

Results: Pulmonary tuberculosis incidence ranged from 2.4 to 33.4 (cases per 100,000 inhabitants) in the six state sanitary jurisdictions that were grouped in regions of low (jurisdictions I-II-III), intermediate (jurisdictions IV-V) and high incidence (jurisdiction VI) with 6.2, 17.3 and 33.4 rates, respectively. Most patients were poor, 50-years-median-age males and housewives. Among the 237 MTC spoligotyped isolates, 232 corresponded to *M. tuberculosis* (104 spoligotypes in 24 clusters) and five to *M. bovis*. The predominant Euro-American lineage was distributed all over the state, the East-Asian lineage (Beijing family) in the capital city, the Indo-Oceanic (Manila family) in eastern localities, and *M. bovis* in rural localities.

Conclusions: In San Luis Potosí TB affects mainly poor male adults and is caused by *M. tuberculosis* and to a minor extent by *M. bovis*. There is great genotypic diversity among *M. tuberculosis* strains, the Euro-American lineage being much more prevalent than the Indo-Oceanic and East-Asian lineages. The frequency of resistant strains is relatively low and not associated to any particular lineage.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, Spoligotypes, Molecular epidemiology, San Luis Potosí, Mexico, Social determinants of tuberculosis

Background

In 2007 the global incidence of tuberculosis (TB) was 139 (cases per 100,000 inhabitants), whereas in the Americas it was 36.8 [1], and in Mexico 13.5 [2]. In the same year the Mexican states with highest incidences were Baja California (35.3) and Tamaulipas (32.7) whereas the incidence was 12.2 in the state of San Luis Potosí [2], where this study was performed. Although the national TB incidence is relatively low, the weight of epidemiologic and socioeconomic criteria and biomedical

risk factors define Mexico as a high-priority country for TB control in the Americas [3].

TB reemergence, its association with the HIV-AIDS and diabetes epidemics [4,5] and the emergence and spread of MDR strains demand that epidemiological and genotyping data of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC) isolates be used to identify chains of transmission [6] and to differentiate TB cases due to endogenous reactivation [7].

Spoligotyping, based on the polymorphism of spacer sequences of the direct repeat region (DR) is used to differentiate MTC isolates [8]. Although less discriminatory than IS6110-based RFLP typing, it is a fast and cost-effective method allowing simultaneous analysis of numerous samples and generates contextual information

* Correspondence: rlopez@ipicyt.edu.mx

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí, SLP, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

on epidemiologically relevant MTC members [9]. Spoligotyping also identifies *M. bovis* strains, which usually carry few IS6110 copies [10].

The Euro-American lineage of *M. tuberculosis* predominates in Mexico [11], where some areas also have high frequencies of the Indo-Oceanic lineage [12]. In Mexico *M. bovis* also appears to be a relevant cause of pulmonary TB (PTB) in humans [13,14], and the Beijing family of the *M. tuberculosis* East-Asian lineage has been mentioned in a recent paper [5].

In this work we analyze the epidemiology, geographic distribution, lineages, families and drug resistance patterns of the MTC strains isolated from PTB cases in the state of San Luis Potosí, Mexico.

Methods

Territory and population

The state of San Luis Potosí, located in North-Central Mexico, is divided in 58 municipalities and six sanitary districts designated as jurisdictions I, II, III, IV, V and VI (Table 1). From January 2006 to March 2010, 1339 PTB cases were confirmed in the population submitted to passive epidemiologic surveillance (patients 15-years-old or older with productive cough for more than two weeks and positive acid-fast bacilli smear) and included in a DOT program whose scheme and drugs were provided and supervised by the State Tuberculosis Program, as defined by the Mexican Standard for Tuberculosis Prevention and Control [15]. Clinical information was elicited by medical personnel of dedicated brigades of the State TB Program and recorded in the National Epidemiologic Surveillance Platform. PTB incidence rates calculated from these cases were normalized for the population projected for 2010 [16] and complete sociodemographic and clinical data (name, sex, age, place of residence, occupation, formal education, previous TB history, contact with TB cases, concomitant disease and acid-fast bacilli smear) were collected from 248 cases (Figure 1).

Alcoholism was defined as a behavior disorder indicated by a rank > 8 in the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) [17], and malnutrition by a body mass index < 18.5 [18]. Diabetes mellitus was defined by blood glucose levels > 126 mg/dl in fasting samples or > 200 mg/dl in random samples [19].

As indicator of socioeconomic level, the marginalization degree—a continuous integrative measure of the fraction of the population lacking access to goods and services essential for the development of basic capabilities—was stratified into five discrete indexes: very high, high, medium, low and very low [20]. The Ethics and Research Committee of the San Luis Potosí State Health Services approved the study.

Culture and drug susceptibility of the MTC isolates

Sputum specimens were decontaminated with the Petroff method and simultaneously inoculated in the VersaTREK Myco System (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH) and Lowenstein-Jensen medium. Positive cultures were identified as MTC members with the Cobas Amplicor *M. tuberculosis* test (Roche Diagnostics, Grenzach-Whylen, Germany). MTC isolates were cryopreserved at -70°C in Middlebrook 7H9 medium (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH), recovered by reinoculation in the same medium and propagated in Lowenstein-Jensen medium from which colonies were picked and DNA extracted for genotyping.

Drug susceptibility was determined with the MYCO TB Susceptibility Testing kit (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH), in which a standard dilution of each isolate was inoculated in Middlebrook 7H9 medium containing the drugs assayed at two concentrations: streptomycin 2 and 6 $\mu\text{g/ml}$; isoniazid 0.1 and 0.4 $\mu\text{g/ml}$; rifampicin 5 and 1 $\mu\text{g/ml}$; ethambutol 5 and 8 $\mu\text{g/ml}$. Each test was controlled with the *M. tuberculosis* H37Rv sensitive strain and the ATCC 35820, 35822, 35837 and 35838 strains as controls for streptomycin-, isoniazid-,

Table 1 Population density, PTB incidence and MTC isolates per sanitary jurisdiction (January 2006 to March 2010)

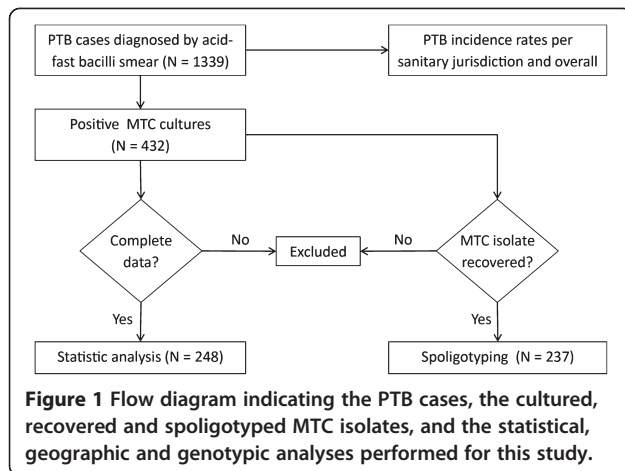
Name	Sanitary jurisdiction				Incidence rates and isolates analyzed*		
	Municipalities	Area (km ²)	Inhabitants	Inhabitants/km ²	Cases (%)†	Incidence rate‡	MTC isolates (%)§
I	2	1,724.1	1,054,522	611.6	352 (26.3)	7.9	39 (16.5)
II	11	21,757.9	216,348	9.9	28 (2.1)	3.0	8 (3.4)
III	13	13,447.0	273,705	20.4	28 (2.1)	2.4	3 (1.3)
IV	12	12,410.1	239,800	19.3	122 (9.1)	12.0	39 (16.5)
V	9	8,900.0	372,945	41.9	329 (24.6)	20.8	53 (22.4)
VI	11	2,306.8	338,193	146.6	480 (35.8)	33.4	95 (40.1)
Total	58	60,545.9	2,495,513	41.2	1339 (100.0)	12.6	237 (100.0)

*MTC, *Mycobacterium tuberculosis* complex.

†PTB cases confirmed by positive acid-fast bacilli smear.

‡PTB cases per 100,000 inhabitants.

§MTC cultures recovered and analyzed by spoligotyping.



ethambutol-, and rifampicin-resistance, respectively. To validate each assay, resistant cultures were compared with drug-free controls.

Spoligotyping

From 432 MTC strains isolated at the Public Health State Laboratory, 237 (54.9%) were sampled by convenience (Figure 1): 39 from jurisdiction I, eight from jurisdiction II, three from jurisdiction III, 39 from jurisdiction IV, 53 from jurisdiction V and 95 from jurisdiction VI. Sample size was approximately proportional to the number of PTB cases recorded in each jurisdiction (Table 1). The MTC isolates selected were those maintained by subculture that yielded enough DNA for genotyping.

MTC DNA was extracted with the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method [21]. Spoligotyping was carried out according to the manufacturer's instructions with the Isogen kit which includes a nitrocellulose membrane with 43 immobilized spacer sequences of the direct repeat (DR) region (Life Science, Maarsse, Netherlands). The spacers were amplified using primers DRa (5'-GGTTTGGGTCTGACGAC-3') and DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3') [8]. *M. tuberculosis* H37Rv and CDC1551 and *M. bovis* BCG DNAs were used as positive controls. Hybridization of the PCR products was detected with the Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham International plc, Buckinghamshire, United Kingdom). Spoligotypes were identified with the online MIRU-VTRNplus application [22]. MTC lineages and families were assigned after identifying the best matches among genotypes from the internal reference database with a categorical coefficient of 1.7. For additional tree-based identification, a dendrogram of spoligotype patterns was generated using the un-weighted pair group method with the neighbor-joining algorithm. Spoligotype patterns were also compared with those in the SITVIT2 database (Institut Pasteur de Guadeloupe, <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/>

SITVITDemo/) [23] and the Mbovis.org database (Veterinary Laboratories Agency, <http://www.mbovis.org/index.php>).

Statistical analysis and geographic distribution of MTC species, lineages and families

Statistical analysis was carried out with the SPSS 18 software (IBM Corporation, Somers, NY). The Pearson χ^2 test was used to assess differences in sociodemographic and clinical variables among geographic zones, lineages and drug resistance. Differences in the ages of cases among geographic zones were assessed by one-way ANOVA. P values ≤ 0.05 were considered statistically significant. PTB cases and MTC lineages and families were linked to geographical coordinates provided by the Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática at city and community scale [24]. MTC species, lineages and families were mapped using ArcMap 9.2 software (Esri, Redlands, CA).

Results

Pulmonary TB incidence per sanitary jurisdiction and region

From January 2006 to March 2010 the PTB incidence rate for the state of San Luis Potosí was 12.6, with remarkable differences per jurisdiction.

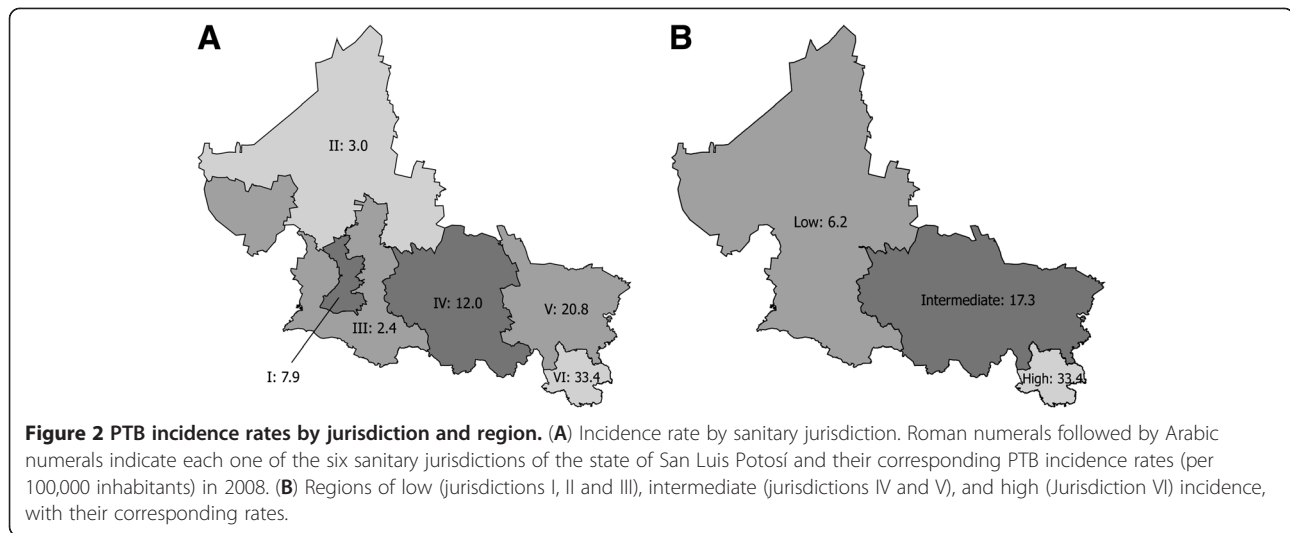
Jurisdictions I, II and III had lower incidence rates (7.9, 3.0, and 2.4, respectively); jurisdictions IV and V had intermediate rates (12.0 and 20.8, respectively), and jurisdiction VI, located in the southeastern end of the state, had the maximum rate (33.4). The combined incidence rate of the three jurisdictions with higher rates (IV, V and VI) was almost four times above that of jurisdictions with the lower rates (I, II and III) (Figure 2A).

In view of these differences we divided the state in three regions: the low incidence region (jurisdictions I, II and III with a combined rate of 6.2); the intermediate region (jurisdictions IV and V with a combined rate of 17.3); and the high incidence region (jurisdiction VI, with a rate of 33.4) (Figure 2B, Table 2).

In the high incidence region the median age of confirmed PTB cases (55 years) was ten years higher and significantly different ($P = 0.031$) to that of the low incidence region, and seven years higher than that of the intermediate incidence region. The proportion of patients living in rural communities increased significantly ($P < 0.001$) from the low (17.5%) to the intermediate (54.2%) and high incidence (86.3%) regions. The proportion of patients residing in municipalities of high marginalization also increased significantly ($P < 0.001$) from the low (19.0%) to the intermediate (21.7%) and high incidence (100.0%) regions.

Features of the PTB cases

The overall median age of PTB cases in the state was 50 years. Two thirds (62.5%) were men, one half (50.4%)



were unemployed and employed construction workers or farm workers, and one third (31.0%) were housewives. Nearly two thirds (61.7%) had either incomplete primary education or no formal education at all. More than half (58.1%) resided in rural localities and 53.2% in highly marginalized municipalities (Table 2).

Most cases (90.3%) did not have a previous history of TB and 75.0% declared not to have contacted other PTB cases. One half (51.2%) had a concomitant disease; the most frequent was diabetes (21.4%), followed by malnutrition (16.5%) and alcoholism (9.3%).

Diabetes-PTB association decreased significantly ($P = 0.047$) from the low (31.7%) to the intermediate (22.9%) and high incidence (13.7%) regions. In contrast, malnutrition-PTB association did not increase significantly ($P = 0.061$) from the high incidence region (6.3%) to the intermediate (18.1%) and low incidence (21.6%) regions. Alcoholism as a concomitant disease increased significantly ($P = 0.026$) from the low incidence region (1.6%) to the intermediate (8.4%) and high incidence (14.7%) regions. Marginalization is directly related to malnutrition and alcoholism and inversely related to diabetes since the first two concomitant diseases predominate in the high incidence region and diabetes in the low incidence region.

Lineages, families and clusters of the MTC isolates

Spoligotypes of the 237 isolates analyzed corresponded to two MTC species: 232 to *M. tuberculosis* (97.8%) and five to *M. bovis* (2.1%). Four lineages and 109 genotypes were identified (Figure 3). Fifty five genotypes (50.5%) had already been registered (53 in SpolDB4 and three in the Mbovis.org database; one of the five *M. bovis* genotypes had been registered in both databases).

Of the *M. tuberculosis* isolates, 221 (95.3%) had Euro-American lineage spoligotypes, among which 118 (53.4%) were SIT53, SIT42, SIT20, SIT221, SIT239, SIT50,

SIT787, SIT17 and SIT258, and 55 isolates (24.9%) had previously undetected (“orphan”) Euro-American genotypes. Eleven isolates had spoligotypes characteristic of other lineages and families: eight (3.4%) corresponded to the EAI-Manila family of the Indo-Oceanic lineage, and three isolates with identical spoligotypes (1.3%) to the Beijing family of the East-Asian lineage. Of the 109 genotypes identified, 85 (78.0%) appeared in a single isolate and the remaining 24 (22.0%) in clusters of two up to 68 isolates (Table 3).

One hundred and fifty two isolates (64.1%) were grouped in clusters. The two largest clusters were formed by 68 isolates of SIT53 genotype and 14 isolates of SIT42 genotype (Table 3).

Euro-American isolates were distributed all over the state (Figure 4A). Beijing isolates were located in the San Luis Potosí City metropolitan area (Figure 4B), EAI-Manila isolates in the easternmost jurisdictions V and VI, and *M. bovis* isolates in five southern rural communities from jurisdictions I, IV and V (Figure 4B).

Thus in the state of San Luis Potosí there is great genetic diversity in the circulating MTC strains, among which the Euro-American lineage predominates.

Lineages and families of drug-resistant MTC isolates

Twenty-three of the 237 spoligotyped isolates were resistant to one or more drugs: nine were resistant to isoniazid, two to rifampicin, two to other drugs, and 10 were MDR (Table 4).

Eleven of the 13 single-drug-resistant isolates were of the Euro-American lineage. Among the MDR isolates, nine were of the Euro-American lineage and one was of the Indo-Oceanic (EAI-Manila) lineage. One rifampicin-resistant isolate was of the EAI-Manila family and one isoniazid-resistant isolate was of the Beijing family.

Table 2 Sociodemographic and clinical variables of the PTB cases in the low-, intermediate- and high-incidence regions of the state

Variable	Incidence region*				P†
	Low (6.2)	Intermediate (17.3)	High (33.4)	Overall (12.6)	
Number of PTB cases	63	83	102	248	—
Sex					
Male	40 (63.5) ‡	47 (56.6)	68 (66.7)	155 (62.5)	0.670
Female	23 (36.5)	36 (43.4)	34 (33.3)	93 (37.5)	0.861
Median age					
Years (range)	45 (18–86)	48 (15–80)	55 (16–95)	50 (15–95)	0.031
Occupation					
Farm worker	15 (23.8)	25 (30.1)	43 (42.2)	83 (33.5)	0.116
Housewife	18 (28.6)	31 (37.3)	28 (27.5)	77 (31.0)	0.449
Unemployed	11 (17.5)	12 (14.5)	19 (18.6)	42 (16.9)	0.779
Employee	12 (19.0)	4 (4.8)	3 (2.9)	19 (7.7)	0.001
Independent	5 (7.9)	8 (9.6)	7 (6.9)	20 (8.1)	0.819
Another	2 (3.2)	3 (3.6)	2 (2.0)	7 (2.8)	0.779
Formal education					
None	13 (20.6)	21 (25.3)	36 (35.3)	70 (28.2)	0.522
Incomplete primary	21 (33.3)	29 (34.9)	33 (32.4)	83 (33.5)	0.638
Primary	16 (25.4)	21 (25.3)	20 (19.6)	57 (23.0)	0.951
Secondary	11 (17.5)	12 (14.5)	11 (10.8)	34 (13.7)	0.192
College	2 (3.2)	0 (0)	2 (2.0)	4 (1.6)	0.301
Habitat					
Rural	11 (17.5)	45 (54.2)	88 (86.3)	144 (58.1)	< 0.001
Urban	52 (82.5)	38 (45.8)	14 (13.7)	104 (41.9)	< 0.001
Marginalization index					
Very high	0 (0)	9 (10.8)	0 (0)	9 (3.6)	< 0.001
High	12 (19)	18 (21.7)	102 (100.0)	132 (53.2)	< 0.001
Medium	2 (3.2)	33 (39.8)	0 (0)	35 (14.1)	< 0.001
Low	1 (1.6)	23 (27.7)	0 (0)	24 (9.7)	< 0.001
Very low	48 (76.2)	0 (0)	0 (0)	48 (19.4)	< 0.001
Previous history of TB					
No	59 (93.7)	75 (90.4)	90 (88.2)	224 (90.3)	0.951
Yes	4 (6.3)	8 (9.6)	12 (11.8)	24 (9.7)	0.549
Contact with TB cases					
Yes	8 (12.7)	24 (28.9)	29 (28.4)	61 (24.6)	0.086
No	55 (87.3)	59 (71.1)	73 (28.4)	187 (75.4)	0.449
Concomitant disease					
None	34 (54.0)	37 (44.6)	50 (49.0)	121 (48.8)	0.741
Diabetes	20 (31.7)	19 (22.9)	14 (13.7)	53 (21.4)	0.047
Malnutrition	4 (6.3)	15 (18.1)	22 (21.6)	41 (16.5)	0.061
Alcoholism	1 (1.6)	7 (8.4)	15 (14.7)	23 (9.3)	0.026
HIV-AIDS	4 (6.3)	1 (1.2)	0 (0)	5 (2.0)	0.017
Other	0 (0)	4 (4.8)	1 (1.0)	5 (2.0)	0.082

Table 2 Sociodemographic and clinical variables of the PTB cases in the low-, intermediate- and high-incidence regions of the state (Continued)

Acid-fast bacilli smear					
Positive	56 (88.9)	78 (94.0)	100 (98.0)	234 (94.4)	0.016
Negative	7 (11.1)	5 (6.0)	2 (2.0)	14 (5.6)	0.584

*Number of cases per 100,000 inhabitants in parenthesis.

† χ^2 . One-way ANOVA, for age difference.

‡Numbers in parenthesis are percentages between variable categories, except in the median age where they are ranges.

Thirteen single drug-resistant and eight MDR isolates came from jurisdictions V and VI.

In summary, 9.7% of the isolates were resistant to one or more drugs and 4.2% were MDR; 3.8% were resistant only to isoniazid, 0.8% only to rifampicin and 0.8% to other drugs. Although most (84.6%) of the single drug-resistant isolates and 90% of the MDR ones were of the Euro-American lineage, association between drug resistance of any kind with the lineage or family of the isolates was not significant ($P = 0.653$).

Discussion

Low socioeconomic status, a TB determinant, includes risk factors such as food insecurity, poor housing and cultural, financial and geographic barriers for access to health services [25]. We confirmed that in San Luis Potosí PTB incidence correlates with low socioeconomic status since nearly two thirds of the patients resided in rural communities and more than half of them lived in highly marginalized municipalities.

Overall PTB incidence in the state (12.6) is remarkably different to that of each sanitary jurisdiction and led us to divide the state in three incidence regions (Figure 2). The low incidence region comprises jurisdictions I, II and III; the intermediate incidence region comprises jurisdictions IV and V. The high incidence region corresponds to jurisdiction VI; located in the southeastern part of the state, it is a tropical, predominantly rural and highly marginalized area, with 48% of indigenous population [21] and a population density 1.5 higher than that of the other jurisdictions combined, except for jurisdiction I, where the capital city is located [16].

Marginalization indexes differentiate municipalities by the impact of variables threatening life quality such as house overcrowding, low educational level and lack of electricity, running water and sanitary services [20]. In San Luis Potosí we confirmed that regional TB incidence correlates with the socioeconomic gradient, as is known to occur within countries and within communities, the poorest ones being affected most [26].

Although residents of urban areas are believed to be at higher risk of TB [25], most of the cases in the high incidence region reside in rural communities. This finding may be due to risk factors such as overcrowding, indoor

pollution, and poor ventilation in the rural communities affected. Marginalization is directly related to the incidence of malnutrition and alcoholism and inversely related to the incidence of diabetes since the first two concomitant diseases predominate in the high incidence region and diabetes in the low incidence region.

Sociodemographic and clinical variables in the low incidence region are similar to those in Monterrey and Acapulco [11,12], two Mexican cities of relatively low marginalization. In contrast, such variables in the high incidence region resemble more those of highly marginal rural regions of the Mexican state of Chiapas [27] where the average age of PTB cases is around 40 years, whereas in the high incidence region of San Luis Potosí it is close to 53 years. Both the transmission-mutation index derived from the spoligoforest analysis and the transmission chains identified by MIRU-VNTR genotyping indicate that recent transmission contributes marginally to the epidemiology of TB (E. López-Rocha et al., manuscript in preparation), whereas the advanced age of the cases and the high proportion of positive acid-fast bacilli smears (94.4%) indicates delayed disease detection. These findings support the notion that in San Luis Potosí endogenous reactivation contributes to TB epidemiology much more than recent transmission [28].

One tenth of the MTC isolates in San Luis Potosí are resistant to one or more drugs; 4.2% are MDR, a proportion below the national average of 5.8% [29] and lower than that of the American continent (7.2%) [3]. No statistically significant association of drug resistance and MTC lineage was found.

Most of the spoligotyped MTC isolates corresponded to *M. tuberculosis* and only 2.1% to *M. bovis*. *M. tuberculosis* isolates had 104 different genotypes among which only 52 (50.0%) had been registered in SpolDB4, and correspond to three lineages: Euro-American, Indo-Oceanic and East-Asian. A comprehensive study of MTC genotypes based on the analysis of large sequence polymorphisms found that Euro-American is the predominant *M. tuberculosis* lineage in Latin America [30]. The same lineage has been shown to be prevalent in the Mexican cities of Orizaba [5] and Monterrey [11], and we also found it to be the most prevalent in San Luis Potosí (95.3%) with SIT53, SIT42, SIT20, SIT221, SIT239, SIT50, SIT787, SIT17 and SIT258 as its main genotypes.

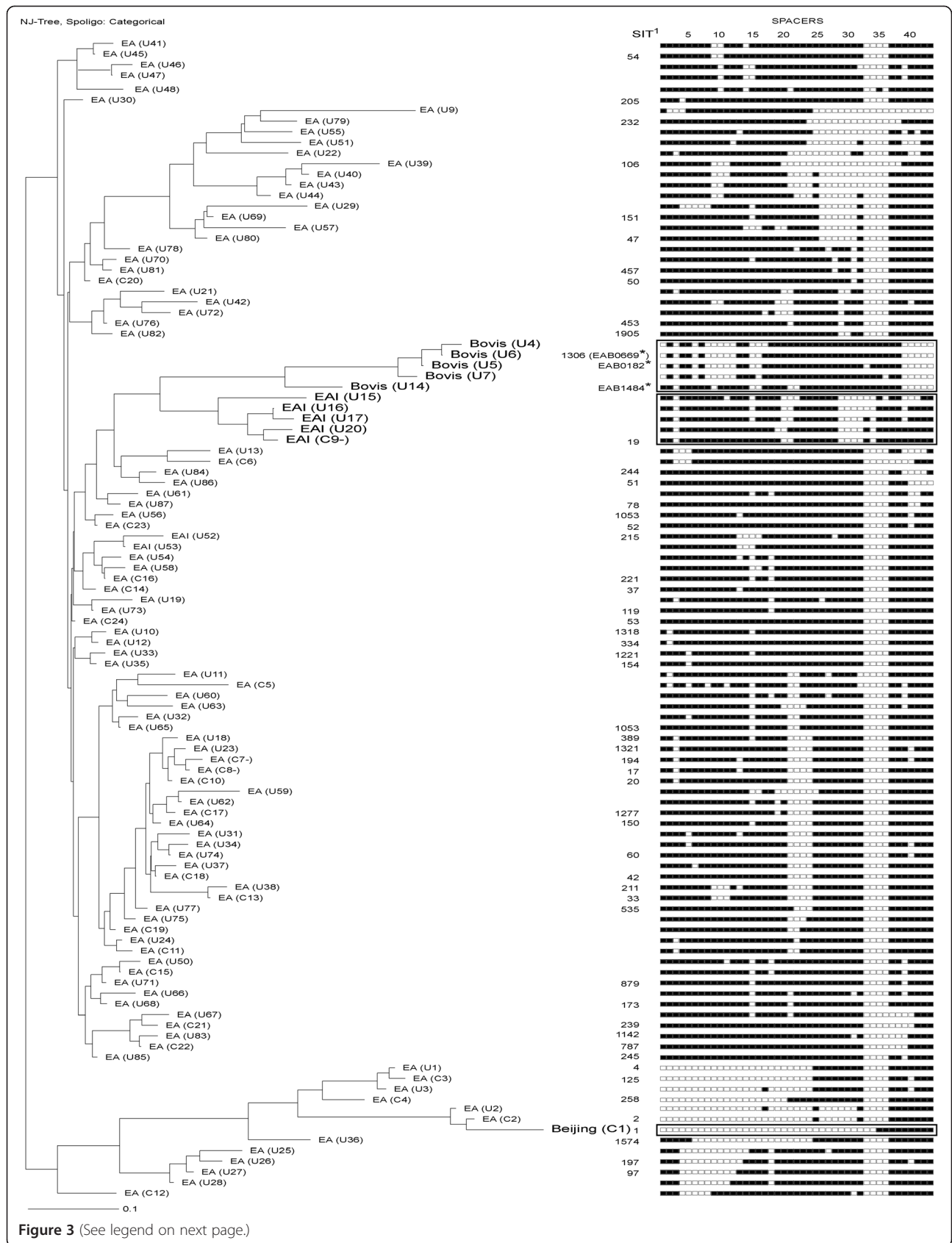
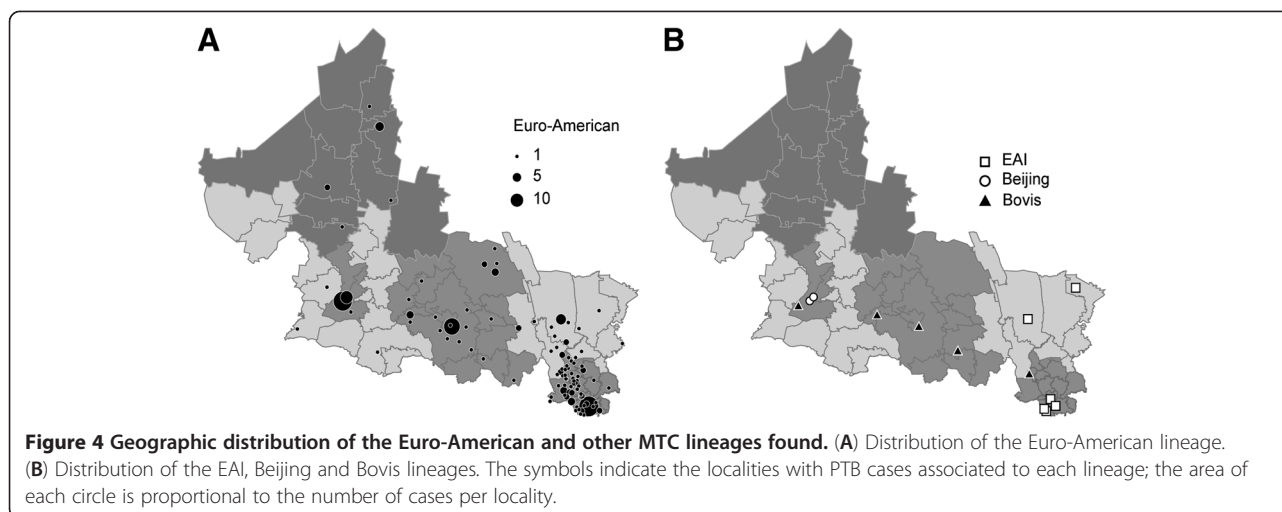


Figure 3 (See legend on next page.)



transmission events. SIT1, the second most frequent genotype in SpolDB4 [23], is ubiquitous—it has been identified in 29 countries and eight geographic areas—, epidemic (propagation index = 44.2), highly virulent [34] and appears to have selective advantages over other genotypes [35]. Only one Mexican PTB case by a Beijing strain from Orizaba, Veracruz, has been published [5]. Although the presence of this genotype in San Luis Potosí is worrying, its low frequency suggests that up to now its transmission is negligible.

The genetic diversity of the MTC appears to be geographically structured [30], since some strains preferably infect certain human populations and the association between pathogens and their hosts appear to be stable [36]. These data led to the notion that the worldwide TB pandemic is the sum of genetically different outbreaks [23]. Since the Euro-American lineage is distributed all over the state, the Beijing family is limited to the capital metropolitan area and the EAI-Manila family to the eastern part of the state, the TB epidemic in San Luis Potosí may be interpreted as a part of the wider TB epidemic in Latin America, with an outbreak of the EAI lineage and some Beijing cases.

All our five *M. bovis* isolates have different spoligotypes and come from rural communities located in the dairy region of the state. The prevalence of human TB of bovine origin in San Luis Potosí may be much higher

than 2.1% since bovine TB has been eradicated from only one Mexican state [37], and all the MTC isolates recovered for this study were initially cultured in Lowenstein-Jensen medium, more appropriate for *M. tuberculosis* than for *M. bovis* [38]. Therefore, the surveillance of human TB caused by *M. bovis* must be reinforced in the state health program.

The MTC strains included in this study were only those that were kept and recovered at the Public Health State Laboratory, where most state TB cases are concentrated. Although scarce, cases from individuals affiliated to the Mexican Social Security Institute or other organizations may have been overlooked. On the other hand, minor mistakes in the assignment of MTC lineages and families may have occurred, since the dendrogram-based similarities used by us to identify the isolates are known to be 94.1% accurate [39].

The prevalence of human TB due to *M. bovis* correlates with TB prevalence in cattle, and most human cases are related to consumption or handling of contaminated dairy products [40]. Although the prevalence of human TB of bovine origin in Mexico is unknown, 5.3% of the MTC strains isolated from sputum samples of PTB cases in a zone endemic for bovine TB in the Mexican state of Querétaro had *M. bovis* spoligotypes [13]. In the same endemic zone a study on asymptomatic farm workers identified *M. bovis* spoligotypes in 10.8% of

Table 4 Lineages of the drug-resistant MTC isolates

Lineage	Single-drug resistance			MDR	Total
	Isoniazid	Rifampicin	Other drugs*		
Euro-American	8 (3.4%)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	9 (3.8%)	20 (8.4%)
Indo-Oceanic (EAI)	0	1 (0.4%)	0	1 (0.4%)	2 (0.8%)
East-Asian (Beijing)	1 (0.4%)	0	0	0	1 (0.4%)
Total	9 (3.8)	2 (0.8%)	2 (0.8%)	10 (4.2%)	23 (9.7%)

*Isolates resistant to one first line drug other than isoniazid or rifampicin.

sputum and 5.3% of urine samples [14]. Other population studies in Mexico found *M. bovis* spoligotype frequencies of 0.6% in Monterrey [11] and 0.4% in Acapulco [12].

Conclusions

This is the first study on the molecular epidemiology of TB which covers a complete state in Mexico. In the state of San Luis Potosí, PTB incidence correlates with low socioeconomic status and the prevalent MTC strains show high genetic diversity and appear to be part of the wider TB epidemic in Latin America. Our findings show the need to implement TB control plans adapted to each incidence region in the state, including routine monitoring of the circulating MTC genotypes and reinforcing *M. bovis* surveillance.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LRR, RLR, AE and ELR conceived and designed the study. ELR participated in the research grant application and molecular typing, LE in molecular typing, FOA and JHN in culturing and drug-susceptibility testing of the MTC isolates, and JJA in epidemiological and molecular data gathering and analysis. ELR, JJA and RLR prepared the first draft of the manuscript. All authors read the manuscript, participated in its editing and approved the final version.

Acknowledgments

We deeply acknowledge the support and collaboration of the Epidemiology Subdirection, TB Program, Public Health Laboratory and the Education and Research Subdirection of the San Luis Potosí Health Services. The study was partially financed by a grant from the CONACYT-San Luis Potosí Fund (FMSLP-2008-C02-107371) awarded to LRR and a CONACYT doctoral fellowship awarded to ELR. We also thank the excellent technical help of Mireya Sánchez-Garza from the Molecular Biology Division of Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Author details

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí, SLP, Mexico. ²Laboratorio Estatal de Salud Pública, Servicios de Salud del estado de San Luis Potosí, Begonias 180, 78399 San Luis Potosí, SLP, Mexico. ³Unidad de Investigación Médica de Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Interior Alameda 45, 98000 Zacatecas, Zac, Mexico.

Received: 27 November 2012 Accepted: 19 April 2013

Published: 1 May 2013

References

- World Health Organization: *Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing*. Geneva, Switzerland: WHO; 2009.
- Tuberculosis in Mexico [in Spanish]*. [http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/2008_PDF/sem14.pdf]
- Panamerican Health Organization: *Tuberculosis in the Americas. 2008 Regional Report [in Spanish]*. Washington, DC: The Organization; 2008.
- Ponce-De-Leon A, García-García Md Mde L, García-Sancho MC, Gomez-Perez FJ, Valdespino-Gomez JL, Olaiz-Fernandez G, Rojas R, Ferreyra-Reyes L, Cano-Arellano B, Bobadilla M: **Tuberculosis and diabetes in southern Mexico**. *Diabetes Care* 2004, **27**:1584–1590.
- Jimenez-Corona ME, García-García L, Leon AP, Bobadilla-del Valle M, Torres M, Canizales-Quintero S, Palacios-Merino C, Molina-Hernandez S, Martinez-Gamboa RA, Juarez-Sandino L, et al: **Research on conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Orizaba, Veracruz, 1995–2008 [in Spanish]**. *Salud Publica Mex* 2009, **51**(Suppl 3):S470–S478.
- van der Spuy GD, Warren RM, Richardson M, Beyers N, Behr MA, van Helden PD: **Use of genetic distance as a measure of ongoing transmission of Mycobacterium tuberculosis**. *J Clin Microbiol* 2003, **41**:5640–5644.
- van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD: **Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment**. *N Engl J Med* 1999, **341**:1174–1179.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J: **Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology**. *J Clin Microbiol* 1997, **35**:907–914.
- Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Dang DA, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, et al: **Snapshot of moving and expanding clones of Mycobacterium tuberculosis and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study**. *J Clin Microbiol* 2003, **41**:1963–1970.
- van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD: **Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis**. *J Clin Microbiol* 1993, **31**:1987–1995.
- Molina-Torres CA, Moreno-Torres E, Ocampo-Candiani J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, Rastogi N, Welsh O, Vera-Cabrera L: **Mycobacterium tuberculosis spoligotypes in Monterrey, Mexico**. *J Clin Microbiol* 2010, **48**:448–455.
- Nava-Aguilera E, Lopez-Vidal Y, Harris E, Morales-Perez A, Mitchell S, Flores-Moreno M, Villegas-Arrizon A, Legorreta-Soberanis J, Ledogar R, Andersson N: **Clustering of Mycobacterium tuberculosis cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors**. *Clin Dev Immunol* 2011, **2011**:408375.
- Perez-Guerrero L, Milian-Suazo F, Arriaga-Diaz C, Romero-Torres C, Escartin-Chavez M: **Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico [in Spanish]**. *Salud Publica Mex* 2008, **50**:286–291.
- Milian-Suazo F, Perez-Guerrero L, Arriaga-Diaz C, Escartin-Chavez M: **Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by Mycobacterium bovis in Mexico**. *Prev Vet Med* 2010, **97**:37–44.
- Ministry of Health: **Modification to the Official Mexican Standard NOM-006-SSA2-1993, for the prevention and control of tuberculosis in primary health attention [in Spanish]**. In *Book Modification to the Official Mexican Standard NOM-006-SSA2-1993, for the prevention and control of tuberculosis in primary health attention [in Spanish]*. Mexico City: The Ministry; 2005:1–12.
- Mexico Population Projections: 2005–2030 [in Spanish]*. [http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/Resource/136/1/images/municipales.xls]
- Babor T, Higgins-Biddle J, Saunders J, Monteiro M: *The alcohol use disorders identification test. Guidelines for Use in Primary Care*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
- World Health Organization: *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation*. Geneva, Switzerland: WHO; 2000.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**. *Diabetes Care* 2000, **23**(Suppl 1):S4–S19.
- Methodology for Estimation of the Marginalization Index [in Spanish]*. [http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=126&Itemid=293]
- Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL: **Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction**. *J Clin Microbiol* 2003, **41**:2323–2329.
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harsen D: **MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria**. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(Suppl):W326–W331.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuno L, Arora J, Baumanis V, et al: **Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology**. *BMC Microbiol* 2006, **6**:23.
- Vectorial Data Set of the National Geostatistical Frame [in Spanish]*. [http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/marco_geoestadistico.aspx]
- Hargreaves JR, Boccia D, Evans CA, Adato M, Petticrew M, Porter JD: **The social determinants of tuberculosis: from evidence to action**. *Am J Public Health* 2011, **101**:654–662.
- Lonnroth K, Jaramillo E, Williams BG, Dye C, Ravignone M: **Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants**. *Soc Sci Med* 2009, **68**:2240–2246.

27. Sanchez-Perez HJ, Diaz-Vazquez A, Najera-Ortiz JC, Balandrano S, Martin-Mateo M: **Multidrug-resistant pulmonary tuberculosis in Los Altos, Selva and Norte regions, Chiapas, Mexico.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, **14**:34–39.
28. Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, de Haas PE, van Soolingen D: **Transmission of Mycobacterium tuberculosis depending on the age and sex of source cases.** *Am J Epidemiol* 2001, **154**:934–943.
29. World Health Organization: *Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World.* Geneva: The Organization; 2008.
30. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, *et al*: **Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:2869–2873.
31. Douglas JT, Qian L, Montoya JC, Musser JM, Van Embden JD, Van Soolingen D, Kremer K: **Characterization of the Manila family of Mycobacterium tuberculosis.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:2723–2726.
32. Martinez-Gamboa A, Ponce-de-Leon A, Galindo-Fraga A, Bobadilla-del-Valle M, Kato-Maeda M, Robertson BD, Young DB, Small PM, Sifuentes-Osornio J: **Molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis strains with an intact pks15/1 gene in a rural community of Mexico.** *Arch Med Res* 2008, **39**:809–814.
33. Schurz WL: **The Manila galleon and California.** *Southwestern Historical Quarterly* 1917, **21**:107–126.
34. Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CR, Kidd M, Beyers N, Victor TC, van Helden PD, Warren RM: **A recently evolved sublineage of the Mycobacterium tuberculosis Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:1483–1490.
35. Cowley D, Govender D, February B, Wolfe M, Steyn L, Evans J, Wilkinson RJ, Nicol MP: **Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis in Cape Town, South Africa.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**:1252–1259.
36. Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM: **Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:4871–4876.
37. *Strategic Plan for the Campaign against the Bovine Tuberculosis in Mexico, 2008–2012 [in Spanish].* [<http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=2183&IdUrl=4809>]
38. Comer LA, Nicolacopoulos C: **Comparison of media used for the primary isolation of Mycobacterium bovis by veterinary and medical diagnostic laboratories.** *Aust Vet J* 1988, **65**:202–205.
39. Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S: **Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**:2692–2699.
40. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX: **Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries.** *Emerg Infect Dis* 1998, **4**:59–70.

doi:10.1186/1756-0500-6-172

Cite this article as: López-Rocha *et al.*: Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosí, México. *BMC Research Notes* 2013 **6**:172.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

