

Diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* circulando en la jurisdicción V de Jalapa, Veracruz, México

Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* circulating in the jurisdiction V from Jalapa, Veracruz, Mexico

Betchaah Lefort¹, Damián Pérez-Martínez², Diana Viveros³ y Roberto Zenteno-Cuevas⁴

¹Maestría en Salud Pública. Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

²Doctorado en Ciencias de la Salud. Instituto de Ciencias de la Salud. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

³Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

⁴Instituto de Salud Pública. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

Los autores declaran la ausencia de conflicto de interés.

Financiamiento: Betchaah Lefort, fue una becaria de "Becas de Excelencia del gobierno de México para extranjeros, AMEXCID". Roberto Zenteno-Cuevas fue parcialmente apoyado por CONACyT-Proyecto de desarrollo científico para atender problemas nacionales No. 213712: Desarrollo de un sistema de vigilancia epidemiológico molecular de TBC.

Recibido: 3 de junio de 2021 / Aceptado: 13 de septiembre de 2021

Resumen

Antecedentes: El estado de Veracruz se ubica en el sureste de México y presenta una alta prevalencia de tuberculosis (TBC) y drogo resistencia. Sin embargo, la composición de los genotipos circulantes es poco conocida. **Objetivo:** Caracterizar la diversidad genética de la TBC en la jurisdicción sanitaria V del estado de Veracruz. **Métodos:** Estudio transversal realizado en aislados clínicos de pacientes con TBC residentes de la jurisdicción V. Se determinó la sensibilidad a medicamentos de primera línea. La genotipificación se realizó mediante espiligotipificación y MIRU-VNTR 15 loci. **Resultados:** Entre los 74 aislados analizados se observó resistencia a un fármaco en 44 (59%) aislados. Linaje L4 (EuroAmericano) se presentó en 73 aislados. Se identificaron cinco sublinajes; H (40%), T (22%), LAM (16%), X (13%) y U (7%). El 32% de los aislados se agrupó mediante su espiligotipo y 40% en 10 complejos clonales. **Conclusiones:** Es la primera descripción sobre la estructura genética de TBC en la región central de Veracruz. La diversidad de genotipos podría contribuir a su dispersión en la región. Esta información será útil para el desarrollo de intervenciones y reducir el impacto de TBC en la población.

Palabras clave: espiligotipo; genotipado; tuberculosis; Veracruz; México.

Abstract

Background: The state of Veracruz is placed in southeastern Mexico and has a high prevalence of tuberculosis (TB) and drug resistance. Nevertheless, the composition of circulating genotypes in the central region of the state is partially known. **Aim:** To characterize the genetic diversity of TB in the sanitary jurisdiction V of the state of Veracruz. **Methods:** A cross-sectional study was conducted among clinical isolates from patients with TB living in the jurisdiction V, in Jalapa Ver., Mexico. Sensitivity to first-line drugs was determined, and genotyping was performed by spoligotyping and MIRU-VNTR 15 loci. **Results:** Among the 74 isolates analyzed, resistance to one drug was observed in 44 isolates. L4 (EuroAmerican) was the major lineage identified. Five sublineages were the most abundant; H (40%), T (22%), LAM (16%), X (13%) and U (7%). Only 32% of the isolates were clustered by spoligotype and 40% were placed in ten clonal complexes. **Conclusions:** This is the first description of the genetic structure of TB in the central region of Veracruz. The diversity of genotypes could contribute to its dispersion. This information will be useful for the development of interventions to reduce the impact of TB in the population.

Keywords: spoligotype; genotyping; tuberculosis; Veracruz; Mexico.

Correspondencia a:

Roberto Zenteno-Cuevas
robzencue@gmail.com

Introducción

La tuberculosis (TBC) se mantiene como una de las enfermedades infectocontagiosas con más afectaciones al ser humano. Esta enfermedad, causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, se dispersa cuando un individuo infectado tose y libera gotas de saliva conteniendo la bacteria; es entonces cuando una persona que se mantiene en contacto cercano aspira la bacteria y puede posteriormente desarrollar la infección. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el año 2019, se reportaron cerca de 10 millones de nuevos casos de TBC, y 1,4 millones de muertos¹. En México para el año 2020 se reportaron cerca de 20.000 nuevos casos de TBC², cifra que ubica a México dentro de los cinco países en Latinoamérica con mayor número de casos. Por su parte, el estado de Veracruz, situado al sureste de México (Figura 1), reportó para el año 2020 una prevalencia de 16 por cada 100.000 hab., siendo uno de los estados que mayor número de casos de TBC reporta anualmente³.

El empleo de técnicas de genotipificación en *M. tuberculosis* tales como el espilogotipado y MIRU-VNTR, han ayudado a entender aspectos tales como la virulencia de ciertos linajes, tendencia a desarrollar resistencia a fármacos, identificación de la composición de los genotipos en diversas regiones y las rutas de transmisión de ciertos genotipos^{4,5}.

La información existente sobre los genotipos de *M. tuberculosis* circulantes en México, si bien es limitada, muestra la predominancia de L4 (EuroAmericano), en menor proporción los linajes L1 y L2, y además una importante diversidad de sublinajes circulantes de acuerdo

con las regiones geográficas estudiadas⁶⁻¹⁶. Los estudios realizados en el estado de Veracruz, si bien confirman el mismo patrón observado a nivel nacional, con una predominancia de L4, y diversidad en los genotipos presentes, se aprecian variaciones importantes de acuerdo a las regiones del norte, centro y sur del estado¹⁵⁻¹⁷. En este sentido, no existe información detallada sobre los genotipos de *M. tuberculosis* presentes únicamente en la jurisdicción V, ubicada en la zona central del estado. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es el de genotipificar, mediante espilogotipado y MIRU-VNTR 15 loci, los aislados de *M. tuberculosis* circulantes en la jurisdicción V de Jalapa, Veracruz, y caracterizar los genotipos y linajes presentes.

Material y Método

Recuperación de muestras, obtención de aislamiento clínico y purificación de ADN

Las muestras clínicas de esputo con baciloscopia positiva se recuperaron durante el período de agosto de 2015 a mayo de 2021, como producto de una selección aleatoria, y fueron proporcionadas por el personal médico del Programa de Mycobacteriosis de la jurisdicción sanitaria V. Esta jurisdicción incluye 33 municipios, distribuidos en más de 5.000 km², da servicio a un cerca de un millón de habitantes y presenta una tasa de TBC de 6 por 100.000 hab. (Figura 1).

Las muestras de esputo se descontaminaron usando el método de Petroff¹⁸, y el aislamiento primario se realizó en medio sólido Lowenstein-Jensen. A partir del aislado previamente obtenido se tomó una asada de bacteria y ésta se empleó para determinar la sensibilidad a fármacos de primera línea; estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, empleando un medio de cultivo líquido en un proceso automatizado, BACTEC MGIT 960[®] (Becton-Dickinson, Diagnostic Instrument System, Inc.). Por medio del resumen clínico del paciente y previo a su autorización, se recuperaron algunas variables tales como edad, género, comorbilidades y tipo de tratamiento. No se realizaron intervenciones físicas en el paciente y toda la información fue anonimizada y tratada como confidencial.

La purificación del ADN genómico se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Van Soelingen y cols.¹⁹. El ADN se disolvió en tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0) y cuantificó en un Nanodrop[™] 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). El ADN finalmente obtenido se almacenó a -20 °C hasta su empleo.

Espilogotipado, MIRU-VNTR, agrupamiento y árbol de mínima expansión

El espilogotipado se realizó por duplicado empleando el *kit* específico (Ocimum Biosolutions, Hyderabad, India)

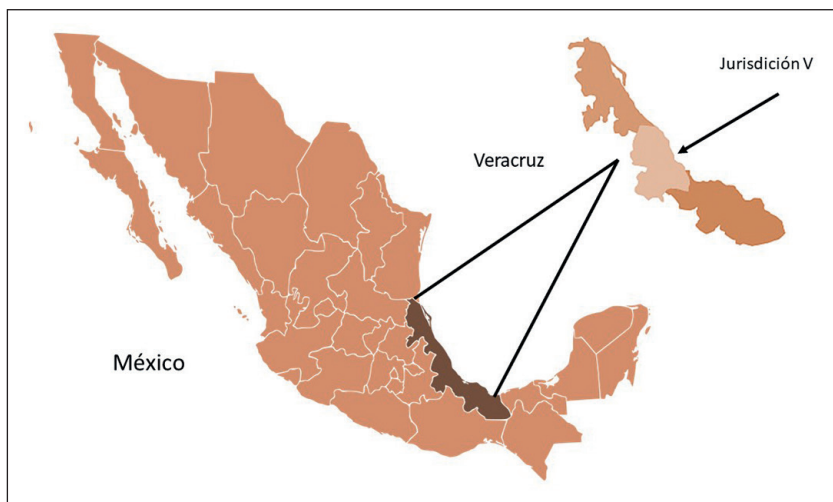


Figura 1. Ubicación geográfica de la jurisdicción V, de Jalapa, Veracruz, México.

y técnicas estándar^{20,21}. Se utilizó el ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG como controles. La asignación de tipo internacional de espoligotipo (*spoligotype international type-SIT*) y clados filogenéticos fueron de acuerdo a la plataforma SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>)²² y el módulo de similaridad de la plataforma en línea MIRU-VNTRplus^{23,24}. En aquellos aislados donde no se logró definir un linaje mediante su correspondiente espoligotipo, la asignación se realizó empleando redes bayesianas conformacionales (CBN), usando la herramienta en línea “TB-lineage”, siguiendo las instrucciones de los autores²⁵. La asignación final de linaje y sublinaje se realizó considerando las recomendaciones de Coll y cols., y Stucky y cols.^{26,27}.

Se realizó el análisis de MIRU-VNTR de 15 loci considerando a los pares de partidores (*primers*) y condiciones de amplificación de acuerdo a Supply y cols.²⁸, considerando para el desarrollo de la reacción de polimerasa en cadena (RPC) el empleo de una mezcla maestra (Promega, USA). El tamaño de los fragmentos de 15-loci MIRU-VNTR se estimó considerando un marcador de peso molecular de referencia de 100bp (Promega, USA). Los pesos moleculares de cada marcador fueron verificados de modo independiente por dos individuos, y el número de repeticiones de cada locus se calculó mediante la aplicación de tabla de conversión correspondiente. El análisis de los marcadores se realizó mediante la plataforma MIRU-VNTRplus, de acuerdo a las instrucciones de los autores^{23,24}. Se calculó el poder discriminatorio de cada locus, basado en el índice de diversidad de Hunter-Gaston, clasificándose de acuerdo a la escala; $> 0,6$, $0,3 < H < 0,6$ y $< 0,3$ como *alto*, *moderado* y *pobremente discriminatorio*, respectivamente²⁹.

La relación evolutiva entre los patrones de MIRU-VNTR observados en los aislados analizados se obtuvo mediante árboles de mínima expansión, (en inglés MST; *minimum spanning tree*). Para ello se empleó el módulo de cálculo del árbol de mínima expansión dentro de la aplicación web MIRU-VNTR plus²⁴.

Ambos procedimientos de genotipificación, espoligotipificación y MIRU-VNTR, se realizaron en el Laboratorio de Ecología y Salud del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana, tomando en consideración las medidas de bioseguridad establecidas en las normas y referencias nacionales.

Consideraciones éticas

Las muestras clínicas fueron tomadas como parte del proceso de diagnóstico rutinario del paciente; no se realizaron intervenciones físicas con los pacientes y toda la información recuperada fue considerada como confidencial. Se atendieron todas las regulaciones nacionales. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana (número de registro: CEI-ISP-R18/2020).

Resultados

Características demográficas de la población y perfiles de sensibilidad a fármacos

Se incluyeron en el análisis los cultivos positivos de *M. tuberculosis* correspondientes a 74 individuos. Con relación al sexo, 32 fueron hombres (43%). La edad media fue de 41 (± 16) años. De acuerdo con la situación laboral, el estar desempleado fue referido por 28 individuos (38%), seguido por labores domésticas en cinco individuos (7%). Ninguno de los pacientes mencionó haber consumido alcohol o tabaco. La comorbilidad más frecuente fue diabetes mellitus de tipo 2, presente en 12 personas (16%). Ocho individuos (11%) mencionaron haber tenido una infección tuberculosa previa y los 66 restantes (89%) fueron casos nuevos de TBC.

Los resultados del análisis de sensibilidad a los fármacos de primera línea mostraron que 30 aislados (41%) fueron sensibles y 44 (59%) presentaron resistencia al menos a un fármaco. Se observó resistencia a estreptomycin en siete aislados (9%), a isoniazida en 20 aislados (27%), a rifampicina en 20 (27%), a etambutol en nueve (12%) y a pirazinamida en 12 aislados (16%). Finalmente, se apreció resistencia simultánea contra isoniazida y rifampicina (TBC-MDR) en 17 aislados (23%), mientras que resistencia a todos los fármacos de primera línea se observó en siete aislados (9%).

Análisis de espoligotipado y agrupación

En los 74 aislados analizados se observaron 26 patrones de espoligotipo, 13 patrones se relacionaron con un SIT y un linaje previo, mientras que 13 patrones no se asociaron con un SIT, pero mediante la aplicación del sistema CBN fue posible asignar el linaje específico. El análisis de los genotipos evidenció la presencia en 73 cepas (98%) de un linaje L4 (Tabla 1). El análisis detallado de este linaje mostró la presencia de cinco sublinajes, el más abundante fue H (L4.1.2), incluyendo 29 aislados (39%), con siete espoligotipos. El sublinaje T (L4.8) incluyó dieciséis aislados (21%), con siete espoligotipos. El sublinaje LAM (L4.3) consideró 12 (16%) aislados, con cinco espoligotipos. El sublinaje X (L4.1.1) incluyó 10 cepas (13%) con cuatro espoligotipos. Por último, el sublinaje U (L4.4) mostró la menor frecuencia con cinco aislados (2%) compartiendo el mismo genotipo.

En los agrupamientos identificados por espoligotipado, 24 aislados (32%) se localizaron en seis *clusters* o grupos (Tabla 1). El sublinaje T incluyó el mayor número de aislados agrupados, con 13 (17%) cepas presentes en cuatro *clusters*, de los cuales el *cluster* con el SIT53, incluyó seis aislados (9%), por lo que fue el más abundante. Se identificaron además en este sublinaje dos *clusters* sin un SIT; el primero consideró tres aislados con el código octal 77007777760771 y el segundo dos aislados con el código

Tabla 1. Espoligotipo, SITs y sublinajes en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* presentes en la Jurisdicción V de Veracruz, México

| SIT | Sublinaje | n aislados (%) | Código Octal | Distribución global** | Distribución en México*** |
|----------------------|-----------|----------------|-----------------|---|---|
| X (L4.1.1) | | | | | |
| 3278* | X | 5 | 700076717760771 | ESP, MEX | VER* |
| .* | X | 3 | 777176777760771 | - | VER |
| - | X | 1 | 700077717770771 | - | VER |
| - | X | 1 | 700076703760771 | - | VER |
| H (4.1.2) | | | | | |
| 47* | H | 2 | 77777774020771 | BRA, FRA, MEX, DEU, BEL, MAR, PRT, JAM, SUR, POL, BGR, RUS, ETH, ARG, NLD, TUN, AUT, ITA, USA, CUB, SWE, ESP, GNB, NLD | NUE, GUE, JAL, GUA, BAJ, SIN, VER. |
| 50* | H | 7 | 77777777720771 | FRA, MEX, DEU, BEL, POL, RUS, ITA, DNK, TUR, BRA, ARG, DOM, AUT, USA, CUB, ESP, JPN, COL, PAN | NUE, GUE, SAN, JAL, EDO, BAJ, COL, PUE, VER. |
| 2111 | H | 1 | 70177777720771 | USA | - |
| 948 | H | 1 | 77777760020611 | USA, MEX, ITA, ESP, PER | - |
| 2642 | H | 1 | 77777774020611 | MEX. PRY | - |
| - | H | 1 | 776377760000731 | USA | - |
| - | H | 1 | 77301777720770 | - | - |
| LAM (4.3) | | | | | |
| 33 | LAM | 1 | 776177607760771 | BRA, FRA, BEL, ZAF, MAR, PRT, VEN, ITA, SAU, ARG, HND, ITA, USA, CUB.ESP, NLD, COL, PAN, NLD, PER, GMB, MOZ | NUE, GUE, SAN, JAL, SIN, VER |
| 376* | LAM | 2 | 376177607760771 | BEL, JAM.HND, USA, ESP, BRA, ZAF, VEN | - |
| 398 | LAM | 1 | 777777607760631 | BRA, CUB.USA, MEX, AUT, BEL, FRA | NUE, GUE, GUA, VER. |
| - | - | 1 | 540777607760771 | - | - |
| - | - | 1 | 670037607760771 | - | - |
| - | - | 1 | 677777607740001 | - | - |
| T (L4.7- 4.8) | | | | | |
| 37* | T3 | 2 | 777737777760771 | FRA, DEU, BEL, VEN, POL, RUS, LBY, DNK, SAU, BRA, SWE, SWE, ESP, USA, TUR, COL, GBR, IND, NLD, ITA, ZAF, BRA, JPN, DEU, AUT, ZAF, BEL, CHN, ETH, ITA, IRQ | SAN, VER |
| 53* | T1 | 6 | 77777777760771 | BRA, FRA, MEX, DEU, BEL, MAR, GUY, JAM, POL, RUS, ITA, LBY, DNK, ARG, HND, ZAF, SWE, DOM, TZA.TUN, PER, USA, IRN, CUB, TUR, ESP | NUE, GUE, SAN, JAL, EDO, BAJ, OAX, SIN, GUA, VER. |
| 291 | T | 1 | 77777767760771 | BRA, BEL, MEX, POL, ARG, CHN, AUS, ESP, IND, COL, ZWE, JPN, EGY, ITA, GEO, PER | - |
| .* | T | 3 | 77007777760771 | FRA | - |
| - | T | 1 | 000022017641771 | - | - |
| .* | T | 2 | 77763377760731 | - | - |
| - | T | 1 | 700037377770771 | - | - |
| U (L4.6.1) | | | | | |
| 46* | U | 5 | 777777770000000 | DNK, SAU, ETH, ARG, SWE, HND, MAR, MGD, AUS, USA, DEU, BRA, CZE, MEX, ITA | - |

SIT: *spoligotype international type*. *Aislados agrupados. **Obtenido de la plataforma SITVIT2. **COL: Colima. BAJ: Baja California. CDMX: Ciudad de México. EDO: Estado de México. GUE: Guerrero. JAL: Jalisco. NUE: Nuevo León. PUE: Puebla. SAN: San Luis Potosí. SIN: Sinaloa. TAM: Tamaulipas. VER: Veracruz. YUC: BY Yucatán.

octal 7776337760731. En segundo lugar, se observó al sublinaje H, con nueve cepas (12%), incluidas en dos grupos, el primero con siete aislados (9%) compartiendo el SIT50 y el segundo con dos aislados con el SIT47.

En tercera posición, se ubicó al sublinaje X el cual incluyó dos *clusters*, el primero considerado a cinco aislados con el SIT 3278, y el segundo a tres aislados huérfanos con el código octal 7771767760771. Por último, se observó el sublinaje U, el cual considero un grupo con cinco aislados que compartieron el SIT46.

Caracterización mediante MIRU-VNTR y MST

Se identificó una importante diversidad de patrones de MIRU-VNTR. La Figura 2 muestra el MST obtenido a partir del análisis de MIRU-VNTR 15 loci realizado. A pesar de que 44 aislados (60%) mostraron un patrón de MIRU-VNTR único, 30 aislados (40%) se lograron ubicar dentro de 10 complejos clonales (CC), lo que evidencia cierta relación evolutiva. Se identificaron cuatro CC conteniendo dos aislados (CC7, CC8, CC9 y CC10), tres con

tres aislados (CC4, CC5 y CC6), dos con cuatro (CC1y CC3) y el último, el más abundante, con cinco aislados (CC2). Se observó correspondencia entre algunos de los CC y los grupos definidos mediante espoligotipado. De esta manera, CC4 y CC5, incluyeron aislados con un sublinaje H y el SIT50. El CC2 incluyó dos aislados con un sublinaje X y el SIT3278. Finalmente, el CC3 incluyó tres aislados con un linaje U SIT46. Lo anterior demuestra, que existe por lo menos tres clonas de *M. tuberculosis* que se encuentran dispersándose activamente en la población de manera importante.

Finalmente, el índice de diversidad (HDGI) determinado en cada uno de los 15 loci de MIRU-VNTR analizados, (2165: ETRA, 1644: MIRU16, 2996: MIRU26, 3192: MIRU31, 2401: Mtub30, 802: MIRU40, 4156: QUB4156, 580: MIRU04, 960: MIRU10, 424: Mtub04, 2163b: QUB11b, 2059 MIRU20, 577 ETRC, 1955 Mtub21, y 4348 MIRU39), excedió por mucho el valor 0,6 *h*, con oscilaciones entre 0,85 y 0,95, evidenciando que fueron altamente discriminantes.

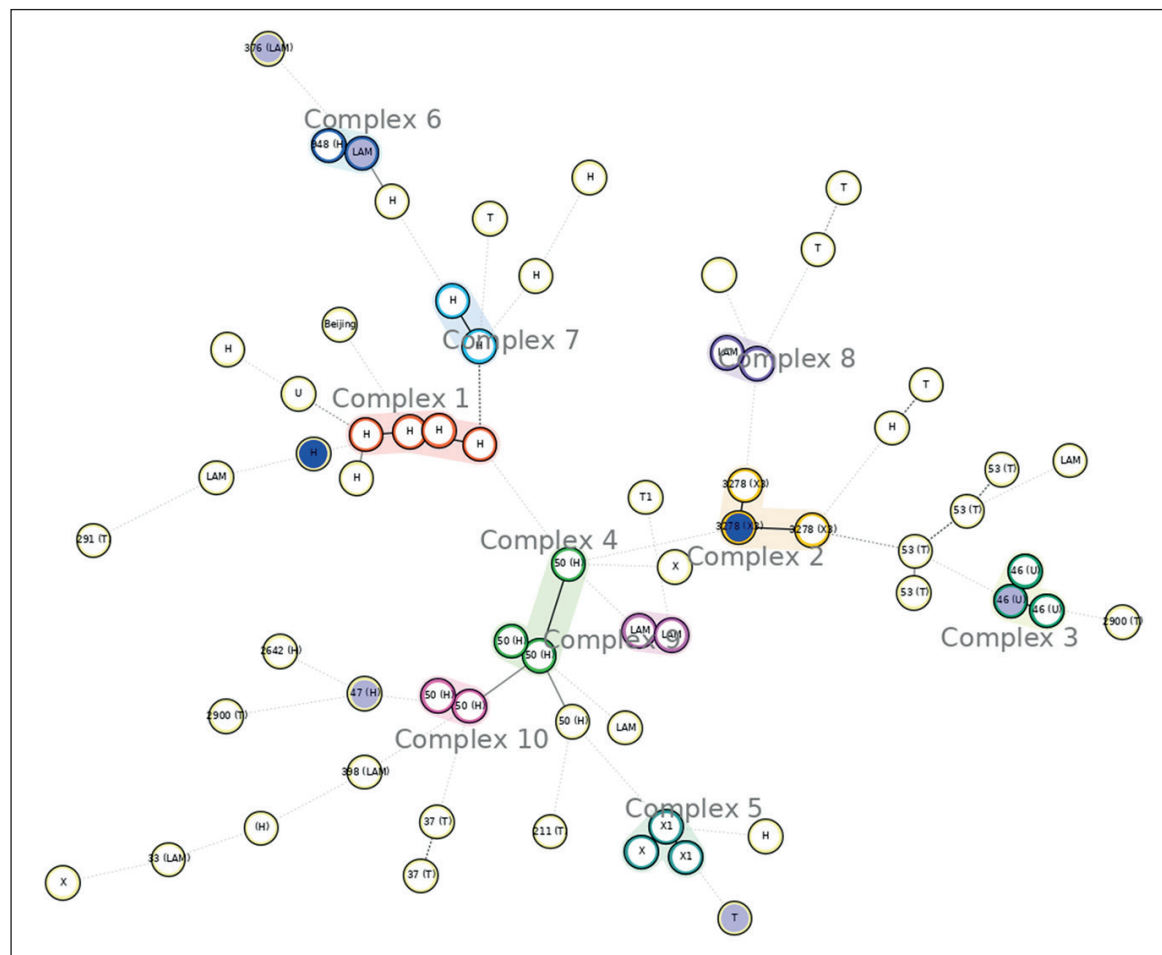


Figura 2. Árbol de mínima expansión mostrando las relaciones evolutivas entre los MIRU- VNTR 15 loci identificados en los aislados presentes en la región de estudio (n = 74). El árbol filogenético conecta cada genotipo en función de los cambios requeridos para pasar de un alelo a otro. Líneas solidas indica un solo cambio entre dos patrones, mientras que barras grises indican dos cambios, punteadas tres cambios, y punteadas cuatro o más cambios. El linaje aparece al interior del nodo.

Discusión

El presente estudio realizó una descripción de la estructura genética de los aislados de *M. tuberculosis* circulantes en la jurisdicción V de Jalapa, Veracruz. Esta jurisdicción se ubica en la zona montañosa central del estado de Veracruz (Figura 1). Si bien la incidencia de TBC en la jurisdicción V es de 6 por cada 100.000 habs., se describe una tendencia de crecimiento de casos de TBC y TBC-DR. En este sentido, de las 74 cepas incluidas en el estudio, 44 (59%) fueron resistentes a un fármaco y 17 (23%) multiresistentes. Estos datos confirmarían el creciente problema de la TBC-DR en la región; sin embargo, se requieren estudios adicionales para establecer la magnitud real del problema y los factores que participan en la generación o transmisión de estas formas agravadas de TBC en la región estudiada.

A nivel filogenético, el linaje L4 (EuroAmericano) fue el predominante debido a que se presentó en 73 de los 74 aislados analizados (99%). Esta predominancia es coincidente con estudios realizados en diversos estados de México^{6,7,9-15}, y países de Latinoamérica^{30,31}. El éxito en la transmisión en América de este L4, así como de los sublinajes que incluye, se ha explicado como una consecuencia de la colonización europea, realizada a mediados del siglo XVI, gracias a la cual se importaron dichos sublinajes, los cuales se dispersaron a lo largo del tiempo^{30,32,33}. Sin embargo, las frecuencias de estos sublinajes presentan variaciones importantes de acuerdo con el desarrollo histórico, sociodemográfico y por los patrones de migración de la población en los países latinoamericanos. En México, si bien los reportes existentes son limitados⁶⁻¹⁶, éstos presentan en su gran mayoría una mayor frecuencia de aislados con sublinaje X y H, una gran diversidad de sublinajes de origen europeo (L4) y escasa presencia de linajes de origen asiático (L1 y L2). Este comportamiento difiere a lo observado en países como Colombia, Venezuela, Chile o Brasil, donde predominan los sublinaje LAM, H y T, siendo frecuente encontrar sublinajes EAI y Beijing, propios de L1 y L2³¹. Los resultados aquí presentados son la primera descripción sobre las características de los genotipos presentes en esta zona central del estado de Veracruz, el cual se encuentra ubicado en la región sureste de México país. Éstos guardan coincidencia en cuanto a la diversidad de sublinajes y muestran también la presencia de genotipos endémicos. Sin duda, esta información será de utilidad para posteriores estudios de genotipificación, tanto nacionales como internacionales.

Por otra parte, la gran mayoría de los estudios de genotipificación de TBC realizados en Latinoamérica presentan un importante número de aislados con un linaje no bien definido o huérfano, por lo que se pierde información importante sobre el genotipo presentes³¹. En

este sentido, la identificación de linaje mediante redes bayesianas conformacionales²⁵, empleado en el presente estudio, será de gran utilidad para estudios posteriores.

Sólo un aislado mostró pertenencia al linaje L2 (Asia Oriental), Beijing (SIT1), lo que confirmaría su amplia distribución en México^{12,14,15}. Dentro de las características distintivas de este linaje es que posee una mayor virulencia, tendencia a desarrollar resistencia a los fármacos antituberculosos y una mayor mortalidad. Estas características le han permitido ser el responsable de 50% de los casos de TBC en Asia Oriental³⁴. La baja frecuencia aquí observada puede deberse a una mala adaptación a la población local o a una reciente introducción en la zona. No obstante, se deberán seguir desarrollando más estudios de genotipificación para identificar la magnitud real de la ocurrencia de este genotipo y sus rutas de transmisión.

De los aislados analizados, 38 (51%) presentaron un patrón de espilogotipado sin descripción previa (huérfanos) y 35 (49%) se incluyeron en un SIT previamente descrito, siendo los más abundantes el SIT50 (sublinaje H, n = 7), SIT53 (sublinaje T, n = 6) y SIT3278 (sublinaje X, n = 5). Estos SITs han sido descritos en estados del norte, centro y sur de México, y en varios países de América y Europa confirmando su amplia dispersión nacional y global (Tabla 1). Finalmente, cinco de los 10 CC, identificados mediante MST, guardaron correspondencia con los grupos definidos mediante espilogotipado. Fue de llamar la atención el CC3, el cual incluyó tres aislados con un linaje U y un SIT46, no habiendo sido descrito en la región.

Los datos obtenidos enfatizan la diversidad de la estructura genética de *M. tuberculosis* presente en la región y permiten identificar dos grupos de aislados de *M. tuberculosis*. Por un lado, se encuentran aquellos con un genotipo endémico (huérfanos), que no están conformando grupos y pudieran ser el resultado de la reactivación de una infección previa (en este sentido es importante mencionar que México es una zona endémica de TBC). Por otro lado, se encuentran aislados con un SIT previamente definido y con amplia distribución en el país, muchos de los cuales están formando agrupamientos, lo que evidencia una transmisión activa en la población. Estos dos escenarios establecen la necesidad de incorporar medidas de atención diferenciadas, dando prioridad a los pacientes que forman parte de un grupo, estableciendo una vigilancia más estrecha de sus contactos, con el fin de evitar su dispersión.

Una limitación importante de este estudio fue el escaso número de aislados incluidos, lo que pudiera tener implicaciones para determinar con mayor certidumbre el escenario real de los genotipos, sublinajes, y los grupos o CC presentes. Sin duda, se requiere incrementar el número de aislados clínicos de *M. tuberculosis* a analizar, y con ello generar información que permita identificar los

factores que implicados en la transmisión de genotipos específicos en la región.

En el mismo sentido se debe considerar la inclusión de herramientas de análisis con mayor nivel de profundidad como es la genotipificación mediante secuenciación de genomas completos, lo que permitirá identificar con claridad la diversidad de los genotipos de *M. tuberculosis* circulantes, e identificar con una mayor precisión la presencia de complejos clonales de transmisión y sus posibles rutas de contagio³⁵.

En conclusión, este trabajo describe, por primera vez, la estructura genotípica de *M. tuberculosis* que circulan en la jurisdicción V en Veracruz, México. El principal hallazgo se relacionó con la importante presencia del L4 (EuroAmericano) y una gran diversidad de sublinajes circulantes. Lo anterior reafirmaría la influencia de este linaje

en la conformación de la estructura genética de la TBC en México. La implementación sistemática de este tipo de análisis dentro de un programa de vigilancia molecular aportará información importante sobre el comportamiento de la TBC y permitirá emitir recomendaciones para mejorar la atención a esta patología.

Agradecimientos y financiamiento: Betchaah Lefort, fue una becaria de “Becas de Excelencia del gobierno de México para extranjeros, AMEXCID”. Roberto Zenteno-Cuevas fue parcialmente apoyado por CONACyT-Proyecto de desarrollo científico para atender problemas nacionales No. 213712: Desarrollo de un sistema de vigilancia epidemiológico molecular de TBC. Se agradece el apoyo del personal del programa de la jurisdicción V para la realización de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- 1.- TB reports [Internet]. World Health Organization. 2020. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>
- 2.- Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis en las Américas 2018. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49510/OPSCDE18036_spa?
- 3.- Secretaría de salud. Boletín Epidemiológico, Vigilancia Epidemiológica Semana 19, 2021. México; 2021.
- 4.- Ford C B, Shah R R, Maeda M K, Gagneux S, Murray M B, Cohen T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. Nat Genet [Internet]. 2013/06/12. 2013;45(7):784-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749189>.
- 5.- Coll P, García de Viedma D. Epidemiología molecular de la tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1a ed. 2018;36(4):233-40.
- 6.- Molina-Torres C A, Moreno-Torres E, Ocampo-Candiani J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. J Clin Microbiol [Internet]. 2010;48(2):448-55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940048>.
- 7.- Nava-Aguilera E, Lopez-Vidal Y, Harris E, Morales-Perez A, Mitchell S, Flores-Moreno M, et al. Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors. Clin Dev Immunol [Internet]. 2011;2011:408375. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21197077>.
- 8.- Macias Parra M, Kumate Rodríguez J, Arredondo García J L, López-Vidal Y, Castanon-Arreola M, Balandrano S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genotype diversity and drug resistance profiles in a pediatric population in Mexico. Tuberc Res Treat [Internet]. 2011/01/01. 2011;2011:239042. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22567263>
- 9.- Zenteno-Cuevas R, Mendoza-Damián F, Muñoz ICICIC, Enciso-Moreno L, Pérez-Navarro LMLM, Ramírez-Hernández MDMDMD, et al. Description of the population structure and genetic diversity of tuberculosis in Estado de México, a low prevalence setting from Mexico. APMIS [Internet]. 2015;123(2):116-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257651>
- 10.- López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, Hernández-Nieto J, et al. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México. BMC Res Notes [Internet]. 2013;6(1):172. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23635381>.
- 11.- Flores-López C A, Zenteno-Cuevas R, Laniado-Laborín R, Reynaud Y, García-Ortiz R A, González-Y-Merchand J A, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Baja California, Mexico: A result of human migration? Infect Genet Evol [Internet]. 2016/07/16. 2017;55:378-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27418234>.
- 12.- Martínez-Guarneros A, Rastogi N, Couvin D, Escobar-Gutiérrez A, Rossi LMG, Vázquez-Chacón C A, et al. Genetic diversity among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Mexico. Infect Genet Evol [Internet]. 2013;14(1):434-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333775>.
- 13.- Flores-Treviño S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, González-Díaz E, Pérez-Gómez H R, Bocanegra-García V, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Guadalajara, Mexico and identification of a rare multidrug resistant Beijing genotype. PLoS One [Internet]. 2015;10(2):e0118095. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25695431>.
- 14.- Flores-Treviño S, Mendoza-Olazarán S, Garza-González E. Drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico: A systematic review. Salud Publica Mex [Internet]. 2014;56(1):63-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24912522>.
- 15.- Munro-Rojas D, Fernández-Morales E, Zarrabal-Meza J, Martínez-Cazares MT, Parissi-Crivelli A, Fuentes-Domínguez J, et al. Genetic diversity of drug and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Veracruz, Mexico. PLoS One [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Jun 3];13(3). Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0193626.
- 16.- Juárez-Eusebio DM, Munro-Rojas D, Muñiz-Salazar R, Laniado-Laborín R, Martínez-Guarneros JA, Flores-López CA, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from high prevalence tuberculosis states in Mexico. Infect Genet Evol [Internet]. 2016/09/18. 2017;55:384-91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27637930>.
- 17.- Almaraz-Velasco R, Munro-Rojas D, Fuentes-Domínguez J, Muñiz-Salazar R, Ibarra-Estela M, Guevara-Méndez A, et al. A first insight into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Veracruz, Mexico. Int J Mycobacteriology [Internet]. 2017/03/21. 2017;6(1):14. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28317799>.
- 18.- Petroff S A. A New and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J Exp Med* [Internet]. 1915;21(1):38-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867850>.
 - 19.- Van Soolingen D, Hermans P W M, De Haas P E W, Soll D R, Van Embden J D A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1991;29(11):2578-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685494>.
 - 20.- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1997;35(4):907-14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157152>.
 - 21.- Driscoll J R. Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2009;551:117-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19521871>.
 - 22.- Couvin D, David A, Zozio T, Rastogi N. Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the *Mycobacterium tuberculosis* genotyping database. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2018 Dec 26 [cited 2019 Apr 12];1-13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134818309699?via%3Dihub>.
 - 23.- Allix-Béguec 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* [Internet]. 2008;46(8):2692-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550737>.
 - 24.- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: A web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010;38(SUPPL. 2):W326-31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457747>.
 - 25.- Shabbeer A, Cowan L S, Ozcaglar C, Rastogi N, Vandenberg SL, Yener B, et al. TB-Lineage: An online tool for classification and analysis of strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(4):789-97. Available from: doi:10.1016/j.meegid.2012.02.010.
 - 26.- Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet* [Internet]. 2016/11/01. 2016;48(12):1535-43. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng.3704>.
 - 27.- Coll F, McNeerney R, Guerra-Assunção J A, Glynn J R, Perdigo J, Viveiros M, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat Commun* [Internet]. 2014/09/02. 2014;5:4-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25176035>.
 - 28.- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006;44(12):4498-510. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005759>.
 - 29.- Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Loch C, Supply P, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: Association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2003;3(2):125-33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809807>.
 - 30.- Wiens KE, Woyczynski LP, Ledesma JR, Ross JM, Zenteno-Cuevas R, Goodridge A, et al. Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: A systematic review and meta-analysis [Internet]. *BMC Medicine*. BioMed Central Ltd. 2018; 16 p. 196. Available from: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-018-1180-x>.
 - 31.- Woodman M, Haeusler I L, Grandjean L. Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective. *Genes (Basel)*. 2019;10(1):53. doi: 10.3390/genes10010053.
 - 32.- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* [Internet]. 2013/09/03. 2013;45(10):1176-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995134>.
 - 33.- Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet* [Internet]. 2016/11/01. 2016;48(12):1535-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27798628>.
 - 34.- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis*; 2010. p. 103-11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20113979/>
 - 35.- Meehan C J, Goig G A, Kohl T A, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nature Rev Microbiol* 2019; p 533-45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31209399/>