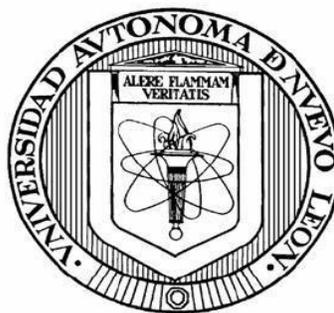


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR, RESISTENCIA Y COMORBILIDAD  
DE *Mycobacterium tuberculosis* EN PERSONAS ATENDIDAS EN EL  
HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”  
Y COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA CON  
UN PRIMER NIVEL DE ATENCIÓN**

**POR**

**AMADOR FLORES ARÉCHIGA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**2023**

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR, RESISTENCIA Y COMORBILIDAD  
DE *Mycobacterium tuberculosis* EN PERSONAS ATENDIDAS EN EL  
HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”  
Y COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA CON  
UN PRIMER NIVEL DE ATENCIÓN**

**Comité de tesis**



Dr. Reyes Tamez Guerra  
Presidente



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales  
Secretaria



Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Vocal



Dr. Jorge Castro Garza  
Vocal



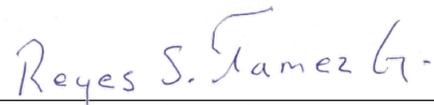
Dr. José M. Vázquez Guillén  
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Subdirectora de Posgrado

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR, RESISTENCIA Y COMORBILIDAD DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN PERSONAS ATENDIDAS EN EL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”  
Y COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA CON UN  
PRIMER NIVEL DE ATENCIÓN**

**Dirección de Tesis**



---

Dr. Reyes Tamez Guerra

Director

**DERECHOS RESERVADOS©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de vídeos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al doctor Edelmiro Pérez Rodríguez, exdirector de la Facultad de Medicina, por apoyar el equipamiento del laboratorio de biología molecular y la remodelación del área. Lo mismo los reactivos necesarios.

Al doctor Jesús Áncer Rodríguez, quien me facilitó el equipo para mis pruebas y el suministro de reactivos. En todas sus diversas posiciones en la Universidad Autónoma de Nuevo León, siempre recibí múltiples atenciones de su parte.

Mi reconocimiento y gratitud al doctor Reyes Tamez Guerra por su guía en el doctorado y en tantos apoyos y atenciones que recibí de su parte a lo largo de muchos años.

Al rector de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Dr. Santos Guzmán López, el reconocimiento se extiende en áreas diferentes de mi doctorado; sin embargo, es mi deseo agradecer el trato amable que lo caracteriza y que me ha dispensado.

A la doctora Lydia Guadalupe Rivera Morales por su valioso consejo, su alto sentido de responsabilidad académica.

A mi entrañable Facultad de Medicina y la de mi doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas y a la Universidad que nos congrega. Gracias por su apoyo.

Agradecimiento a Argentina Argelia Santa Ana por su esmerada edición de esta tesis.

## DEDICATORIAS

No he considerado otra dedicatoria que la de mis padres, abuelo materno y mi tía. Todos fallecidos y, en vida, recibí de ellos amor, apoyo y cuidados.

A mi padre, quien falleció dos meses cinco días antes de que yo naciera, lo conocí en fotografías, los relatos de mi madre y mi abuelo. Mi tía Cleotilde a quien todos los sobrinos le llamábamos “*Llallá*”. Al envejecer cuidé de ella porque no se casó, en su funeral, al despedirla le dije: Bienaventurados los que pueden pagar una deuda de amor y de cuidados, cuidaste de mi infancia, yo de tu vejez.

Mi abuelo fue un amoroso padre en mi orfandad paterna, me enseñó que existen formas de mostrar cariño en el tono de voz y en los hechos, más que en las palabras.

Mi madre, maestra normalista, se esforzó en mi educación, en mi carrera profesional nunca faltó dinero para libros, no hubo para diversiones, fue una economista nata.

Para mis queridos Padre y Madre, Amador Flores Cadena y Celia Aréchiga Cantú. Mi abuelo Martín Aréchiga Delgado y Cleotilde Aréchiga Cantú.

Ellos viven en mí, yo en ellos.

# ÍNDICE

	Pág.
Introducción	1
Antecedentes	3
Historia	3
Genotipificación Molecular	5
Espoligotipificación	5
MIRU-VNTR	6
Diagnóstico Microbiológico	6
Pruebas Inmunológicas	7
Derivado Proteico Purificado	7
Igra	7
Epidemiología	8
Justificación	10
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Material y métodos	13
Comité de Ética en Investigación	13
Población de estudio	13
Historias clínicas	13
Identificación microbiológica	13
Toma de muestra	14
Recepción, conservación y transporte de las muestras	14
Extendido de la muestra	15

Tinción de Ziehl-Neelsen	16
Observación microscópica	16
Informe de resultados	17
Identificación molecular	18
Extracción de ADN	18
Espoligotipificación	19
MIRU-VNTR	22
Resistencia genética a los fármacos antituberculosos	26
Resistencia fenotípica	29
Resultados	30
Distribución según sexo	31
Edad	33
Comorbilidad con VIH	34
Comorbilidad con diabetes	35
Espoligotipificación	36
MIRU-VNTR	40
Resistencia a los antituberculosos	41
Discusión	47
Conclusiones	50
Perspectivas	51
Anexo 1	52
Anexo 2	53
Anexo 3	54
Bibliografía	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Informe de resultados para la tinción BAAR	17
Tabla 2. Cantidades de reactivos para espoligotipificación	19
Tabla 3. Condiciones de amplificación de espoligotipificación	19
Tabla 4. Iniciadores utilizados: genotipificación por MIRU-VNTR	22
Tabla 5. Cantidades de reactivos para genotipificación por MIRU-VNTR.	23
Tabla 6. Condiciones de amplificación para MIRU-VNTR	24
Tabla 7. <i>Locus</i> y alelos de MIRU-VNTR	25
Tabla 8. Mutaciones blanco de genes asociados a la resistencia genética	27
Tabla 9. Cantidades de reactivos para detección de resistencia genética	28
Tabla 10. Condiciones de amplificación para MIRU-VNTR	29
Tabla 11. Familias genotipificadas en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”	37
Tabla 12. Espoligotipos totales y SIT obtenidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”	38
Tabla 13. Espoligotipos <i>orphan</i> reubicados en familias según las reglas bayesianas	39
Tabla 14. Linajes obtenidos con MIRU-VNTR del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”	40
Tabla 15. Antibióticos determinados por la técnica Anyplex™ y sus genes	41
Tabla 16. Combinación de resistencias fenotípicas técnica MGIT para personas atendidas	44
en la SSANL para un total de 150	44
Tabla 17. Resumen de multifarmacorresistencia para rifampicina e isoniacida por técnicas Anyplex™ y MGIT grupo perteneciente a la SSANL	45
Tabla 18. Familias y su relación con la resistencia genética y porcentaje, personas atendidas en el HU	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evidencia de primeros casos de TB: a) Egipto, b) Italia.	3
Figura 2. Proceso para la recepción de muestras de expectoración	15
Figura 3. Proceso de coloración Ziehl-Neelsen	16
Figura 4. Distribución según sexo en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y en la Secretaría de Salud Nuevo León.	32
Figura 5. Rangos de edades.	33
Figura 6. Comorbilidad con VIH en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.	34
Figura 7. Comorbilidad con diabetes en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.	35
Figura 8. Resistencias obtenidas en personas del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.	42
Figura 9. Resistencias obtenidas en personas atendidas en la Secretaría de Salud de Nuevo León.	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAAR	Bacilo ácido-alcohol resistente
CFP-10	Por sus siglas en inglés: <i>culture filtrate protein 10</i>
DR	Por sus siglas en inglés: <i>direct repeat</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
ELISA	Por sus siglas en inglés: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ESAT-6	Por sus siglas en inglés: <i>early secretory antigenic target 6</i>
EMB	Etambutol
HU	Hospital Universitario
IGRA	Por sus siglas en inglés: <i>interferon-gamma release assay</i> ensayo de liberación de interferón-gamma
INH	Isoniazida
MDR	Multidrogorresistente
MGIT	Por sus siglas en inglés: <i>Mycobacterial growth indicator tube</i>
MIRU-VNTR	Por sus siglas en inglés: <i>Mycobacterial interspersed repetitive units - variable number tandem repeats</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MTC	Por sus siglas en inglés: <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PZA	Pirazinamida
PPD	Por sus siglas en inglés: <i>purified protein derivative</i> (derivado proteico purificado)
RIF	Rifampicina
SIT	Por sus siglas en inglés: <i>spoligo international type</i>
SSANL	Secretaría de Salud de Nuevo León
STP	Estreptomicina
TB	Tuberculosis
TST	Por sus siglas en inglés: <i>tuberculin skin test</i>
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

## RESUMEN EN ESPAÑOL

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, curable y prevenible, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha considerado como reemergente debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos entre otros factores.

En el presente estudio se analizaron ciento noventa casos de pacientes con tuberculosis pulmonar que acudieron al Hospital Universitario (HU) “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y ciento cincuenta resistencia genética y fenotípica de la Secretaría de Salud de Nuevo León (SSANL).

Se analizaron edad, sexo y comorbilidad de TBP con VIH y diabetes. Se realizó genotipificación molecular de *M. tuberculosis* por espoligotipificación y MIRU-VNTR. Se determinaron los patrones genéticos de la resistencia en el HU y en la SSANL. Los patrones fenotípicos de la resistencia a los antibióticos de primera y segunda línea en pacientes de la SSANL.

La distribución de acuerdo con el sexo, en la suma de las poblaciones del HU y SSANL, fue de trescientos cuarenta que corresponden ( $n=230$ ) 70 por ciento en hombres y ( $n=102$ ) 30 por ciento en mujeres. El promedio de edad fue de 41.7 por ciento. El 13.7 por ciento de las personas estaban coinfectadas con VIH y 31.6 presentaron comorbilidad con diabetes *mellitus*. La infección por VIH y comorbilidad con diabetes simultánea es de ( $n=5$ ) que corresponde a 2.6 por ciento.

Las familias de espoligotipos predominantes fueron las siguientes: X1 (SIT 19,  $n$  46, 24.2 por ciento), T1 (SIT 53,  $n$  45, 23.7 por ciento), H3 (SIT 50,  $n$  7, 6.8 por ciento) y Beijing (SIT 1,  $n$  11, 5.8 por ciento). El 12.6 por ciento de los aislados del HU fueron genotípicamente resistentes (ver la figura 8). La resistencia genética en la SSANL es de ( $n= 22$ ) 14.7% (ver figura 9). Fenotípicamente, en aislados de la SSANL se presenta ( $n=41$ ) y porcentaje de 27.3% (ver tabla 16). Las técnicas de Anyplex™ (genotípica) y MGIT (fenotípica) no coinciden en su totalidad con la farmacoresistencia. De once familias Beijing encontradas en este estudio ninguna mostró resistencia genética a los antibióticos.

## ABSTRACT

Age, sex, and comorbidity of TBP with Tuberculosis (TB) is an infectious, curable, and preventable disease; the World Health Organization (WHO) has considered it as re-emerging because of the appearance of antibiotic-resistant strains.

In the present study, 190 isolates were obtained from patients with pulmonary tuberculosis at the University Hospital (HU) “Dr. José Eleuterio González” from the Universidad Autónoma de Nuevo León.

HIV and diabetes were analyzed. Molecular genotyping of *M. tuberculosis* was performed by spoligotyping and MIRU-VNTR. Genetic resistance in the HU and SSANL samples. Phenotypic patterns of resistance in SSANL patients to first and second-line antibiotics were determined.

The distribution according to sex, in the sum of the HU and SSANL populations, was 340, which corresponds to 70 percent to men and 30 to women. The average age was 41.7 percent. In addition, 13.7 percent of people were co-infected with HIV, and 31.6 have comorbidity with diabetes mellitus. HIV infection and diabetes comorbidity have ( $n=5$ ) 2.6 percent.

The predominant spoligotype families were the following: X1 (SIT 19,  $n$  46, 24.2 percent), T1 (SIT 53,  $n$  45, 23.7 percent), H3 (SIT 50,  $n$  7, 6.8 percent), and Beijing (SIT 1,  $n$  11, 5.8 percent). 12.6 percent of the HU isolates were genotypically resistant (see figure 8). Genetic resistance in SSANL is ( $n = 22$ ) 14.7% (see figure 9). Phenotypically, in isolates of SSANL, it was presented ( $n = 41$ ) and a percentage of 27.3% (see table 16). The Anyplex™ (genotypic) and MGIT (phenotypic) techniques do not fully match drug resistance. Of eleven Beijing families found in this study, none showed genetic resistance to antibiotics.

## INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium*, de la familia *Mycobacteriaceae* pertenece al orden de los *Actinomycetales* y se han identificado más de doscientas especies de micobacterias diferentes.

Existe un grupo de micobacterias que presentan más del 95 por ciento de similitud en su ADN y es denominado MTC (por sus siglas en inglés: *Mycobacterium tuberculosis* complex), este incluye a *M. tuberculosis*. Es usual, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium mungi* y *Mycobacterium canetti* (González-Martin 2014; de Martino 2019).

El principal microorganismo de este complejo es *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria aerobia obligada con un tamaño de 0.4 x 3  $\mu\text{m}$  de forma cilíndrica. Se caracteriza por su resistencia a la decoloración con la mezcla de alcohol etílico y ácido clorhídrico. Está constituido de lípidos, que incluyen ácidos micólicos, ceras y fosfátidos; además de proteínas y polisacáridos (Koch 2018; Riedel 2020).

Los componentes de la membrana celular de la micobacteria interfieren con la activación de citocinas de linfocitos T y macrófagos, una vez dentro del macrófago las micobacterias inhiben la fusión del fagosoma y lisosoma para escapar hacia el citoplasma (Cardona 2012; Struthers 2018).

Existen diversos sitios de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, la pulmonar es la más frecuente con ochenta por ciento seguida por ganglios linfáticos, cuarenta; líquido pleural, treinta; genitourinario, quince; huesos y articulaciones, diez; y, meningitis, cinco. Debe entenderse que el veinte por ciento restante de la TB pulmonar se llevó a cien (Murray *et al.* 2009).

La manipulación de muestras expone al personal del laboratorio de contraer la enfermedad, en consecuencia, el procesamiento debe efectuarse en un laboratorio de bioseguridad nivel tres (Molina 2010; Casillas Vega 2020).

Es posible que la tuberculosis (TB) sea la enfermedad infecciosa más antigua, algunos autores la asocian a una coevolución entre *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y los homínidos desde hace tres millones de años (Gutierrez *et al.* 2005; Daniel 2006).

Otros consideran a la teoría denominada *out of Africa* acontecida hace 70 000 o 90 000 años en la que emigraron hacia otros continentes como Europa y Asia en grupos pequeños, *M. tuberculosis* acompañó al hombre en su emigración. La coevolución del hombre representa una interacción entre este hospedero y *M. tuberculosis*, la bacteria puede adaptarse y evadir las defensas del hospedero, y este logra resistir la invasión del MTB mediante su inherente capacidad inmunológica para neutralizar la invasión (Brites y Gagneux 2015).

Incuestionables evidencias apuntan a otros miembros del MTC asociados a diferentes especies animales tales como: ganado (*Mycobacterium bovis*); cabras (*Mycobacterium caprae*); mangostas (*Mycobacterium mungi*); suricata (*Mycobacterium suricattae*); focas y leones marinos (*Mycobacterium pinipedii*); musaraña, campañol y ratón de campo (*Mycobacterium microti*); oryx, gacela, antílope, venado y antílope acuático (*Mycobacterium urycus*); y chimpancés (*Chimpanze bacillus*) (Bañuls *et al.* 2015).

El estudio filogenético de los miembros del complejo *M. tuberculosis* han identificado siete linajes, cada uno con una distribución geográfica específica: linaje 1, África del Este, Filipinas y la costa del océano Índico; linaje 2, Asia Oriental; linaje 3 África del Este y Asia Central; linaje 4, Europa, América y África; linajes 5 y 6, África Occidental; linaje 7, Etiopía; las líneas animales se desprenden del linaje humano 6 como se muestra en la figura 1 (Comas *et al.* 2014; Sánchez-Montalvá *et al.* 2018).

## ANTECEDENTES

### Historia

China, Italia y Egipto tienen antecedentes históricos sobre el conocimiento inicial de la tuberculosis (figura 1) (Stone 2017).

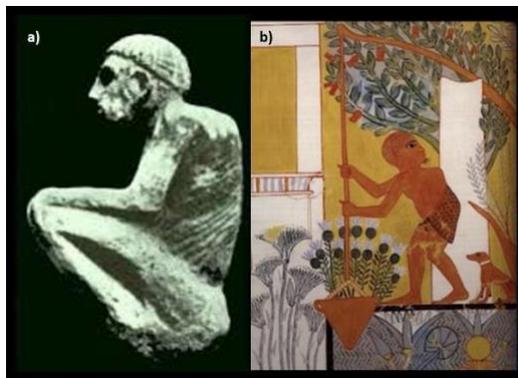


Figura 1. Evidencia de primeros casos de TB: a) Egipto, b) Italia.

Escritos arcaicos chinos en el año 2700 antes de nuestra era, dan cuenta de casos de tuberculosis en miembros de la monarquía egipcia, que estuvieron bien preservados y que se ubican en el año 4000 antes de nuestra era (A.E.). Hipócrates (460 – 370 A.E.) describió la TB y le llamó *phthisis* o consunción y describió los síntomas, si bien, al ver que sucedía en familias, la consideró como una enfermedad hereditaria. En el Antiguo Testamento, Levítico 26:16 y Deuteronomio 28:22, el Señor amenaza a quienes no cumplan sus preceptos: serán castigados con una plaga o consunción, que hace referencia a la tuberculosis (Daniel 1999).

Los judíos fueron infectados de TB durante el tiempo que vivieron en Egipto. Aristóteles 384 – c. 312 A.E., Galeno (129 – 226) y Villemin (1834 – 1913) consideraron que la tuberculosis era una enfermedad infecciosa y el último probó el carácter infeccioso al inocular material de pulmones de animales enfermos a sanos (Farga 2004).

Robert Koch (1843 – 1910), el 24 de marzo de 1882, presentó ante la Sociedad de Fisiología de Berlín, su descubrimiento sobre la etiología de la TB por el llamado bacilo de Koch. La fecha quedó grabada en la historia, y se convirtió en el día mundial de la

tuberculosis en el que se recuerda al doctor Koch y se informa sobre los avances en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la TB (Ledermann 2003; Farga 2004; Cartes Parra 2013).

A la postre del descubrimiento del agente etiológico por Robert Koch, no hubo avances en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar (TBP).

Diversos autores escribieron textos, poemas y letras musicales que mencionan a la tuberculosis como Fedor Dostoyevski (1821 – 1881) y Thomas Mann (1815 – 1955) con *Crimen y castigo* y *La montaña mágica*, respectivamente. Perduran letra y música de tangos como “Se va el tren” y “Caminito del taller”, entre otros. Es de mencionarse que se incluyó por más de un autor un tango denominado “TBC”, que parece indicar (por sus siglas en inglés *tuberculosis complex*) el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, en nada se relaciona con tuberculosis, sino con “te besé”. Escribir sin leer la letra conduce a error.

Música popular (bolero), autor, Pedro Junco, cubano (1920 – 1943), entre otras canciones escribió el bolero “Nosotros” que, en sus líneas finales dice: “no es falta de cariño/ te quiero con el alma/ y en nombre de ese amor/ y por tu bien, te digo adiós”. A la mayoría de las personas les parece una canción romántica, no un rompimiento para evitar el contagio por tuberculosis (Ledermann 2003).

En una poesía del zacatecano Antonio Guzmán Aguilera (1894 – 1958), “La Chacha Micaila”...

“¡Qué poco a poquito se me jué muriendo!

Tosía y tosía/ y lloraba la probe en silencio...” (Scribd 2020).

Ejemplos de películas del siglo XX son *Vaquero de medianoche* (1969), personaje con TB, Ratso Rizzo, actor, Dustin Hoffman; *Los miserables* (1921) personaje con TB Fantine, interpretado por Anne Hathaway en la versión musical (2012); *Mouline Rouge!*

(2001), personaje con TB Santine, interpretado por Nicole Kidman, por citar algunos ejemplos (Rovello 2018; Perciaccante 2019).

Contrario a la observación epidemiológica que señala a la tuberculosis como menos frecuente en las mujeres. En las diferentes versiones de las manifestaciones artísticas prevalecen las mujeres con TB, si se toma esta compilación, dos óperas, dos películas y la novela *Crimen y castigo*, son ocho, y los hombres tres: Ratso Rizzo, Hans Castorp y Pedro Junco.

### **Genotipificación molecular**

La genotipificación se define como el proceso para determinar un genotipo en la variante de ADN en un organismo mediante técnicas de laboratorio. Este proceso facilita el conocimiento de la epidemiología, en este caso de *M. tuberculosis* (García y Astudillo 2019).

### **Espoligotipificación**

El fundamento de este método de tipificación se basa en el polimorfismo de ADN presente en un *locus* cromosómico particular; es decir, en la repetición directa que está presente de forma única en las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

La región de la repetición directa en *M. bovis* consta de secuencias directamente repetidas de 36 pares de bases, que están intercaladas por espaciadores de ADN no repetitivos, cada uno de 35 a 41 pares de bases de longitud. Se determinó que el número de copias de la secuencia en la repetición directa en *M. bovis* fue 49. En otras cepas del complejo de *M. tuberculosis*, se encontró que el número de elementos DR (por sus siglas en inglés: *direct repeat*) varía de manera significativa.

## **MIRU-VNTR**

Las secuencias de repetición en tándem de número variable VNTR (por sus siglas en inglés: *variable number of tandem repeat*) son marcadores para el genotipado de especies bacterianas como el complejo *M. tuberculosis* basado en la amplificación por PCR, utilizando cebadores específicos para las regiones flanqueantes y la determinación de los tamaños de los amplicones, para realizar posteriormente la migración electroforética.

Los tamaños citados reflejan los números de las copias amplificadas. El resultado final es un código numérico correspondiente a la repetición en cada *locus* de VNTR. Los códigos son útiles como estudios comparativos intra e interlaboratorios. Los códigos de MIRU-VNTR tienen las ventajas de ser rápidos y apropiados para los aislados de *M. tuberculosis*, incluidas las cepas que cuentan con pocas copias de IS6110 (Supply 2005).

## **Diagnóstico microbiológico**

La prueba de BAAR, cuando es positiva, permite establecer un diagnóstico de la TB. Lo mismo puede ser útil para evaluar la respuesta al tratamiento si un BAAR positivo, se vuelve negativo. Es importante señalar que la revisión de los BAAR debe realizarse por personal calificado.

El cultivo de Lowenstein-Jensen es el estándar de oro para el diagnóstico de la TB. El largo periodo de incubación que puede ser de ocho a doce semanas es una limitante de esta prueba.

La asociación entre las pruebas inmunológicas positivas y el contacto previo con MTB puede tener interpretaciones variadas.

En niños mexicanos que al nacer reciben la vacuna BCG (Bacilo Calmette-Guérin) que es una vacuna contra la TB, la respuesta a TST es positiva por efecto de la vacuna. En

niños norteamericanos, que no reciben la vacuna, la positividad significa contacto con *Mycobacterium tuberculosis*.

El efecto de la BCG es temporal y los anticuerpos desaparecen en la juventud y madurez, en población mexicana de 20 años o más la interpretación de la prueba positiva es válida. Si la BCG fuera efectiva a esas edades, la TB estuviera bajo control.

## **Pruebas inmunológicas**

### **Derivado proteico purificado (PPD, por sus siglas en inglés)**

La proteína purificada derivada de la tuberculina o TST (por sus siglas en inglés: *tuberculin skin test*) conocida como prueba de Mantoux, es una prueba utilizada para conocer si una persona ha estado en contacto con el bacilo tuberculoso, es una prueba *in vivo*, se aplica por vía intradérmica 0.1 mL que contiene 5 unidades de tuberculina y uno de los principales problemas con esta prueba es que la persona a quien se le aplica regrese a las 48 y 72 horas para poder leer la reacción. Se mide la induración presentada en el sitio de la aplicación que debe tener 5 milímetros o más de induración (Cascante *et. al.* 2007).

### **IGRA**

La prueba IGRA (por sus siglas en inglés *interferon-gamma release assay*), es un ensayo *in vitro* que valora la respuesta inmunitaria frente a MTB. El ensayo consiste en detectar el interferón gamma (INF- $\gamma$ ) liberado por las células T en respuesta a la estimulación con antígenos específicos de MTB, como el *early secretory antigenic target 6* (ESAT-6) y el *culture filtrate protein 10* (CFP-10).

De acuerdo con su relación con la TB se reconocen tres grupos de personas, el primero es el que no ha estado en contacto con *M. tuberculosis*, en consecuencia, son TST (por sus siglas en inglés: *tuberculin skin test*) negativo. El segundo grupo ha estado en contacto con *M. tuberculosis* sin presentar síntomas ni ser infectante. La bacteria está “contenida” y no se multiplica, ni se disemina por estar limitada por macrófagos, si bien

las pruebas TST, PPD e IGRA son positivas. Este grupo representa de un tercio a un cuarto de la población mundial. El tercer grupo presenta una infección por MTB, activa e infectante por tratarse de bacilíferos y sintomáticos con fiebre, pérdida de peso, ocasionalmente se manifiestan hemoptisis (OMS 2018).

Una persona infectada con TB y/o TST o PPD positiva y BAAR (bacilo ácido-alcohol resistente) positivo puede infectar de diez a catorce personas por año y causar lesión identificable radiológicamente (Nachiappan 2017; O'Garra *et al.* 2013).

La otra alternativa es infectar a sujetos con TST o PPD positivo (incluida IGRA), aunque la lesión pulmonar no evolucionará a una lesión cavernosa ni es bacilífero, por lo mismo, no contagia a terceros, eso es tuberculosis latente. Lo que se aprecia en el estudio radiológico es un nódulo de Ghon, que es de naturaleza granulomatosa, que en cinco a diez por ciento de los individuos evolucionan a TBP activa. El resto puede permanecer toda la vida sin activarse (Pai 2016).

## **Epidemiología**

A nivel mundial en el año 2019, se reportaron diez millones de personas enfermas de TB, con un estimado de 1.4 millones de muertes por esta infección, de ellas, 208 000 padecían VIH. En el caso del continente americano durante ese mismo año, se registraron 289 000 casos de TB (OMS 2020).

Algunos factores que retrasan el control de esta enfermedad son: desnutrición, diabetes, tabaquismo y virus de inmunodeficiencia humana (VIH), las causas citadas aumentan la susceptibilidad inmunológica (Divangahi 2013).

Los factores que inciden en el avance de la TBP son los relacionados directamente con la bacteria que son los genes de virulencia y farmacorresistencia, los vinculados al huésped; es decir, la genética o estado del sistema inmune, así como el medio ambiente: hacinamiento, desnutrición y pobreza (Hernández-Pando 2004).

Cuando apareció la estreptomina en 1943 se le denominó “la droga milagrosa” por su eficacia para curar casos de tuberculosis considerados en fase terminal. Este acontecimiento se encontraba en su fase esperanzadora cuando algunos enfermos se consideraron curados volvían a presentar síntomas y no hubo dosis elevada que los curara. A partir de ahí se inició el conocimiento de la resistencia a los antibióticos en la TBP (Ryan 1992; Cicero-Sabido y Meléndez-Mier 2018).

Conforme a la base de datos SpolDb4 del Institut Pasteur de la Guadeloupe, en el nivel mundial la familia con mayor número de aislamientos es la Beijing con un 10.5 por ciento, si bien su mayor distribución geográfica pertenece a países asiáticos (Woodman *et al.* 2019).

Existen trabajos de investigadores locales y nacionales. En el ámbito local destacan las investigaciones de Katia Peñuelas-Urquides *et al.* 2008 y 2018; Lucio Vera-Cabrera *et al.* 2014; Samantha Flores Treviño *et al.* 2013 y 2015; Casillas Vega 2020, libro con capítulo sobre tuberculosis. Flores Treviño *et al.* (2013 y 2015) con un metaanálisis de once trabajos nacionales en el año 2014. Cerezo-Cortés y colaboradores en el año 2019 realizaron una revisión de la familia Beijing en varios países de Latinoamérica y el Caribe en donde el mayor porcentaje de familia Beijing se localiza en Cuba con 17 por ciento, seguido de Perú con 9 por ciento y México con un análisis de dieciséis artículos y mil novecientas unas muestras; de estas, veinticinco son de la familia Beijing que corresponden a 1.3 por ciento (Cerezo-Cortés 2019).

## JUSTIFICACIÓN

Existen varios factores que deben mejorarse para alcanzar la meta de la Organización Mundial de la Salud de erradicar la TB para el 2035; entre los datos del microorganismo, los genes de virulencia y farmacorresistencia; en el hospedero, las características genéticas de la inmunidad y el medio ambiente de pobreza, desnutrición y hacinamiento, así como el VIH/SIDA y la diabetes.

La incidencia de TBP en México es de 15.64 por 100 000 habitantes y una tasa de mortalidad de 1.59. El estado de Nuevo León triplica la media nacional con 3.45 (ENSANUT 2020).

Al realizar pruebas de resistencia a los antibióticos en la TBP es válido cuestionarse, según los resultados, si se cambia la terapéutica a los enfermos con TBP.

Es preciso considerar el efecto negativo de la diabetes y el VIH/SIDA en la respuesta inmunogénica del hospedero.

El presente estudio aborda esas variables y mediante la utilización de métodos moleculares para observar las familias que aparecen en los enfermos en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, tales como la familia Beijing y Manilla conocidas por su resistencia a los antibióticos y mayor virulencia.

## **HIPÓTESIS**

Existe mayor diversidad genética y farmacorresistencia entre los aislados de *M. tuberculosis* pulmonar obtenidos del Hospital “Dr. José Eleuterio González” y un primer nivel de atención representado por la Secretaría de Salud de Nuevo León.

## **OBJETIVO GENERAL**

Genotipificar mediante espoligotipos y MIRU-VNTR, así como determinar farmacorresistencia de personas con tuberculosis pulmonar, correlacionar con datos clínicos y comparar con un primer nivel de atención.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener los aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar.
2. Genotipificar los aislados clínicos de personas infectadas con tuberculosis pulmonar por técnicas de espoligotipificación y MIRU-VNTR.
3. Determinar y comparar la resistencia genética y fenotípica a los antibióticos.
4. Correlacionar datos clínicos específicos relacionados con TB y los resultados obtenidos por diferentes métodos.
5. Comparar los resultados obtenidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” con los casos de los centros de primer nivel de la Secretaría de Salud de Nuevo León.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Comité de Ética en Investigación**

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, registrado con la clave PC18-00001.

### **Población de estudio**

El estudio se realizó con un total de ciento noventa muestras, durante el periodo de agosto de 2017 a noviembre de 2019, en el laboratorio de micobacterias y el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica de la Facultad de Medicina de la UANL y ciento cincuenta en el laboratorio estatal de la Secretaría de Salud de Nuevo León.

En cuanto a la comparación de resistencia a los antibióticos contra la TBP, se obtuvieron ciento cincuenta datos de resistencia a los fármacos antituberculosos de la SSANL.

Es menester aclarar que este trabajo se limita a TBP y no incluye muestras de otras manifestaciones de tuberculosis.

### **Historias clínicas**

Se compilaron las historias clínicas para cada una de las muestras positivas para TBP, registrando los datos tales como: sexo, edad, positividad para VIH y glucemia.

### **Identificación microbiológica**

La identificación microbiológica se llevó a cabo siguiendo los lineamientos del *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis* (2018) difundido por la Organización Panamericana de la Salud.

## **Toma de muestra**

La muestra se toma en un envase con las siguientes características:

- Boca ancha.
- Capacidad entre 30 y 50 mL.
- Cierre hermético.
- Material plástico transparente.

Se tomó la muestra por triplicado, la primera al momento de la consulta, la segunda por la mañana al día siguiente y la tercera por la noche, ese mismo día.

La muestra de esputo mucopurulento proveniente del árbol bronquial es la que asegura mayor probabilidad de que se puedan observar bacilos.

En el caso de pacientes que no pueden expectorar, como niños o ancianos, se realiza una inducción de esputo que consiste en fluidificar las secreciones con solución fisiológica y nebulizaciones para facilitar su drenaje, así como el lavado gástrico o bronquial.

## **Recepción, conservación y transporte de las muestras**

Al momento en el que se recibió la muestra se comprobó que los envases estuvieran claramente identificados, acompañados por la boleta correspondiente a la baciloscopia.

Las muestras fueron conservadas en un refrigerador protegidas de la luz y dentro de una bolsa hermética para evitar posibles contaminaciones.

El personal de laboratorio que recibió la muestra realizó el procedimiento descrito en la figura 2.

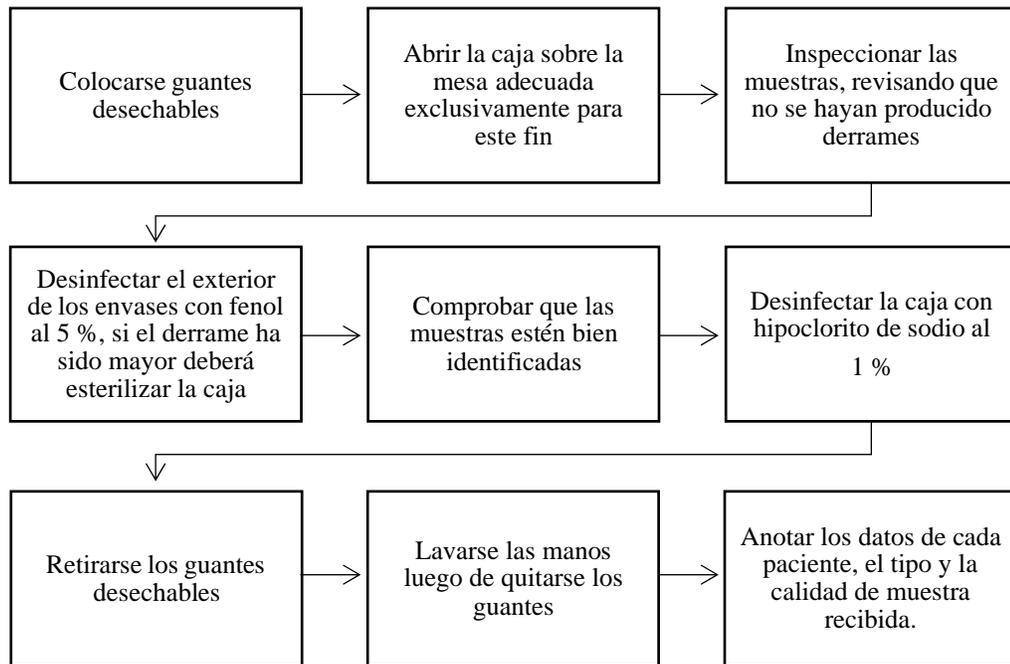


Figura 2. Proceso para la recepción de muestras de expectoración.

### Extendido de la muestra

Para cada muestra se folió un portaobjetos que es el mismo número asignado como registro del laboratorio.

Se tomó la muestra con la lámina correspondiente y se colocó justo al lado del mechero, de manera que la llama quedó entre el operador y el frasco. Después se destapó con cuidado el envase para evitar la formación de aerosoles y con un aplicador se procedió a seleccionar la partícula más purulenta de la muestra para ser enrollada en la punta del aplicador. Se colocaron las partículas sobre el portaobjetos dibujando un óvalo de dos centímetros de largo. El extendido se dejó secar a temperatura ambiente, y al estar seco completamente se situó la lámina con un soporte directo sobre una llama.

## Tinción de Ziehl-Neelsen

La coloración realizada en el laboratorio para la detección de bacilos ácido-alcohol resistente fue la de Ziehl-Neelsen, el procedimiento efectuado está descrito en la figura.

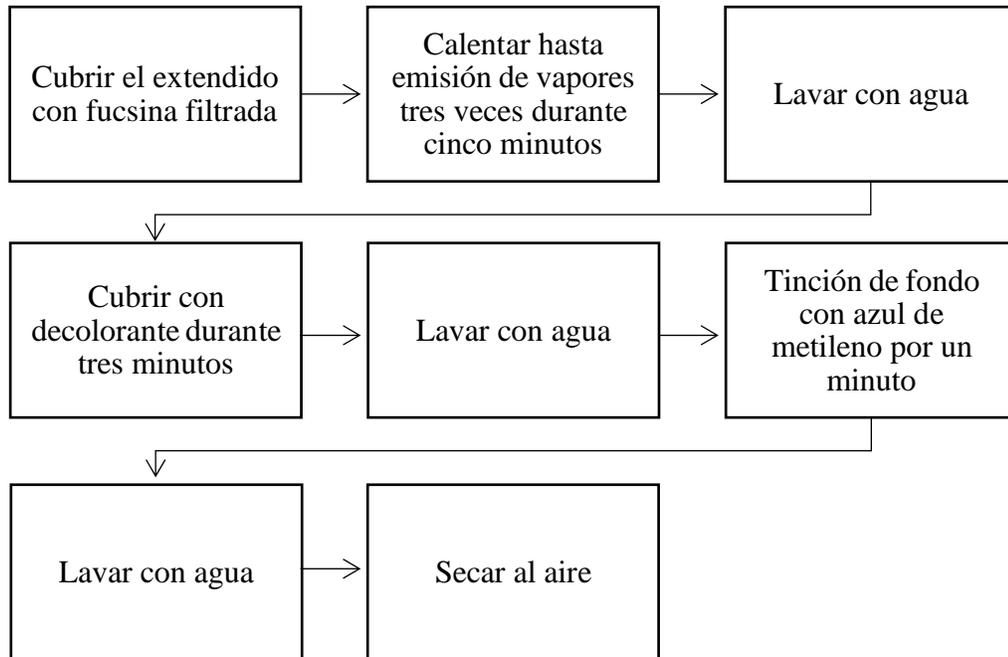


Figura 3. Proceso de coloración Ziehl-Neelsen.

## Observación microscópica

Se utilizó un objetivo de 10x, se enfocó el extendido, se buscó el área más densa de material y sobre ella se colocó una gota de aceite de inmersión para cambiar cuidadosamente al objetivo de 100x. Una vez enfocado, se recorrió la muestra en líneas rectas sin repetir los campos de observación.

Se observaron 100 campos y se cuantificó el número de BAAR observados en el total de los 100 campos. En caso de observar menos de cinco BAAR en los 100 campos, la lectura se amplió a 200 campos. En la tabla 1 se muestran los criterios para el reporte de conteos en el microscopio.

## Informe de resultados

En la siguiente tabla se muestra el informe de resultados que debe reportarse para los extendidos teñidos con la coloración de Ziehl-Neelsen.

Tabla 1. Informe de resultados para la tinción BAAR

<b>Resultado del examen microscópico</b>	<b>Informe</b>
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácido-alcohol resistente
Se observan de uno a nueve BAAR en 100 campos observados	Número exacto de bacilos en 100 campos
Se observan entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados.	Positivo (+)
Se observan de uno a 10 BAAR por campo en 50 campos observados.	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

## Identificación molecular

### Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó con un kit comercial (ISOLATE II Genomic DNA Kit, BIOLINE. Memphis, Tennessee, EUA). Se tomaron con un asa de 3 mm de cinco a diez colonias con un máximo de dos semanas de crecimiento y se suspendieron en 200  $\mu$ L de amortiguador de lisis GL en un tubo cónico (SSIBio®, EUA) de 2 mL se colocaron en un baño seco (*dual block* Labnet. Edison, Nueva Jersey, EUA) para ser inactivadas a 80°C por 50 minutos. Se centrifugaron seis minutos a 14 000 gravedades en una microcentrífuga (Select BioProducts, Force 1618. Wembley, Australia).

Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 25  $\mu$ L de proteinasa K y 200  $\mu$ L de amortiguador de lisis G3 y se incubó durante 15 minutos en el baño seco a 70°C. Después se agitó en vórtex (Labnet 120V. Edison, Nueva Jersey, EUA) y se añadieron 210  $\mu$ L de etanol grado molecular (Sigma-Aldrich. Darmstadt, Alemania), se agitó en vórtex nuevamente, y se transfirió a una columna incluida en el kit que se colocó en un tubo cónico de 2 mL y se centrifugó durante un minuto a 12 000 gravedades. Se eliminó el sobrenadante y sobre la columna se agregaron 500  $\mu$ L de amortiguador GW1 y se centrifugó a 12 000 g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 600  $\mu$ L de amortiguador GW2, y se centrifugó durante un minuto a 12 000 g, se retiró el sobrenadante y se repitió el centrifugado para eliminar el etanol residual.

Se colocó la columna dentro de un tubo cónico (SSIBio®. EUA) de 1.5 mL y se añadieron 100  $\mu$ L de amortiguador de elución previamente calentado a 70°C, se incubó por un minuto y se llevó a cabo un último centrifugado durante un minuto a 12 000 g. El ADN obtenido se conservó a -20 °C en amortiguador.

El ADN se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop (8000 Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y se ajustó a una concentración de 20 ng/ $\mu$ L con agua grado molecular (Corning. Nueva York, EUA) para los experimentos posteriores.

## Espoligotipificación

Se efectuó una amplificación de los espaciadores dentro de una estación de trabajo para PCR (UVP. Jena, Alemania). En un tubo con amortiguador para PCR (Axygen Inc. Nueva York, EUA) se añadieron los siguientes reactivos: GoTaq® Green Master Mix (Promega. Madison, Wisconsin, EUA), agua grado molecular (Corning. Nueva York, EUA) y los oligonucleótidos incluidos en el kit para espoligotipificación (Mapmygenome, Hyderabad. India) DRa 5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC3', DRb 5'CCGAGAGGGGA CGGAAAC-3' y el ADN en una concentración de 20 ng/μL. Las cantidades se muestran en la tabla 2. Se incluyeron las cepas BCGP3 y H37RV como controles.

Tabla 2. Cantidades de reactivos para espoligotipificación

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
GoTaq® Green Master Mix	12.5 μL
Agua grado molecular	8.5 μL
DRa	1 μL
DRb	1 μL
ADN	5 μL
Volumen final	28 μL

Se inició el proceso en un termociclador punto final de acuerdo con el protocolo mostrado en la tabla 3 (BiometraTone 96G, Analytik Jena, Alemania).

Tabla 3. Condiciones de amplificación de espoligotipificación

<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>
3 min	96°C	1
1 min	96°C	
1 min	55°C	30
30 s	72°C	
5 min	72°C	1
∞	4°C	

Los productos de amplificación se conservaron refrigerados a 4°C hasta el proceso de hibridación.

A tubos cónicos de 200 µL con 20 µL de la muestra amplificada se agregaron 150 µL del amortiguador 2xSSPE/0.1% SDS y se introdujeron en el termociclador durante diez minutos a 99°C para desnaturalizar el ADN y de inmediato se transfirieron a una gradilla fría. Se lavó la membrana (Mapmygenome. Hyderabad, India) que contiene un conjunto de cuarenta y tres oligonucleótidos correspondientes a cada espaciador de la región DR se lavó durante cinco minutos a 60°C con 150 ml de amortiguador 2xSSPE/0.1% SDS.

En la base de un equipo (Miniblotter™ 45. Immunetics, Cambridge, MA) se situó un cojín de espuma (Mapmygenome. Hyderabad, India) y después la membrana, cuidando que las ranuras del Miniblotter™ coincidieran con la línea de la membrana en la que se encuentran los oligonucleótidos; se colocó la tapa del Miniblotter™ ajustando con los tornillos incluidos de manera equitativa y enseguida se removió el exceso del amortiguador por aspiración con una micropipeta y se colocaron los productos de PCR diluidos en cada espacio del equipo para evitar las burbujas. El Miniblotter™ se colocó en el horno de hibridación (ProBlot™ H0600A Labnet. Nueva Jersey, EUA) a 60°C durante sesenta minutos. Enseguida las muestras se removieron con micropipeta para luego introducir la membrana en el tubo de hibridación para realizar los lavados por duplicado con 50 mL del amortiguador 2xSSPE/0.5% SDS durante diez minutos a 60°C. Posterior a los lavados se agregaron 2.5 µL del conjugado estreptavidina – peroxidasa conjugada (500U/mL, Innova Biosciences Ltd.) diluidos en 10 mL de amortiguador 2xSSPE/0.5% SDS y el tubo de hibridación se colocó en el horno a 42°C durante sesenta minutos con rotación moderada. Se lavó la membrana dos veces con 50 ml de amortiguador 2xSSPE/0.5% SDS durante diez minutos a 42°C, y se lavó de nuevo por duplicado con 50 ml de amortiguador 2xSSPE durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Para la quimioluminiscencia, la membrana se incubó durante dos minutos con 7 mL del reactivo que contiene luminol, ácido cumárico, tris, peróxido de hidrógeno y agua milli-Q® (GE Healthcare). La membrana se colocó entre dos acetatos dentro de un casete y encima se colocó una película (Hyperfilm™, Amersham™ Life Sciences) para rayos X y se dejó exponiendo por veinte minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se procedió a realizar el revelado. Este último proceso se efectuó en un cuarto oscuro equipado con una bombilla roja para que la iluminación no afectara el revelado (Aranaz *et al.* 1996).

## MIRU-VNTR

La técnica de genotipificación por MIRU-VNTR se llevó a cabo de acuerdo con la guía disponible en los protocolos de la plataforma MIRU-VNTR plus (Supply 2005). La amplificación por PCR de las diferentes regiones se realizó con los iniciadores específicos para cada región a amplificar (tabla 4).

Tabla 4. Iniciadores utilizados: genotipificación por MIRU-VNTR

<i>Locus</i>	Secuencia de iniciadores
424	5'CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT 3' 5'GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC 3'
577	5'CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT 3' 5'AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA 3'
580	5'GCGCGAGAGCCCGAACTGC 3' 5'GCGCAGCAGAAACGCCAGC 3'
802	5'GGGTTGCTGGATGACAACGTGT 3' 5'GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA 3'
960	5'GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC 3' 5'GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT 3'
1644	5'TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA 3' 5'CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC 3'
1955	5'AGATCCCAGTTGTCGTCGTC 3' 5'CAACATCGCCTGGTTCTGTA 3'
2163b	5'CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG 3' 5'CGAAGTGAATGGTGGCAT 3'
2165	5'AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT 3' 5'CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT 3'
2401	5'CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT 3' 5'ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA 3'
2996	5'TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC 3' 5'CATAGGCGACCAGGCGAATAG 3'

3192	5'ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA 3' 5'GTGCCGACGTGGTCTTGAT 3'
3690	5'CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC 3' 5'TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG 3'
4052	5'AACGCTCAGCTGTCCGAT 3' 5'CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT 3'
4156	5'TGACCACGGATTGCTCTAGT 3' 5'GCCGGCGTCCATGTT 3'

La PCR se realizó en una cabina (UVP. Jena, Alemania) utilizando los siguientes reactivos: GoTaq® Green Master Mix (Promega. Madison, Wisconsin, EUA), iniciadores específicos para cada región, agua grado molecular (Corning. Nueva York, EUA) y el ADN en una concentración de 20 ng/μL de acuerdo con las cantidades descritas en la tabla 5 para cada reacción de PCR.

Tabla 5. Cantidades de reactivos para genotipificación por MIRU-VNTR.

Reactivo	Cantidad
GoTaq® Green Master Mix	5 μL
Agua grado molecular	8 μL
Iniciador A	0.5 μL
Iniciador B	0.5 μL
ADN	5 μL
Volumen final	19 μL

La cantidad del iniciador A y B del *locus* 4156 se aumentó a 1 μL, obteniendo por volumen final 20 μL.

Se utilizó como control positivo una cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y, como control negativo, agua grado molecular.

La amplificación se realizó en un termociclador punto final, el protocolo de amplificación se describe en la tabla 6 (Biometra TOne 96G, Analytik Jena. Jena, Alemania).

Tabla 6. Condiciones de amplificación para MIRU-VNTR

<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>
15 min	96°C	1
1 min	96°C	
1 min	55°C	40
1.5 min	72°C	
10 min	72°C	1
∞	4°C	

Posterior a la amplificación se procedió a conservar los productos a una temperatura de 4°C hasta su uso.

El análisis de los productos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis con gel de agarosa al 3 % de 18 cm; se realizó pesando 4.5 g de agarosa ultrapura grado molecular (Invitrogen. Carlsbad, California, EUA), estos fueron disueltos en 250 mL de amortiguador TBE 1x en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. De inmediato se condujo a calentamiento en un microondas hasta observar una solución homogénea y se vació en el molde para la cámara de electroforesis y se colocaron los peines.

Después de una hora de solidificación se colocó el gel en una cámara de electroforesis (HSU-020 CBS scientific 500 – 600 VDC/20W/90mA/55°C. California, EUA) que contenía amortiguador TBE 1X.

Se colocaron 10 µL de los productos de amplificación en los pocillos del gel de agarosa. Se situó un marcador de peso molecular de 100 pb en uno de los pocillos (HyperLadder™ 1kb Bioline. Memphis, Tennessee, EUA) y se utilizó la fuente de poder (EC105 Thermo. Massachusetts, EUA) a 105 V durante noventa minutos. Por último, las

bandas presentes en el gel se visualizaron en un fotodocumentador (M-20V UVP UVsolo Touch Analytik Jena. Alemania).

Las imágenes de los diferentes geles se analizaron en el programa VisionWorks®, para asignar el peso molecular de cada señal de acuerdo con el marcador utilizado en el gel. Una vez determinado el peso molecular se procedió a establecer el número de repeticiones en tándem en el alelo. Al obtener el número de repeticiones en tándem para cada uno de los *locus*, en una muestra se logró el patrón de los quince *locus* de MIRU-VNTR ver tabla 7.

Tabla 7. *Locus* y alelos de MIRU-VNTR

<b><i>Locus</i></b>	<b>Alelo</b>	<b>Longitud (pb) de la unidad de repetición</b>
424	537	51
577	171	58
580	175	77
802	354	54
960	482	53
1644	565	53
1955	116	57
2163b	67	69
2165	195	75
2401	252	58
2996	285	51
3192	492	53
3690	272	58
4052	153	111
4156	563	59

### **Resistencia genética a los fármacos antituberculosos**

Se realizó el ensayo para determinar la resistencia genética de los antibióticos de primera línea (isoniacida y rifampicina) y segunda línea (fluoroquinolonas y drogas inyectables) con el sistema Anyplex™ II MTB/MDR/XDR utilizando una PCR multiplex (tabla 8).

Tabla 8. Mutaciones blanco de genes asociados a la resistencia genética

<b>Resistencia a droga</b>	<b>Gen relacionado</b>	<b>Mutaciones blanco</b>			
Resistencia a isoniacida (INH-R)	<i>katG</i>	S315I (AGC→ATC)	S315N (AGC→AAC)	S315T (AGC→ACC)	S315T (AGC→ACA)
	Promotor <i>inhA</i>	-15 (C→T)	-8 (T→A)	-8 (T→C)	
Resistencia a rifampicina (RIF-R)	<i>rpoB</i>	L511P (CTG→CCG)	Q513K (CAA→AAA)	Q513L (CAA→CTA)	Q513P (TCG→TTG)
		3 a.a. deleción in 513~516	D516V (GAC→TAC)	D516Y (GAC→TAC)	S522L (TGC→TTG)
		S522Q (TCG→CAG)	H526C (CAC→TGC)	H526D (CAC→GAC)	H526L (CAC→CTC)
		H526N (CAC→AAC)	H526R (CAC→CGC)	H526Y (CAC→TAC)	S531L (TCG→TTG)
		S531W (TCG→TGG)	L533P (CTG→CCG)		
Resistencia a fluoroquinolonas (FQ-R)	<i>gyrA</i>	A90V (GCG→GTG)	S91P (TCG→CCG)	D94A (GAC→GCC)	D94G (GAC→GGC)
		D94H (GAC→CAC)	D94N (GAC→AAC)	D94Y (GAC→TAC)	
Resistencia a drogas inyectables (Inj. Drug-R)	<i>rrs</i>  <i>eis</i>	1401 (A→G)	1402 (C→T)	1484 (G→T)	
		Promotor -37 (G→T)	-14 (C→T)	-10 (G→A)	

El kit cuenta con dos pares de iniciadores, uno para la detección y amplificación de mutaciones multifarmacorresistentes y otro para las mutaciones que producen resistencia extrema (XDR), un *mix* contiene ADN polimerasa, así como los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y el uracilo ADN glicosasa. Además, dispone de dos controles positivos, uno de ellos de tipo silvestre y el otro control interno. El kit se almacenó a -20°C.

Las mezclas de la PCR múltiple se llevaron a cabo en una cabina (UVP. Jena, Alemania), utilizando tiras de ocho tubos sin tapas (TLS0851, Bio-Rad. Hercules, California, Estados Unidos de América) (tabla 9).

Tabla 9. Cantidades de reactivos para detección de resistencia genética

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Mix	5 µL
Primer MTB/MDR o MTB/XDR	5 µL
Agua	5 µL
ADN	5 µL
Volumen final	20 µL

Para cada muestra se utilizaron dos tubos, uno para la detección de tuberculosis multifarmacorresistente y otro para la detección de aislados extremadamente resistente. Para realizar la mezcla del control positivo, control tipo silvestre y control negativo se emplearon de estos reactivos en vez del ácido desoxirribonucleico.

Se procedió a colocar las tiras de tapas a cada una de las tiras de tubos y se llevaron a analizar en el termociclador de tiempo real (CFX96™ Bio-Rad. Hercules, California, Estados Unidos de América) de acuerdo con el protocolo mencionado en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de amplificación para MIRU-VNTR

Tiempo	Temperatura	Ciclos
15 min	95°C	1
30 s	95°C	
1 min	60°C	50
30 s	72°C	
30 s	55°C	1

Curva de fusión: 55°C ~ 85°C (5 s/0.5°C)

Por último, se seleccionaron los fluoróforos utilizados en el experimento (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar™ 670 y Quasar™ 705). Al concluirse el proceso, se almacenó el archivo en una carpeta designada para visualizar los picos de fusión. Se exportaron todas las hojas de datos al programa Microsoft Excel. En la plataforma All-in-One de Seegene se indicó la detección de *M. tuberculosis*, así como de alguna resistencia y el gen responsable de tal mutación (Igarashi 2017).

### Resistencia fenotípica

La técnica MGIT (por sus siglas en inglés, *Mycobacterial growth indicator tube*), indica la resistencia fenotípica para los siguientes antibióticos: isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida y estreptomina.

Los antituberculosos enunciados se midieron por personal de la SSANL en personas atendidas por ellos con un número total de ciento cincuenta, en el año 2019.

## RESULTADOS

Los resultados corresponden a trescientos cuarenta personas diagnosticadas con TBP. Ciento noventa pertenecientes al HU y ciento cincuenta a la Secretaría de Salud de Nuevo León. El orden de datos presentados es el siguiente.

- Datos obtenidos de historias clínicas, de personas atendidas en el HU.
  - Según sexo.
  - Grupos de edad.
  - Comorbilidades.
    - VIH - SIDA
    - Diabetes
    - Ambas comorbilidades
  
- Espoligotipificación.
  
- MIRU-VNTR.
  
- Farmacorresistencia.
  - Anyplex™ (HU, SSANL).
  - MGIT (SSANL).

### **Distribución según sexo**

En este estudio el total de hombres enfermos de TBP en el HU es de ciento veintinueve, que corresponde a 67.8 por ciento y sesenta y una mujeres con 32.2, para un total de ciento noventa.

El grupo de la SSANL fue de ciento nueve para hombres y cuarenta y una mujeres con 70 y 30 por ciento, respectivamente, y un total de 150.

En el ejercicio de sumar los dos grupos, el total de hombres fue de doscientos treinta y ocho para un porcentaje de 70 y las mujeres ciento dos con 30 por ciento y un total de trescientos cuarenta (figura 4).

En el presente estudio la distribución fue la siguiente:

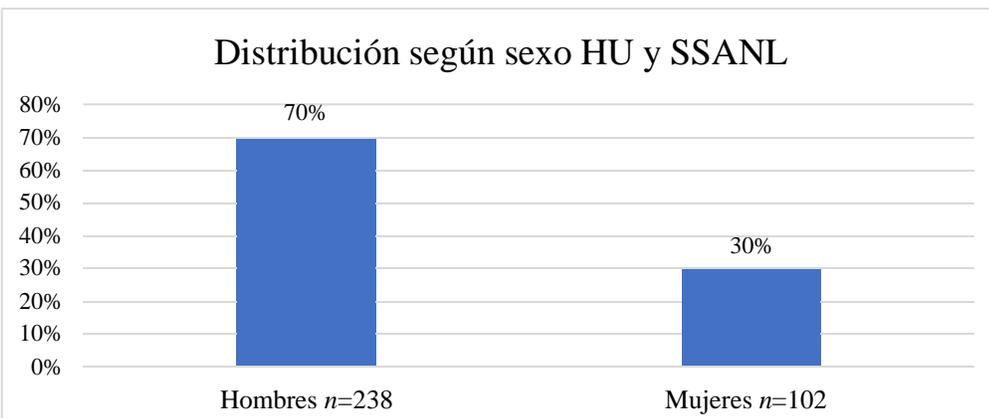
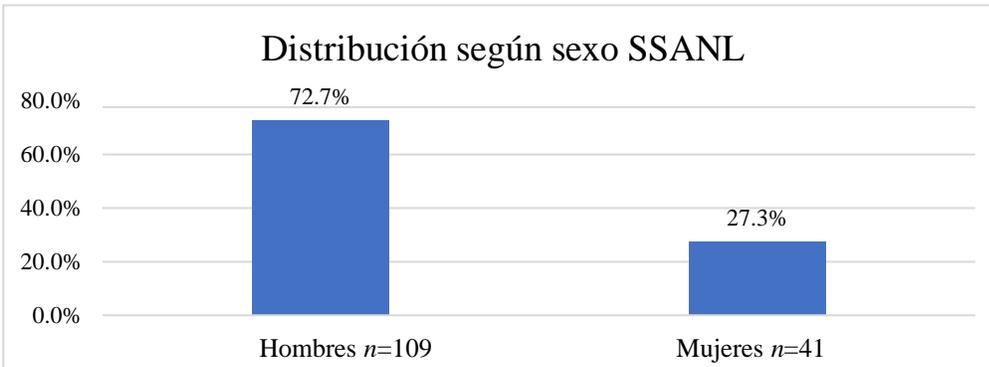
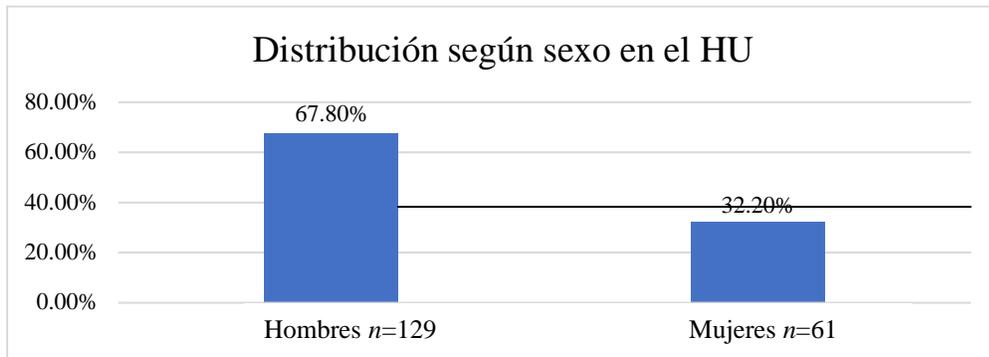


Figura 4. Distribución según sexo en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y en la Secretaría de Salud Nuevo León.

## Edad

La media de todas las edades de personas fue de 41.7 años que se encuentran en el grupo de 41 a 50 y en el de 31 a 40 que es también la mediana.

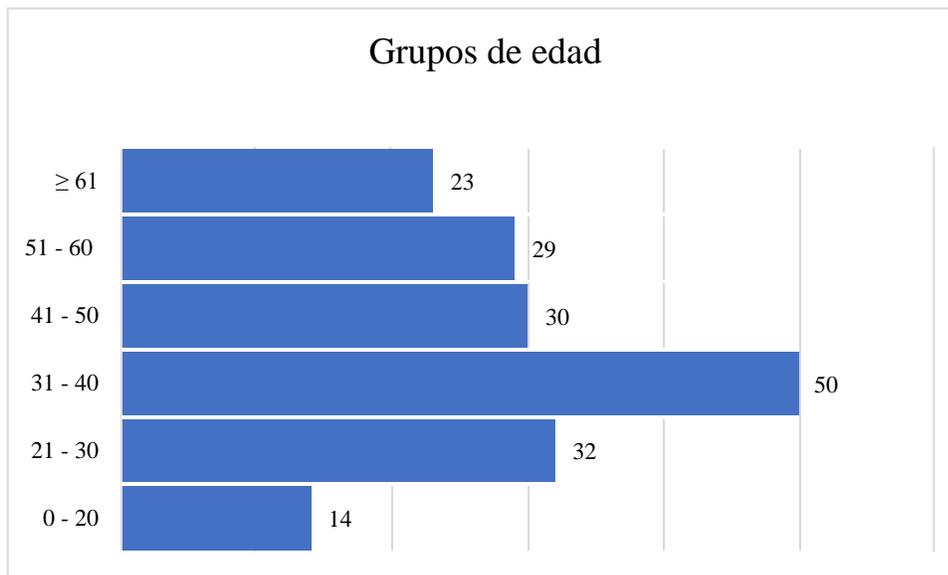


Figura 5. Rangos de edades.

El grupo de edad de 0 a 20 años es el menor con catorce personas.

En doce del total de ciento noventa no se registró la edad, por lo que esa ausencia de cifras se registró como “no dato”.

### Comorbilidad con VIH

La comorbilidad de TBP y VIH SIDA es de 13.7 por ciento con 86.3 sin comorbilidad, el número de tales porcentajes es de ciento sesenta y cuatro para negativos de VIH, SIDA y veintiséis positivos para un total de ciento noventa personas.

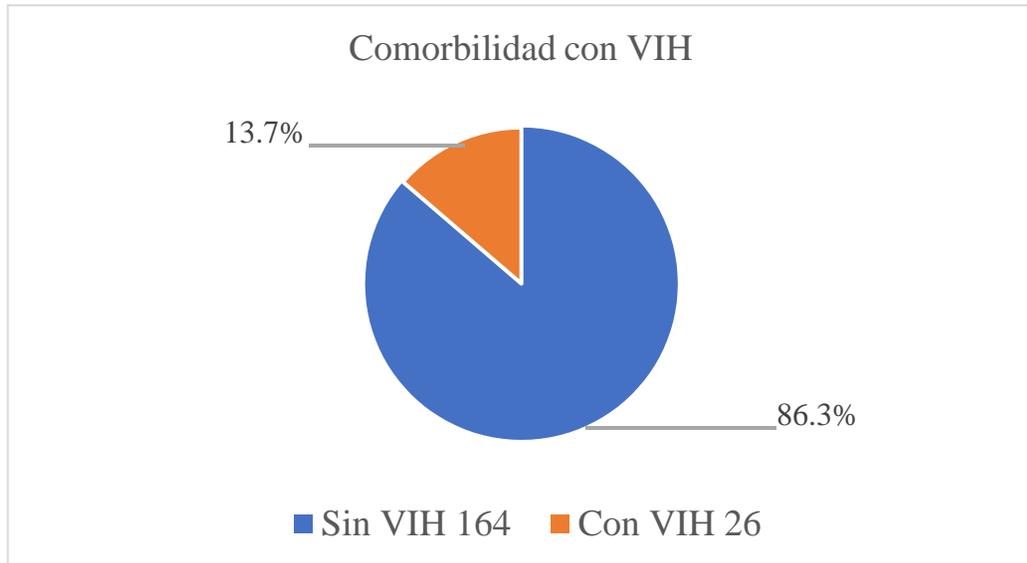


Figura 6. Comorbilidad con VIH en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".

## Comorbilidad con diabetes

La comorbilidad de TBP y diabetes es  $n$  de cincuenta y cinco personas con diabetes para un porcentaje de 31.6 y TBP no diabéticos con una  $n$  de ciento setenta y cuatro y un porcentaje de 68.4. La suma corresponde a ciento setenta y cuatro, en dieciséis casos no se obtuvieron datos sobre los valores de glucosa sanguínea.

Sobre la base de la American Diabetes Association (ADA) se registró como paciente con diabetes a quien se le detectó una glucemia de 126 o más miligramos por decilitro.

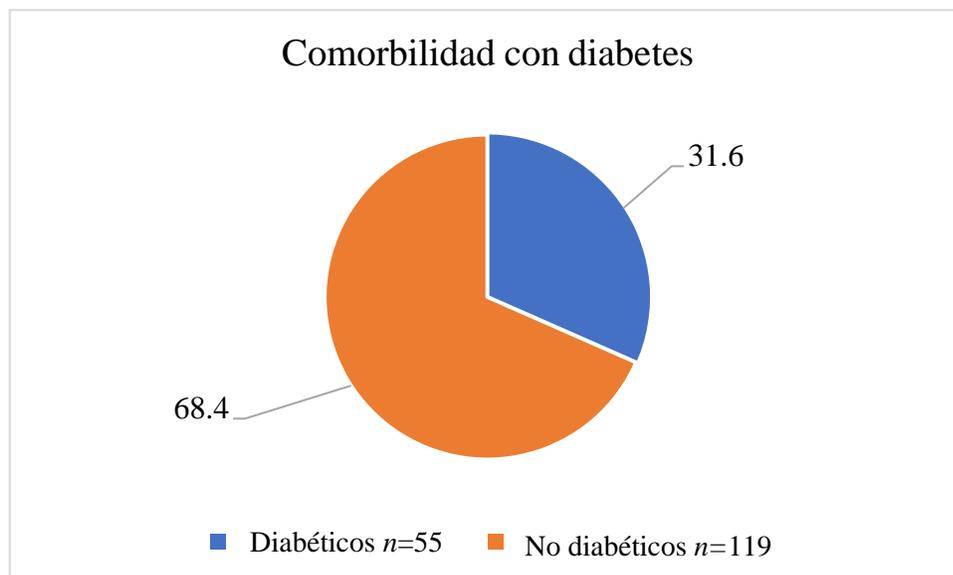


Figura 7. Comorbilidad con diabetes en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

Es menester señalar que se identificaron cinco personas en el HU con una doble comorbilidad de TBP con diabetes y VIH que corresponde a 2.6 por ciento.

## **Espoligotipificación**

Se procesaron ciento noventa espoligotipos. En la tabla 11 se aprecia que el total de familias identificadas fueron veintidós y once cepas fueron *orphan*, ello significa que no se identificaron como pertenecientes a una familia determinada.

En la tabla 11 se muestra el número y porcentaje de las familias identificadas, conteniendo el mayor número de organismos las familias como es el caso de X1 con 46, T1, 45; H3, 13; Beijing, 11; X3, 7; S mismo número; T2, 6; EAI2 Manilla. El resto muestra números decrecientes hasta familias con un solo aislado. Los porcentajes se encuentran en la columna de la derecha y los SIT se agregan en la tabla 12.

Tabla 11. Familias genotipificadas en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

<b>Familia</b>	<b><i>n</i></b>	<b>Porcentaje</b>
X1	46	24.2
T1	45	23.7
H3	13	6.8
<i>Orphan</i>	11	5.8
Beijing	11	5.8
X3	7	3.7
S	7	3.7
T2	6	3.2
EAI2 Manilla	6	3.2
X2	5	2.6
T3 T2	5	2.6
LAM	5	2.6
LAM9	5	2.6
X	4	2.1
LAM2	3	1.6
H	2	1.1
LAM3	2	1.1
LAM5	2	1.1
T5-Madrid2	1	0.5
LAM8	1	0.5
LAM1	1	0.5
Manu2	1	0.5
LAM 9	1	0.5
<b>Total general</b>	<b>190</b>	<b>100</b>





## MIRU-VNTR

El análisis de MIRU-VNTR reveló que el *locus* con mayor diversidad alélica fue QUB 26, por lo tanto, es el más discriminatorio. En cuanto al *locus* con menor diversidad alélica fue el MIRU 04, es decir, el menos discriminatorio.

Los genotipos identificados mediante la plataforma MIRU-VNTRplus fueron los siguientes:

Tabla 14. Linajes obtenidos con MIRU-VNTR del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

<b>Linaje</b>	<b><i>n</i></b>	<b>Porcentaje</b>
X	28	37.3
Ghana	16	21.3
Beijing	10	13.3
EAI	6	8
Haarlem	6	8
Uganda	5	6.7
LAM	2	2.7
S	2	2.7
Total	75	100

El 50 por ciento de los códigos de MIRU-VNTR fueron desconocidos.

## Resistencia a los antituberculosos

La resistencia a los antituberculosos se realizó genotípicamente tanto en las muestras de la SSANL como en las del HU la cual se realizó en las instalaciones del HU. Los antituberculosos y genes relacionados por Anyplex™ se mencionan en la tabla 15.

Tabla 15. Antibióticos determinados por la técnica Anyplex™ y sus genes

<b>Antibiótico</b>	<b>Genes relacionados</b>
Isoniacida	<i>inhA</i> <i>katG</i>
Rifampicina	<i>rpoB</i>
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>
Fármacos inyectables	<i>rrs</i> <i>promotor eis</i>

Se analizaron un total de ciento noventa muestras provenientes del Hospital Universitario, obteniendo resistencia en veinticuatro de ellas; es decir, el 12.6 por ciento y ciento sesenta y seis sensibles para un porcentaje de 87.4 determinadas por Anyplex™.

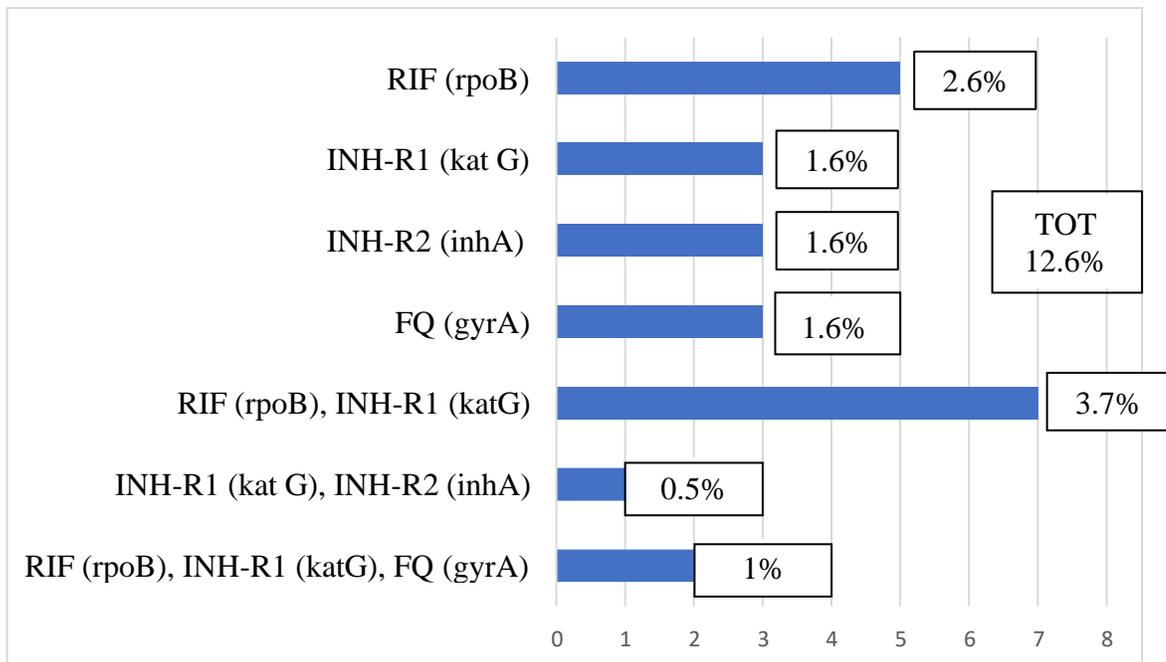


Figura 8. Resistencias obtenidas en personas del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

En cuanto a la resistencia obtenida por Anyplex™ (figura 9) en personas atendidas en la Secretaría de Salud de Nuevo León el *n* de resistencia fue de 22 que corresponde a 14.7 por ciento, los sensibles fueron ciento veintiocho, porcentaje de 85.3.

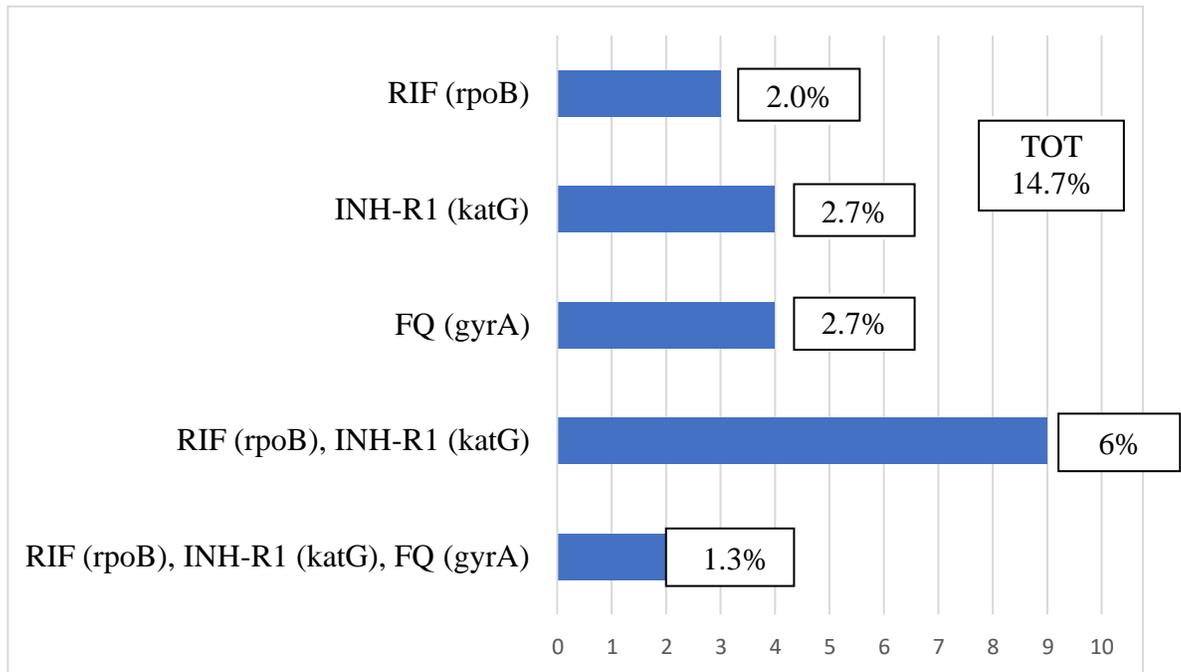


Figura 9. Resistencias obtenidas en personas atendidas en la Secretaría de Salud de Nuevo León.

En la tabla 16 se presenta la resistencia fenotípica a los antituberculosos. La estreptomycinina es la más elevada con 8.7 por ciento y el total de resistentes son cuarenta y uno que representa el 27.3 por ciento.

Tabla 16. Combinación de resistencias fenotípicas técnica MGIT para personas atendidas en la SSANL para un total de 150

<b>Antituberculoso</b>	<b><i>n</i></b>	<b>%</b>
STP	13	8.7
PZA	4	2.7
INH	3	2.0
PZA, STP	3	2.0
INH, RIF, STP	2	1.3
INH, RIF, EMB, PZA, STP	2	1.3
INH, RIF, PZA, STP	2	1.3
INH, RIF, PZA	2	1.3
RIF	2	1.3
RIF, EMB, PZA	2	1.3
RIF, EMB, PZA, STP	2	1.3
EMB	1	0.7
INH, PZA, STP	1	0.7
INH, RIF, EMB, STP	1	0.7
INH, RIF, EMB, PZA	1	0.7
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>27.3</b>
<b>Sensibles a todos los fármacos</b>	<b>109</b>	<b>72.7</b>

En una comparación entre la técnica Anyplex™ que corresponde a resistencia genotípica con la MGIT, fenotípica, se encontró que cuatro fueron positivos a Anyplex™ y tres a MGIT, ambos siete y sensibles ciento treinta y seis. Total 150, este grupo pertenece a la SSANL, ver porcentajes en la tabla 17.

Tabla 17. Resumen de multifarmacorresistencia para rifampicina e isoniacida por técnicas Anyplex™ y MGIT grupo perteneciente a la SSANL

<b>Técnica</b>	<b><i>n</i></b>	<b>%</b>
Anyplex™	4	2.7
MGIT	3	2.0
Ambos	7	4.7
Sensibles	136	90.7
Total	150	100.1

La familia Beijing suele reportarse como resistente a los antibióticos; sin embargo, en las once identificadas con Anyplex™ en personas atendidas en el HU, ninguna manifestó resistencia. Este resultado condujo al planteamiento de la interrogante: qué familias se asocian a resistencia. Utilizando el programa Excel, se cruzaron las familias identificadas con la resistencia (ver tabla 18). Los resultados fueron los siguientes: en total se reportaron veinticuatro muestras resistentes, de estas, once pertenecen a la familia X1, tres a T1, tres a T2, dos a H3, dos a T3 T2, una a LAM, X3 y X. La resistencia más significativa se observa en la familia X1, si bien no es la familia con mayor porcentaje es la de mayor cantidad con once, que representan 23.9 por ciento. La familia T2 es la que manifiesta mayor porcentaje de resistencia con 50 por ciento.

Tabla 18. Familias y su relación con la resistencia genética y porcentaje, personas atendidas en el HU

<b>Familia</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>n</i> Resistencia</b>	<b>Porcentaje</b>
X1	46	11	23.9
T1	45	3	6.7
T2	6	3	50
H3	13	2	15.4
T3 T2	5	2	40
LAM	5	1	20
X3	7	1	14.3
X	4	1	25
Beijing	11	0	0
<i>Orphan</i>	11	0	0
S	7	0	0
EAI2 Manilla	6	0	0
X2	5	0	0
LAM 9	6	0	0
LAM 2	3	0	0
H3	2	0	0
LAM 3	2	0	0
LAM 5	2	0	0
T5 Madrid	1	0	0
LAM 8	1	0	0
LAM 1	1	0	0
MANU 2	1	0	0

## DISCUSIÓN

La OMS en el 2020 reportó una distribución de sexo a nivel mundial de 63 por ciento de hombres y 37 por ciento de mujeres.

A fin de contar con un número mayor de hombres y mujeres, en este trabajo se sumaron los dos grupos estudiados, el del HU y el de la SSANL, que totalizan trescientas cuarenta personas, hombres y mujeres, separados por sexo, corresponden a doscientos treinta y ocho hombres que equivalen al 70 por ciento, las mujeres suman ciento dos, ello representa 30 por ciento.

Los intervalos de confianza de las dos poblaciones son las siguientes: hombres de la OMS 0.622 – 0.623. En cambio, para hombres investigados por el HU y la SSANL son de 0.649 – 0.746. Los intervalos de confianza de las dos poblaciones no se yuxtaponen, por lo tanto, son poblaciones estadísticamente diferentes. Igual sucede con el 0.377 – 0.378 de las mujeres reportadas por la OMS y el 0.254 – 0.351 HU con SSANL 0.254 – 0.351.

La misma referencia de la OMS (2020) indica que existen setecientas sesenta mil personas con TBP que padecen comorbilidad con VIH-SIDA, con un porcentaje de 7.6.

El hallazgo de comorbilidad TBP-VIH en el HU es de 26 que corresponde a 13.7 por ciento. Los intervalos de confianza de la OMS para VIH son 0.076 – 0.076, intervalos idénticos por los números tan elevados en el reporte de la OMS. Los intervalos en el HU son 0.095 – 0.193. Debido a que los intervalos no se yuxtaponen, puesto que son poblaciones estadísticamente diferentes, el HU evidencia que el porcentaje es mayor que el de la OMS.

La comorbilidad de TBP con diabetes es 10.3 por ciento, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2020) en población de veinte años o más. En

el grupo del HU el porcentaje de comorbilidad de diabetes y TBP fue de 28.9 por ciento, casi el triple de los datos proporcionados por la ENSANUT.

Por otra parte, la OMS informa que existen trescientas cincuenta mil personas con la misma comorbilidad con TB, equivalente a 3.5 por ciento.

Encontramos cinco casos de comorbilidad de tuberculosis pulmonar con VIH y diabetes que representa 2.6 por ciento, ello impulsó una revisión bibliográfica, no se localizó un reporte similar.

Los intervalos de confianza son los siguientes: OMS 0.035 – 0.035, el HU 0.230 – 0.358. Estas cifras muestran que personas estudiadas en el HU presentan mayor intervalo que las de la OMS, en consecuencia, las poblaciones son estadísticamente diferentes.

De las diversas familias de espoligotipos predominantes en Asia Oriental se encuentra el linaje 2 al que pertenece la familia Beijing, ubicada geográficamente en Asia Oriental que incluye China, Corea del Norte, Corea del Sur, Mongolia y Japón.

Es importante señalar que los reportes de familias Beijing en México revelan el paulatino ascenso. En un metaanálisis realizado en diversos países de América Latina se indica que, de dieciséis artículos publicados para un total de mil novecientas una muestras en México, las familias Beijing fueron veinticinco que representan el 1.3 por ciento. En las ciento noventa muestras del presente estudio se identificaron once familias Beijing, todas SIT 1 y porcentaje de 5.8. China posee un porcentaje de Beijing de 83.3 habitantes (Balasanynts *et al.* 2012; Hagiya *et al.* 2016; Meshkov *et al.* 2019).

Es menester definir el avance de la familia Beijing en algunos países, entre ellos México. Es un efecto de migración de Asia Oriental, o visitantes que se contagian y la introducen en sus países, entre otros, México (Liu *et al.* 2018).

O tal vez ambos efectos, como ha sucedido con la COVID-19 (INSP 2021) es preciso mencionar que de los once organismos Beijing identificadas en el presente trabajo, ninguna mostró resistencia genética ni fenotípica a los antituberculosos.

Las resistencias genéticas estudiadas tanto en muestras del HU como en las de la SSANL, así lo constatan. La SSANL, por su parte, no reportó la resistencia genotípica a los antituberculosos, en el grupo HU no se efectuaron estudios con la técnica MGIT. Coincidieron un total de siete de catorce (tabla 16) que corresponde a 50 por ciento. No coincidieron cuatro positivas para Anyplex™ y negativas por MGIT; tres resultaron positivos en MGIT y negativas en Anyplex™; veinticuatro de ciento noventa fueron positivas para Anyplex™ que representa 12.6 por ciento. En el grupo de ciento cincuenta de la SSANL, veintidós de ciento cincuenta, que equivale al 14.7 por ciento. Ninguna de estas variables mostró intervalos de confianza significativos.

De acuerdo con otros trabajos de investigación en donde se genotípica mediante espoligotipificación es frecuente la distribución genética y regional de cepas de *Mycobacterium bovis* (Rodwell *et al.* 2010; Milián Suazo *et al.* 2012). Sin embargo, en este estudio de investigación no se encontró patrón alguno que llevara a identificar a *Mycobacterium bovis* en ninguna de las muestras analizadas.

En su oportunidad es factible cruzar la técnica MGIT con las diversas familias del grupo de la SSANL mediante el programa Excel.

## CONCLUSIONES

1. La distribución de TBP de acuerdo con el sexo en la suma de las poblaciones del HU y SSANL es de 70 por ciento en hombres y de 30 en mujeres.
2. La moda de edad es de 31 a 40 años.
3. El 13.7 por ciento de las personas se encuentran coinfectadas con VIH y en el 31.6 existe comorbilidad con diabetes *mellitus*.
4. La comorbilidad simultánea de diabetes y VIH es de 2.6% en el HU.
5. Las familias de espoligotipos predominantes son X1  $n=46$  (24.2 %), T1  $n=45$  (23.7 %), H3  $n=13$  (6.8 %) y Beijing  $n=11$  (5.8 %).
6. El 12.6 % de los aislados son genotípicamente resistentes.
7. La resistencia genética predominante es rifampicina (*rpoB*) e isoniacida (*katG*).
8. La técnica fenotípica (MGIT) mostró 27% de resistencia a los antituberculosos.
9. La monorresistencia fenotípica predominante es la estreptomocina  $n=13$ .
10. Dos cepas mostraron resistencia fenotípica a los cinco antibióticos.
11. Las técnicas de Anyplex™ (genotípica) y MGIT (fenotípica) no proporcionan resultados coincidentes de resistencia.

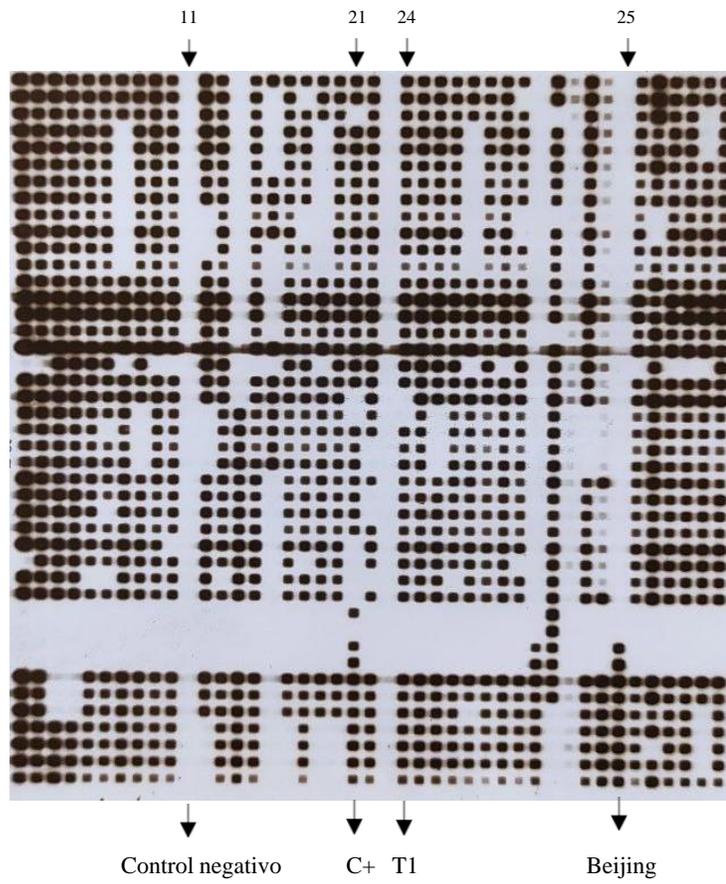
## **PERSPECTIVAS**

- Será conveniente verificar si el hacinamiento en reclusorios incrementa la TBP comparado con la población general.
- Es posible que las nuevas vacunas para coronavirus puedan cambiar la escasa inmunidad de la Calmette-Guérin con cien años de escasos resultados.
- La resistencia MDR y XDR debe modificar el esquema de tratamiento en esta población.
- Establecer la relación genotípica y fenotípica que explique si la resistencia de la familia Beijing se manifiesta solo mediante fenotípica.

# ANEXO 1

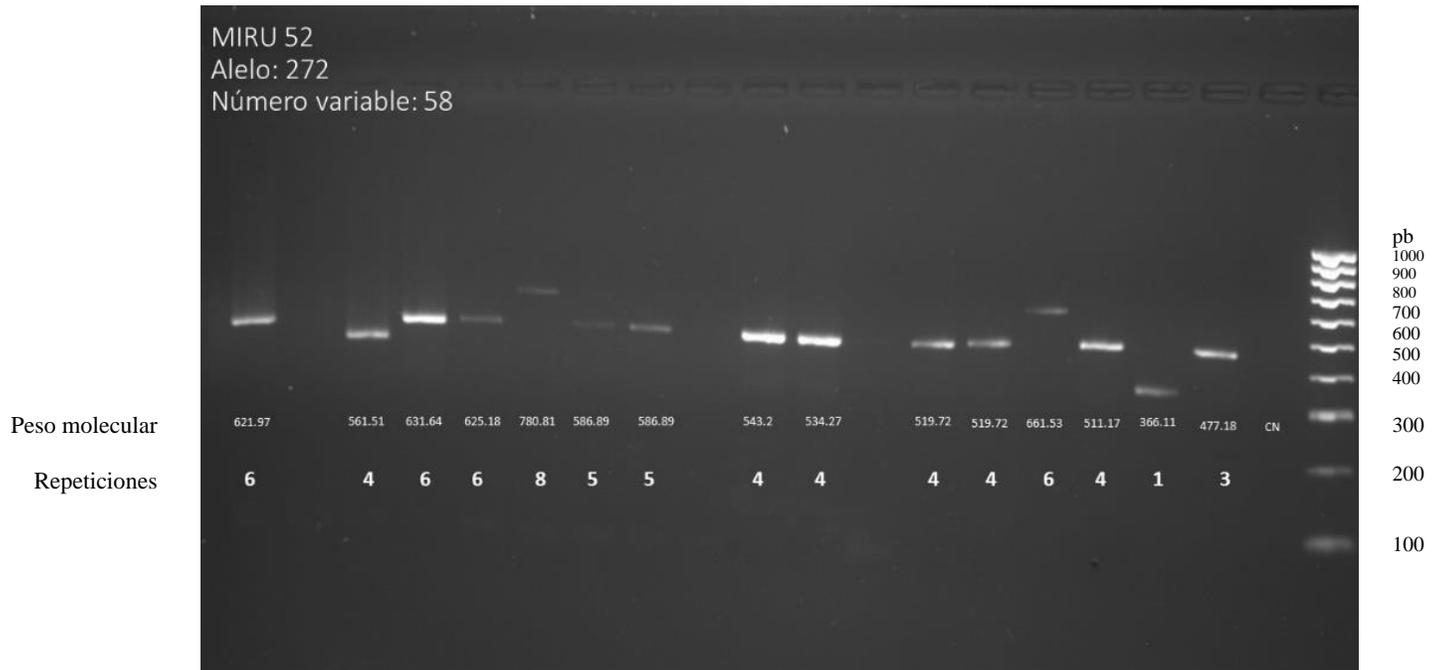
## Espoligotipos en placas radiográficas

Ejemplo.



## Anexo 2

### Ejemplo



### Anexo 3

#### Códigos de genotipificación MIRU-VNTR

ID	424	577	580	802	960	164 4	195 5	2163 b	216 5	240 1	299 6	319 2	369 0	405 2	415 6
4	4	6	3	1	1	3	2	5	4	2	5	4	4	11	2
6	3	4	3	4	7	3	2	3	3	2	5	4	2	9	3
7	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
14	2	5	2	3	0	3	2	5	3	4	4	3	4	7	2
15	2	3	2	4	1	3	1	3	3	4	4	3	4	3	2
17	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
18	2	5	2	3	1	2	1	6	3	4	3	2	1	5	3
19	2	5	2	3	8	10	2	4	2	2	2	5	3	5	3
21	2	6	3	3	4	6	2	5	4	2	2	5	4	2	2
22	1	4	5	2	4	3	10	9	4	2	2	4	2	7	1
23	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
24	5	3	2	4	6	6	3	3	3	5	6	3	3	1	3
25	4	4	2	3	4	7	3	4	2	3	4	4	3	2	2
27	1	5	2	3	3	2	3	3	4	2	5	4	2	4	2
28	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
29	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
31	3	4	4	7	4	5	3	6	4	2	8	5	2	3	2
32	3	6	3	7	3	3	3	2	5	3	8	4	3	0	2
34	3	4	3	5	3	3	1	4	3	2	5	3	4	4	0
35	2	3	2	3	2	3	3	6	3	4	5	3	3	6	3
36	2	3	2	5	4	3	2	3	3	4	6	3	2	1	2
39	2	4	2	4	1	3	2	5	3	4	5	4	1	2	2
40	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
41	2	3	2	3	2	3	3	6	3	4	5	3	3	6	3
42	1	4	5	2	4	3	10	9	4	2	2	4	2	7	1
43	3	4	3	5	3	3	1	4	3	2	5	3	4	4	0

<b>45</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>48</b>	7	4	3	4	5	9	3	4	5	8	5	4	5	6	2
<b>49</b>	7	6	3	5	4	9	2	5	5	8	5	4	7	6	2
<b>50</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>51</b>	1	4	5	2	4	3	10	9	4	2	2	4	2	7	1
<b>52</b>	8	4	2	5	4	9	2	3	4	6	5	4	5	5	3
<b>53</b>	2	4	2	1	3	8	2	5	5	7	6	4	3	5	2
<b>54</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>55</b>	5	5	3	6	3	7	2	3	5	2	4	3	4	6	2
<b>56</b>	8	5	2	2	4	6	2	1	2	1	5	3	3	7	2
<b>57</b>	2	3	2	3	3	7	2	2	3	2	5	4	4	12	2
<b>58</b>	2	2	1	6	4	6	2	3	3	2	5	5	4	5	2
<b>59</b>	1	5	2	3	3	2	3	3	4	2	5	4	2	4	2
<b>60</b>	6	3	2	3	4	9	2	15	6	3	2	8	3	6	3
<b>61</b>	8	6	2	2	5	7	2	2	3	2	5	5	5	6	3
<b>63</b>	4	4	2	1	3	2	3	3	2	1	4	3	2	8	2
<b>64</b>	2	7	4	7	10	10	3	3	3	2	12	11	3	1	2
<b>65</b>	10	8	4	4	4	12	3	3	4	2	2	12	3	0	3
<b>66</b>	4	6	4	4	10	12	3	3	6	9	2	11	5	0	2
<b>67</b>	6	2	3	9	10	11	3	6	5	7	12	12	4	1	2
<b>68</b>	7	2	4	5	6	11	3	8	5	7	14	12	2	3	3
<b>69</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>70</b>	7	7	3	7	8	14	2	4	3	3	5	12	4	0	3
<b>71</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>72</b>	6	7	3	9	9	12	2	3	3	3	10	12	0	2	7
<b>73</b>	8	7	2	3	10	10	2	2	3	2	5	10	2	0	2
<b>74</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>75</b>	6	8	5	6	8	11	2	7	7	2	11	9	2	3	5
<b>76</b>	4	6	3	3	7	11	2	5	3	3	11	6	2	2	2
<b>77</b>	2	3	3	5	7	12	2	4	3	2	11	9	3	0	3

<b>78</b>	4	2	3	6	8	10	2	3	4	5	10	8	3	1	2
<b>79</b>	4	3	3	2	2	9	2	3	2	7	10	9	2	0	2
<b>80</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>82</b>	5	5	8	1	10	7	3	5	2	2	11	9	3	2	3
<b>83</b>	8	5	8	1	3	3	4	5	2	3	11	8	3	12	3
<b>84</b>	6	5	10	1	9	8	4	5	5	2	2	4	3	5	3
<b>85</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>86</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>87</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>88</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>89</b>	2	2	2	0	11	7	3	5	5	6	11	6	6	8	3
<b>90</b>	3	5	2	1	7	7	3	4	4	4	11	7	2	8	2
<b>91</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>92</b>	4	3	8	3	4	10	3	3	3	5	9	8	3	12	5
<b>95</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>104</b>	4	4	2	1	3	2	3	3	2	1	4	3	2	8	2
<b>105</b>	4	4	2	1	3	2	3	3	2	1	4	3	2	8	2
<b>107</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>109</b>	7	6	3	9	11	11	3	4	5	2	6	9	2	12	5
<b>110</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>111</b>	6	7	3	7	9	10	2	4	5	4	6	10	1	9	5
<b>112</b>	1	4	5	2	4	3	10	9	4	2	2	4	2	7	1
<b>113</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>114</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>115</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>116</b>	5	6	2	8	5	9	2	3	4	4	6	4	4	5	2
<b>117</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>118</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>120</b>	4	3	1	5	4	7	2	3	6	2	10	6	2	10	0
<b>121</b>	4	3	1	7	5	8	3	3	3	2	12	4	2	11	1

<b>122</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>123</b>	1	3	1	4	4	8	3	3	5	5	5	7	3	10	0
<b>124</b>	3	4	1	2	4	3	3	3	2	1	11	3	3	7	0
<b>125</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>127</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>128</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>129</b>	2	3	1	4	5	9	2	3	4	5	10	4	3	7	4
<b>130</b>	6	4	2	2	3	7	2	2	3	1	7	3	3	5	0
<b>131</b>	2	3	2	3	2	3	3	6	3	4	5	3	3	6	3
<b>132</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>133</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>134</b>	9	2	1	2	1	9	3	1	4	6	13	3	2	10	3
<b>135</b>	7	2	1	1	4	9	3	1	4	2	11	3	3	10	3
<b>136</b>	0	3	1	7	4	8	2	1	4	1	9	2	2	8	0
<b>137</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>138</b>	1	5	2	3	3	2	3	3	4	2	5	4	2	4	2
<b>139</b>	1	5	2	3	3	2	3	3	4	2	5	4	2	4	2
<b>140</b>	6	2	1	2	4	7	2	2	6	6	11	3	3	6	2
<b>141</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>142</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>143</b>	9	2	0	3	1	8	3	2	7	5	11	4	3	4	2
<b>144</b>	1	4	5	2	4	3	10	9	4	2	2	4	2	7	1
<b>147</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>148</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>149</b>	1	8	2	3	4	6	3	7	8	2	10	4	3	6	1
<b>150</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>151</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>152</b>	2	4	1	2	2	0	3	3	2	3	7	4	4	5	2
<b>153</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>154</b>	2	3	2	3	2	3	3	6	3	4	5	3	3	6	3

<b>155</b>	3	5	2	3	2	3	2	5	4	4	5	3	3	5	2
<b>156</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>157</b>	3	3	2	5	3	3	4	3	3	4	4	3	3	6	1
<b>158</b>	4	3	1	6	4	1	2	3	3	4	7	6	4	6	4
<b>159</b>	2	3	2	3	2	3	3	6	3	4	5	3	3	6	3
<b>160</b>	5	3	1	5	4	3	2	3	2	0	5	6	3	6	2
<b>161</b>	3	4	1	7	3	4	2	4	1	3	5	2	2	5	2
<b>162</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>163</b>	4	2	1	3	5	4	2	3	2	3	5	4	3	6	3
<b>164</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>165</b>	4	4	2	3	3	3	5	6	3	4	5	5	3	8	2
<b>166</b>	2	3	2	5	4	3	4	4	3	4	5	3	6	8	3
<b>167</b>	4	3	1	5	6	4	2	3	2	3	4	4	3	5	2
<b>168</b>	1	2	1	4	3	3	2	4	2	0	4	3	0	5	3

Las imágenes de los anexos son procedentes de los experimentos realizados en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” durante el periodo de 2017 al 2021.

## BIBLIOGRAFÍA

Alp A, Saribaş Z. 2019. [Evaluation of Anyplex MTB/NTM Test for The Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens. *Mikrobiyoloji Bülteni*. Oct;53(4):355-363 doi: 10.5578/mb.67783. PMID: 31709933.

Aminian M, Couvin D, Shabbeer A, Hadley K, Vandenberg S, Rastogi N, et al. 2014. Predicting *Mycobacterium tuberculosis* complex clades using knowledge-based Bayesian networks. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/398484

Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, et al. 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: A tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*® 34(11):2734–2740.

Balasanyns G, Torkaktyuk EA, Isaeva NY. 2012. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Kaliningrad Oblast Russia. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 43rd World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union), Abstract book, Malaysia; 16(12 Suppl 1):228–229 [454 p.].

Bañuls AL, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. 2015. *Mycobacterium tuberculosis*: Ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology*, 64(11):1261–1269.

Brites D y Gagneux S. 2015. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological Reviews*, 264(1):6–24.

Cardona PJ (ed.). 2012. Understanding Tuberculosis – Analyzing the origin of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. doi: 10.5772/2478

Cartes Parra JC. 2013. Breve historia de la tuberculosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 70:605, 145–150.

Casillas Vega N, Mendoza-Olazarán S, Flores Aréchiga A. 2020. Procedimientos de microbiología médica diagnóstica. McGraw Hill: CDMX, pp. 59-63.

Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Hernández-Pando R, Murcia MI. 2019. Circulation of *M. tuberculosis* Beijing genotype in Latin America and the Caribbean. *Pathogens and Global Health* [Internet];113(8):336–3351. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1710066>

Cicero-Sabido R y Meléndez-Mier G. 2018. Inicio del tratamiento farmacológico de la tuberculosis. *Gaceta Médica de México*, 154(5):620–621.

Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, et al. 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics* 45(10):1176–1182.

Daniel TM. The history of tuberculosis. 2006. *Respiratory Medicine*, 100(11):1862–1870.

Daniel VS y Daniel TM. 1999. Old Testament biblical references to tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 29(6):1557–1558.

de Martino M, Lodi L, Galli L, Chiappini E. 2019. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. *Frontiers in Pediatrics*, Aug 27;7:350. doi: 10.3389/fped.2019.00350. PMID: 31508399; PMCID: PMC6718705.

Divangahi M (ed.). 2013. The new paradigm of immunity to tuberculosis. Springer: New York.

ENSANUT. Encuesta nacional de salud y nutrición 2018-19. 2020. Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI). 2021. [Internet] Disponible en: <https://www.insp.mx/produccion-editorial/novedades-editoriales/ensanut-2018-nacionales>

Epperson LE y Strong M. 2020. A scalable, efficient, and safe method to prepare high quality DNA from mycobacteria and other challenging cells. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* [Internet]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2020.100150>

Farga CV. 2004. La conquista de la tuberculosis. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias* [Internet]. (Consultado el 12 de agosto de 2021); 20 (2): 101-108. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-73482004000200009&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482004000200009&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482004000200009>.

Flores-Treviño S, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, González-Díaz E, Pérez-Gómez HR, et al. 2015. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Guadalajara, Mexico and Identification of a Rare Multidrug Resistant Beijing Genotype. *PLoS ONE* 10(2): e0118095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118095>

García DF y Astudillo M. 2019. Genotipificación de aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante MIRU-VNTR, Cali, Colombia, 2013-2015. *Biomédica*. 39(1):71–85.

González-Martin J. 2014. Microbiología de la tuberculosis. *Revista Seminarios de la Fundación Española de Reumatología* 15(1):25–33.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. 2005. Ancient origin, and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*, 1(1):0055–61.

Hagiya H, Koyama T, Zamami Y, Minato Y, Tatebe Y, Mikami N, et al. 2019. Trends in incidence and mortality of tuberculosis in Japan: A population-based study, 1997-2016. *Epidemiology and Infection*, 147, 1-10.

Hernández-Pando R, Orozco EH, Aguilar LD, López Casillas F, Rook G. 2004. Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquímico*, 129-153.

Igarashi Y, Chikamatsu K, Aono A, Yi L, Yamada H, Takaki A, et al. 2017. Laboratory evaluation of the Anyplex™ II MTB/MDR and MTB/XDR tests based on multiplex real-time PCR and melting-temperature analysis to identify *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [Internet]. 89(4):276–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.016>

Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 sobre Covid-19. Resultados nacionales. 2021. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2020/doctos/informes/ensanutCovid19ResultadosNacionales.pdf>

Koch A Mizrahi V. 2018. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, Jun;26(6):555-556. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.012. Epub Mar 23. PMID: 29580884.

Ledermann DW. 2003. En los 500 años del descubrimiento: Colones y Pinzones de la microbiología. *Revista Chilena de Infectología*, 20:18–20.

Ledermann DW. 2003. La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. *Revista Chilena de Infectología*, 20:48–50.

Liu Y, Zhang X, Zhang Y, Sun Y, Yao C, Wang W, et al. 2018. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Beijing, China: Drug susceptibility phenotypes and Beijing genotype family transmission. *BMC Infectious Diseases*, 18(1):1–11.

Meshkov I, Petrenko T, Keiser O, Estill J, Revyakina O, Felker I, et al. 2019. Variations in tuberculosis prevalence, Russian Federation: A multivariate approach. *Bulletin of the World Health Organization*, 97(11):737-745A.

Milián Suazo F, García Casanova L, Romero Torres C, Cantó-Alarcón GJ, Gutiérrez Reyes A, et al. 2012. Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* del ganado en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, oct./dic. 3(4): 459-471. [Internet, consultado el 18 de septiembre de 2020] Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S20071124201200040005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S20071124201200040005)

Molina López J, Manjarrez Zavala ME, Zavala Jt. 2010. Microbiología, bacteriología y virología. Méndez Editores: México, pp. 197-198.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2021. Microbiología médica, 9a. ed. Elsevier: Barcelona España, pp. 277-280. [868 p.]

Nachiappan AC, Rahbar K, Shi X, Guy ES, Mortani Barbosa EJ Jr, Shroff GS, Ocazionez D, Schlesinger AE, Katz SI, Hammer MM. 2017. Pulmonary Tuberculosis: Role of Radiology in Diagnosis and Management. *RadioGraphics*, Jan-Feb;37(1):52-72. doi: 10.1148/rg.2017160032. PMID: 28076011.

O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. 2013. The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31:475–527.

Organización Mundial de la Salud. 2020. Informe mundial sobre la tuberculosis. OMS.

Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) / Organismo Andino de Salud – Convenio Hipólito Unanue, Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas”. (SICA). 2018. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: Manual de actualización de la baciloscopia.

Pai M, Behr M. 2016. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection and interferon-gamma release assays. *Microbiology Spectrum*, 4(5). PMID: 27763261. doi: 10.1128/microbiolspec.

Peñuelas-Urquides K, Castorena-Torres F, Silva Ramírez B, Bermúdez de León M. 2018. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Mycobacterium – Research and Development*. Wellman Ribón (ed.), IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.69656. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/57080>

Perciaccante A, Charlier P, Coralli A, Deo S, Appenzeller O, Bianucci R. 2019. Exploring Disease Representation in Movies. *Journal of General Internal Medicine*, 34(11):2351–2354.

Pezzella AT. 2019. History of Pulmonary Tuberculosis. *Thoracic Surgery Clinics* [Internet]. 29(1):1–17. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.09.002>

Riedel S, Hobden JA, Morse SA, Mietzner TA, Miller S. 2020. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, 28 e. McGraw Hill/Lange: México.

Rodwell TC, Kapasi AJ, Moore M, Milian-Suazo F, Harris B, Guerrero LP, et al. 2010. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 14(SUPPL.3): e129–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.11.037>

Rovello G, Andriani A, Brambilla S, Bossi D, Riva MA. 2018. Oscar-nominated movies and the epidemiology of tuberculosis in the past 90 years. *American Journal of Infection Control* [Internet]. 46(9):1082. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.05.006>

Ryan F. 1993. *The forgotten plague: How the battle against tuberculosis was won – and lost*. Little, Brown: New York. 460 p.

Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Molina-Morant D, Molina I. 2018. Tuberculosis and immigration. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 36(7):446–455. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2017.10.006>

Scriba TJ, Coussens AK, Fletcher HA. 2017. Human immunology of tuberculosis. *Tuberc Tuberc Bacillus* Second Ed. 213–237.

Scribd. 2020. La Chacha Micaila, [www.scribd.com/document/451906243/LA-CHACHA-MICAILA](http://www.scribd.com/document/451906243/LA-CHACHA-MICAILA)

Shi J, Zheng D, Zhu Y, Ma X, Wang S, Li H, et al. 2018. Role of MIRU-VNTR and spoligotyping in assessing the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Henan Province, China. *BMC Infectious Diseases*, 18(1):1–12.

Stone A. 2017. Tracking a killer: The origin and evolution of tuberculosis. The Leakey Foundation Conference.

Struthers K. 2018. Microbiología clínica. El Manual Moderno: Ciudad de México, pp. 151-162.

Supply P. 2005. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille [Internet] (May):73. Disponible en: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces>

Vera-Cabrera L, Ramos-Alvarez J, Molina-Torres CA, Rivera-Morales LG, Rendón A, Quiñones-Falconi F, *et al.* 2014. Comparative *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype distribution in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8):3049–3052.

Viveros-Luna D, Lefort B, Rendón-Bautizta L, Zenteno-Cuevas R. 2020. Genotipificación y epidemiología molecular de tuberculosis; su utilidad para la salud. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 20(2), 27-34.

Woodman M, Haeusler IL, Grandjean L. 2019. Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective. *Genes (Basel)*. 10(1).