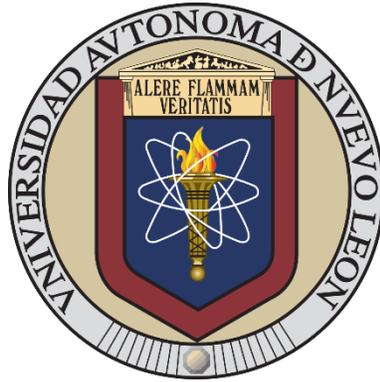


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DE LA CIUDAD DE
MONTERREY”**

PRESENTA:
QC. / IBt. ALDAIR OCHOA ROJAS

TESIS COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

JULIO DE 2024

“Alere Flamman Veritatis”

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina y Hospital Universitario

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, UANL

Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, UANL

Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

“Epidemiología molecular de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de la ciudad de Monterrey”

Trabajo de tesis de que como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Presenta:

QC. / IBt. Aldair Ochoa Rojas

Director:

Dr. C. Lucio Vera Cabrera

Co-Directora:

Dra. C. Carmen Amelia Molina Torres

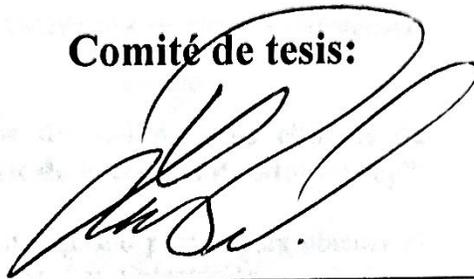
Miembro de la comisión:

Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

“Alere Flamman Veritatis”

**“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DE LA
CIUDAD DE MONTERREY”**

Comité de tesis:



Dr. C. Lucio Vera Cabrera

Director



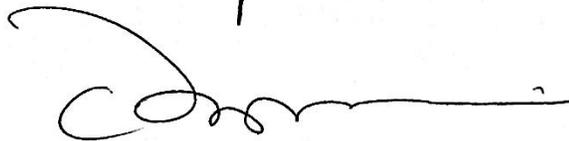
Dra. C. Carmen Amelia Molina Torres

Co-Directora



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

Miembro de la comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DE LA CIUDAD DE MONTERREY”

Proyecto revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León con número de registro DE23-00008.

Trabajo realizado en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina.

DERECHOS RESERVADOS[©]

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, 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

Al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina (UANL), al Centro de Investigación e Innovación en Virología Médica (UANL) y al Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (Hospital Universitario) por permitirme hacer uso de sus instalaciones para la realización del trabajo.

A la comisión de tesis: Dr. C. Lucio Vera Cabrera, Dra. C. Carmen Amelia Molina Torres, Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla, por sugerir e implementar la realización del proyecto.

Al Dr. Jorge Ocampo Candiani y al Dr. E. Jorge M. Llaca Díaz, por colaborar con el grupo de trabajo en la aportación de material y gestión administrativa.

A los estudiantes de M.C.P. José Alejandro Ruiz Garza y Daniela Quintero López, por contribuir arduamente en el logro del proyecto en sí.

A la Dra. C. Elvira Garza González y su estudiante de posgrado, Q.C.B. Luis Ángel Núñez García, por sus acertados consejos y recomendaciones, que fueron de suma ayuda y dirección.

A la Dra. C. Ana Laura Calderón Garcidueñas, por impulsarme a realizar este posgrado.

A mis amigas, amigos, compañeras y compañeros, –me faltaría espacio para detallarlos a todos porque, orgullosamente, han sido muchos–, que me acompañaron en el camino, y me enseñaron cosas más allá del aprendizaje académico.

A mi familia, C. Areli Rojas Rivera, por ofrecer su apoyo aun en la distancia.

A las Q.F.B. Anabel Gallardo Rocha, Q.C.B. Mayra Guadalupe Cantú Álvarez, y Q.F.B. Wendy Guadalupe Escalante Fuentes, equipo base del LIID, cuyo apoyo y amistad valoraré por siempre.

A mi gata, Chachita, porque su compañía nunca faltó, menos en los momentos más densos.

DEDICATORIAS

A mi yo del pasado, porque nunca se esperó lograr tanto.

A mi yo del futuro, para cuando mire hacia atrás no olvide todo lo que ha recorrido.

A mi yo del presente, porque aún le cuesta dar su propio mérito.

A toda aquella persona que lea esta hoja, y recuerde los momentos que hemos pasado y aprendido.

Por la experiencia aprendida.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
GLOSARIO.....	x
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN	15
I. MARCO TEÓRICO.....	16
1. Tuberculosis.....	16
1.1. <i>Impacto en la salud pública y epidemiología</i>	16
1.2. <i>Signos y síntomas</i>	20
1.3. <i>Tratamiento</i>	21
2. Descripción de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.1. <i>Infectómica y patogénesis</i>	22
2.2. <i>Descripción molecular</i>	24
3. La biología molecular en el estudio de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
3.1. <i>Espoligotipificación</i>	25
3.2. <i>Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de elemento genético transponible IS6110 (RFLP IS6110)</i>	26
3.3. <i>Caracterización mediante análisis de Unidades Repetitivas Interespaciadas de Micobacterias-Número Variable de Repeticiones en Tándem (MIRU-VNTR)</i>	27
3.4. <i>Determinación de patrones de resistencia a los antimicrobianos mediante análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)</i>	28
3.5. <i>qPCR por GeneXpert®</i>	29
3.6. <i>Secuenciación de genoma completo (Whole Genome Sequencing, WGS)</i>	29
<i>Resolución de la epidemiología molecular</i>	30
<i>Identificación de RAM</i>	30
<i>Detección de mutaciones asociadas con la virulencia</i>	31
<i>Estudios de genómica comparativa</i>	31
<i>Desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas</i>	31
JUSTIFICACIÓN	32

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	33
General	33
Específicos	33
II. MATERIALES Y MÉTODOS	34
Lugar y autorización del estudio	34
Población de estudio	34
<i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	34
Manejo de muestras	34
<i>Base de datos clínicos y epidemiológicos</i>	34
<i>Recepción de muestras biológicas</i>	35
<i>Aislamiento de ADN genómico de MTB</i>	36
Secuenciación de genoma completo (WGS) por Illumina MiSeq	37
<i>Preparación de biblioteca genómica (genoteca) con Nextera XT</i>	37
<i>Parámetros de secuenciación con Illumina MiSeq</i>	38
<i>Configuración de ejecución de MiSeq</i>	38
<i>Control de calidad durante la secuenciación</i>	39
<i>Consideraciones posteriores a la secuenciación</i>	39
Proceso bioinformático	39
<i>Ensamblaje del genoma completo de MTB con la herramienta BV-BRC</i>	40
<i>Análisis completo del genoma de MTB con la herramienta BV-BRC</i>	41
<i>Construcción de árbol filogenético de especies de MTBC con la herramienta BV-BRC</i>	43
<i>Diseño y personalización de árboles filogenéticos con la herramienta iTOL</i>	44
<i>Análisis genómico, asignación de linajes e identificación de mutaciones asociadas a RAM con herramienta TB-Profiler</i>	47
<i>Espoligotipificación in silico en la base de datos SITVIT2</i>	50
Análisis estadístico	52
IV. RESULTADOS.....	54
Descripción epidemiológica de la población de estudio:	54
Secuenciación de Genoma Completo y asignación de linajes del MTBC a los aislados clínicos de MTB:	57
Análisis filogenético de los perfiles de las secuencias de MTB obtenidas:	62
V. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81

Aspectos Demográficos y Clínicos:	81
Linajes y Sublinajes de MTBC:	82
Espoligotipos:	84
Resistencia Antimicrobiana:	85
Relaciones entre Variables:	86
Análisis filogenético:	86
Relación demográfica:	87
Implicaciones para la Salud Pública:	88
<i>Vigilancia epidemiológica:</i>	88
<i>Tratamiento específico:</i>	88
<i>Desarrollo de estrategias de control:</i>	88
Limitaciones y Recomendaciones:	89
VI. CONCLUSIONES	90
Perspectivas	91
REFERENCIAS	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Esquema estándar de tratamiento para todas las formas de tuberculosis recomendado por la OMS.....	20
Tabla 02. Frecuencias por municipio de residencia reportados en la población de estudio.....	56
Tabla 03. Perfil genómico dentro del MTBC de las cepas de estudio.....	57
Tabla 04. Frecuencias de los sublinajes encontrados en la población de estudio	59
Tabla 05. Frecuencias de las subfamilias del MTBC de la población de estudio	60
Tabla 06. Perfil genómico de espigotipos circulantes en la población de estudio, de acuerdo con la base de datos SITVIT2.....	62
Tabla 07. Frecuencias de los espigotipos circulantes entre la población de estudio.....	65
Tabla 08. Frecuencias de los grupos o clados circulantes de acuerdo con el SITVIT, en la población de estudio	66
Tabla 09. Mutaciones detectadas en los perfiles genómicos de MTB-RAM	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasas estimadas de incidencia de tuberculosis del 2022	17
Figura 2. Incidencia de tuberculosis en México (2021)	18
Figura 3. Casos de tuberculosis, por edad y sexo, en México, 2021	19
Figura 4. Panorama de la infección por Mycobacterium tuberculosis	24
Figura 5. Pirámide poblacional de los 60 pacientes diagnosticados con TB en el Hospital Universitario, durante el período 2021 – 2023, y analizados en este estudio	55
Figura 6. Comorbilidades reportadas en la población de estudio	55
Figura 7. Diagrama de dispersión de edad y comorbilidades de la población de estudio	56
Figura 8. Ejemplo representativo del genoma completo de M. tuberculosis obtenido	57
Figura 9. Agrupación de sublinajes del MTBC de la población de estudio	61
Figura 10. Agrupación de subfamilias del MTBC de la población de estudio	62
Figura 11. Perfil (genómico) de susceptibilidad a los antimicrobianos y linajes del MTBC que lo presentan	69
Figura 12. Correlación del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y el tipo de familia del MTBC	70
Figura 13. Correlación del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y sublinajes del MTBC	70
Figura 14. Árbol filogenético de las 60 secuencias de M. tuberculosis analizadas en este estudio	73
Figura 15. Árbol filogenético de MTB con perfiles RAM y mutaciones asociadas a ello	75
Figura 16. Agrupación de perfiles de MTB RAM y entidad federativa de origen	76
Figura 17. Agrupación de perfiles de MTB RAM y municipio de residencia	77
Figura 18. Árbol filogenético de MTB con perfiles RAM y sus mutaciones asociadas	78
Figura 19. Agrupación de sublinajes del MTBC de cepas RAM y entidad federativa de origen	79
Figura 20. Agrupación de esplogotipos de cepas con RAM y entidad federativa de origen	80

GLOSARIO

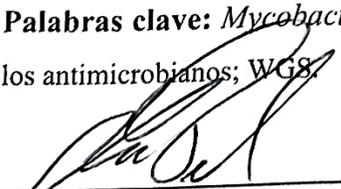
ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BAAR	Bácilo Ácido-Alcohol-Resistente
CENAPRE	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
COVID-19	Enfermedad infecciosa por Coronavirus del 2019
DM	Diabetes Mellitus
E	Etambutol
H	Isoniazida
HR-TB	Tuberculosis de alto riesgo
IMSS	Instituto Mexicano de Seguro Social
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
LIID	Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica
MDR-TB	Tuberculosis Multidrogorresistente
MIRU-VNTR	Unidades Repetitivas Interespaciadas de Micobacterias- Número Variable de Repeticiones en Tándem
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud

OPS	Organización Panamericana de la Salud
Pre-XDR-TB	Tuberculosis Pre-Extremadamente Resistente
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
R	Rifampicina
RAM	Resistencia a los Antimicrobianos
RR-TB	Tuberculosis Resistente a Rifampicina
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNP	Polimorfismos de un Solo Nucleótido
SS	Secretaría de Salud
TAES	Tratamiento Acordato Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TB-EP	Tuberculosis Extrapulmonar
TB-P	Tuberculosis pulmonar
TB-TF	Tuberculosis de Todas las Formas
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WGS	Secuenciación de Genoma Completo
Z	Pirazinamida

RESUMEN

Las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* son una emergencia global de salud pública debido a sus altas tasas de mortalidad y morbilidad. Existe tratamiento bien establecido para la enfermedad, no obstante, la resistencia los antimicrobianos (RAM) está actualmente en aumento. La secuenciación del genoma completo (WGS) permite realizar análisis exhaustivos de epidemiología molecular, sin embargo, México tiene escasos estudios con esta técnica, por lo que llevarlo a cabo en la zona Metropolitana de Monterrey, una región de alta afluencia poblacional, aportará información significativa de la infección. **Objetivo:** Determinar la epidemiología molecular de los linajes circulantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), y sus patrones genómicos de susceptibilidad a los antimicrobianos, de aislados clínicos de tuberculosis en la zona Metropolitana de Monterrey. **Metodología:** Se recolectaron 60 muestras con diagnóstico confirmado de tuberculosis en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, durante el periodo 2021–2023; los aislados fueron procesados y sometidos a WGS por Illumina® MiSeq™. El análisis bioinformático incluyó herramientas en línea: TB-Profiler, SITVIT2, BV-BRC. **Resultados:** El 90% (n=54) de los casos correspondieron al Linaje 4, predominando los sublinajes 4.1.1.3 (n=11, 18.3%) y 4.1.1 (n=8, 13.3%), El espoligotipado determinó alta frecuencia de SIT119 (n=13, 21.7%) y SIT53 (n=8, 13.3%). Respecto a patrones genómicos de susceptibilidad a los antimicrobianos, 58.3% (n=35) de los casos fueron sensibles, 5% (n=3) multidrogoresistentes (MDR), y 1.7% (n=1) extremadamente MDR; Las mutaciones asociadas a ello incluyen: *rpoB* (Ser450Leu), *ahpC* (Asp73His), *katG* (Ser315Thr), *emb* (Met306Ile) y *pncA* (Gly78Asp). Tales mutaciones, predominan en el sublinaje 4.1.1.3 (n=9/11) de la subfamilia X1. Finalmente, el análisis filogenético mostró agrupaciones no clonales entre aislados con similares mutaciones. **Conclusión:** El sublinaje de mayor frecuencia circulando en la zona Metropolitana de Monterrey en el período 2021-2023 fue el 4.1.1.3, presentando mutaciones asociadas a la RAM, principalmente en casos de la subfamilia X1, y el espoligotipo SIT119.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis; Espoligotipificación; Resistencia a los antimicrobianos; WGS.

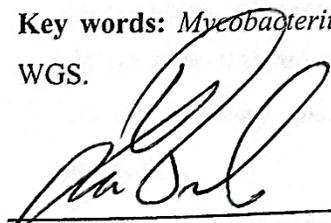


Dr. C. Lucio Vera Cabrera

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis infections are a global public health emergency due to their high mortality and morbidity rates. There is a well-established treatment for the disease, however, antimicrobial resistance (AMR) is still on the rise. Whole genome sequencing (WGS) allows for exhaustive analyzes of molecular epidemiology; however, Mexico has few studies with this technique, so carrying it out in the Metropolitan area of Monterrey, a region of high population affluence, will provide significant information of the infection. **Objective:** To determine the molecular epidemiology of the circulating lineages of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), and their genomic patterns of susceptibility to antimicrobials, of clinical isolates from the Metropolitan area of Monterrey. **Methodology:** 60 samples with a confirmed diagnosis of tuberculosis were collected at the “Dr. José Eleuterio González” Hospital, during the period 2021–2023; isolates were processed and subjected to WGS by Illumina® MiSeq™. Bioinformatic analysis included online tools: TB-Profler, SITVIT2, BV-BRC. **Results:** 90% (n=54) of the cases corresponded to Lineage 4, predominating sublineages 4.1.1.3 (n=11, 18.3%) and 4.1.1 (n=8, 13.3%), Spoligotyping determined high frequency of SIT119 (n=13, 21.7%) and SIT53 (n=8, 13.3%). Regarding genomic patterns of susceptibility to antimicrobials, 58.3% (n=35) of cases were sensitive, 5% (n=3) multidrug resistant (MDR), and 1.7% (n=1) extremely MDR; Mutations associated with this include: *rpoB* (Ser450Leu), *ahpC* (Asp73His), *katG* (Ser315Thr), *emb* (Met306Ile) and *pnca* (Gly78Asp). Such mutations predominate in sublineage 4.1.1.3 (n=9/11) of the X1 subfamily. Finally, phylogenetic analysis showed non-clonal groupings among isolates with similar mutations. **Conclusion:** The most frequent sublineage circulating in the Metropolitan area of Monterrey in the period 2021-2023 was 4.1.1.3, presenting mutations associated with RAM, mainly in cases of the X1 subfamily, and spoligotype SIT119.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis; Spoligotyping; Antimicrobial resistance; WGS.



Dr. C. Lucio Vera Cabrera

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis, una emergencia global en salud pública debido a la alta morbilidad y mortalidad que causa. Es una infección que afecta a personas de todas las edades, con una predominancia en personas del sexo masculino en una relación de 3:1. Además, representa una de las principales causas de muerte en pacientes con coinfección activa por VIH (OMS, 2023).

M. tuberculosis presenta una naturaleza resistente y adaptable a diversos entornos, lo que se traduce en su éxito de pato-adaptabilidad. Además, la creciente ganancia de fenotipos de resistencia a los antimicrobianos dificulta su manejo, pues las opciones terapéuticas son limitadas. Parte de este éxito se debe al cambio en su genoma a lo largo del tiempo, dejando como resultado distintos linajes a través del mundo. (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015)

La biología molecular es una herramienta que ha permitido el estudio minucioso y el seguimiento de *M. tuberculosis*. Hoy día se continúan empleando técnicas clásicas, como el espoligotipado, para la caracterización de este microorganismo y sus complejos (Viveros Luna y otros, 2021). Diversos trabajos en México han demostrado que los linajes predominantes de *M. tuberculosis* son SIT53 y SIT119, entre otros más, sin embargo, se ha observado que estos se han presentado en diferentes proporciones de acuerdo con la región y tiempo de estudio (Jiménez Ruano y otros, 2021). Por tal motivo se requiere un estudio continuo y minucioso de su epidemiología molecular.

El presente estudio pretende determinar los linajes de *M. tuberculosis* que circulan actualmente (2021 – 2023) entre aislados clínicos de pacientes que acuden al Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, el cual al estar ubicado en una zona metropolitana de alta afluencia puede proporcionar información valiosa acerca de las correlaciones entre linajes y datos clínicos de interés. Así mismo, se conocerán los patrones genéticos de resistencia a los antimicrobianos, y su correlación frente a datos clínicos y/o demográficos de interés cuya información permitirá orientar a mejores estrategias terapéuticas.

I. MARCO TEÓRICO

1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad antigua que representa uno de los principales retos en salud pública; fue la primera enfermedad en la que se demostró de manera convincente la transmisión por vía aérea después de muchas décadas de dudas (Fennelly y otros, 2022), y si bien en los años recientes el mundo puso su atención en la pandemia por enfermedad de coronavirus del 2019 (COVID-19), no es de desconocimiento que la epidemia por TB continúa siendo una emergencia global (Koegelenberg y otros, 2021) debido a sus altos índices de morbilidad y mortalidad.

La TB es una infección causada por el bacilo ácido-alcohol-resistente (BAAR) *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), también conocido como el “bacilo de Koch”. Afecta principalmente pulmones, a través de la transmisión por vía aérea, aunque puede diseminarse a otros sitios anatómicos y adaptarse con éxito. En personas fisiológicamente sanas no suele causar síntomas (OPS, 2023), sin embargo, suele afectar a grupos vulnerables como: pacientes pediátricos y geriátricos, personas con un sistema inmunocomprometido, pacientes que cursen con infección activa por VIH y SIDA, personas enfermas con diabetes mellitus (DM), personas fumadoras, y personas con desnutrición (IMSS, 2022). Aunado a lo anterior, existen diversas variables relacionadas con la prevalencia de la enfermedad en distintos países, tales como: el difícil acceso a sistemas efectivos en salud, condiciones socioeconómicas y sociodemográficas desfavorables, malas condiciones en calidad de vida, entre otras; dificultando con ello el control más efectivo de la infección.

Si bien la TB es una enfermedad tratable y prevenible, la naturaleza de MTB suma otros retos a afrontar su manejo, pues la creciente pato-adaptación y ganancia de fenotipos de resistencia a los antimicrobianos (RAM) contribuye a su alta morbilidad y mortalidad. Por tanto, es necesaria su continua vigilancia e implementación de proyectos de innovación, desarrollo e investigación (I+D+I) en virtud de un manejo adecuado de la enfermedad.

1.1. Impacto en la salud pública y epidemiología

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2022 la TB fue la segunda enfermedad infecciosa con mayor

mortalidad en todo el mundo, sólo superada por COVID-19. En relación con ello, la TB fue la principal causa de muerte entre las personas con VIH y una de las principales causas de muertes relacionadas con la RAM (OPS, 2023).

En el Reporte Global de Tuberculosis del 2023 de la OMS se estimó que, en el 2022 a nivel mundial, 10.6 millones de personas enfermaron de TB, y 1.3 millones fallecieron a causa de esta. De estos casos, 167,000 cursaban igualmente con infección por VIH. Cabe mencionar que el riesgo de enfermarse por TB es mucho mayor en personas con sistemas inmunitarios debilitados, por lo que personas con infección por VIH activa tienen 16 veces más probabilidades de enfermarse con TB (OMS, 2023). Geográficamente, la mayoría de las personas que enfermaron de TB vivían en las Regiones de la OMS de Asia Sudoriental (46%), África (23%) y el Pacífico Occidental (18%), con porcentajes menores en el Mediterráneo Oriental (8,1%), las Américas (3,1%) y Europa (2,2%) (OMS, 2023) (Figura 1).

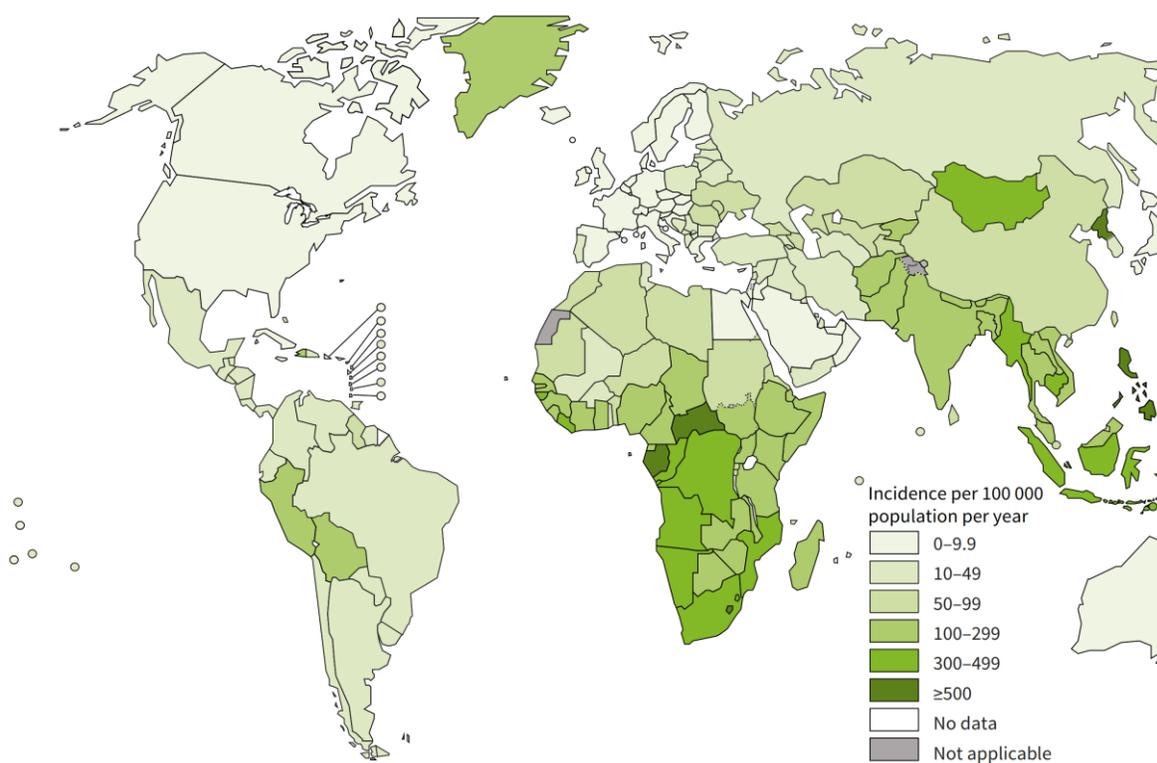


Figura 1. Tasas estimadas de incidencia de tuberculosis del 2022

Tomado de: “Estimated TB incidence rates, 2022” por OMS, 2023, *Global Tuberculosis Report*.

En la región de las Américas, en 2022, se estimaron 325,000 casos nuevos de TB, de los cuales 194,960 se conocía su estado de coinfección con VIH. Además, se registraron

35,000 muertes a causa de TB, de las cuales 11,000 correspondieron a la coinfección por TB/VIH (OPS, 2023).

A nivel nacional, en México se registró una incidencia en 2022 de aproximadamente 25 casos por cada 100,000 habitantes, donde alrededor del 30% de personas portadoras de MTB lo desconoce (INSP, 2023) (SS, 2023). Esto contrasta con información del 2019 y 2021, donde se registraron 22,285 y 20,225 casos nuevos respectivamente; de los cuales el 63% correspondía a personas del sexo masculino y el 37% al sexo femenino, afectando a personas de todas las edades, pero con predominio en personas de 20 a 54 años. Por entidad federativa, Baja California y Sonora se han mantenido como los Estados con mayor tasa de incidencia (>35%) en los últimos años. Por su parte, el estado de Nuevo León ha fluctuado con una incidencia de moderada a alta, siendo que en 2021 se registró una tasa de 27.8, cuyo valor supera la media nacional de 15.7 de ese mismo año (CENAPRE, 2021) (Luna López y otros, 2021). (Figuras 2 y 3).

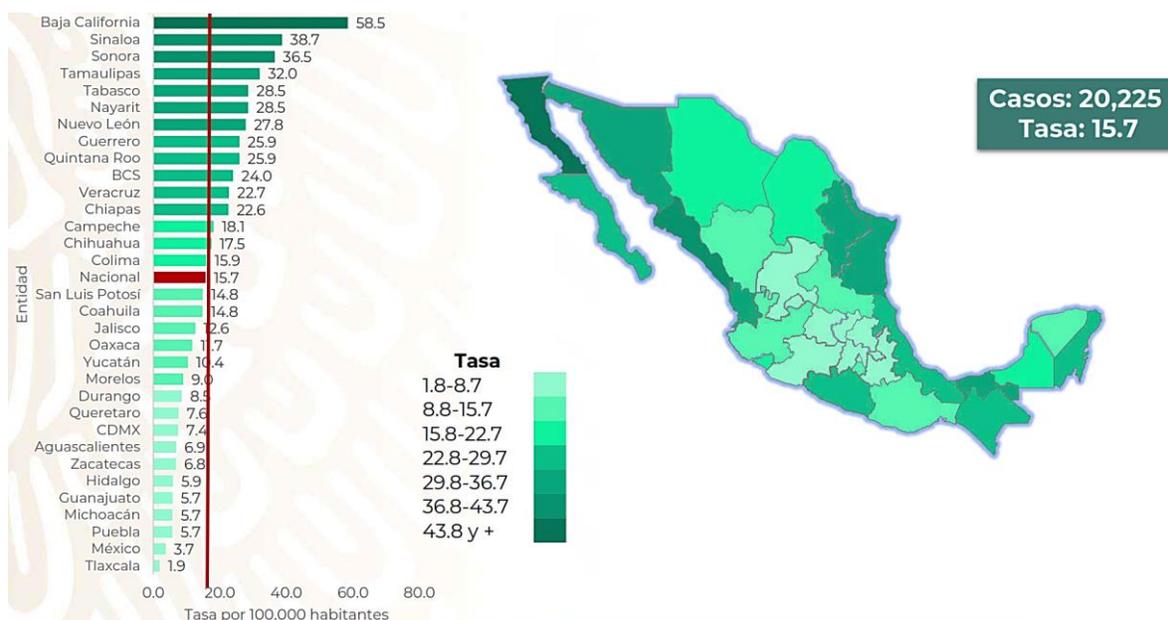


Figura 2. Incidencia de tuberculosis en México (2021)

Tomado de: “Incidencia de tuberculosis todas formas, México, 20201*.”, por CENAPRECE, 2021,

Continuemos este 2022, trabajando unidos para poner fin a la tuberculosis.

<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/722796/1.-SITUACION EPIDEMIOLOGICA 2021 preliminar.pdf>

Casos de Tuberculosis, por grupo etario y sexo, en México, 2021*

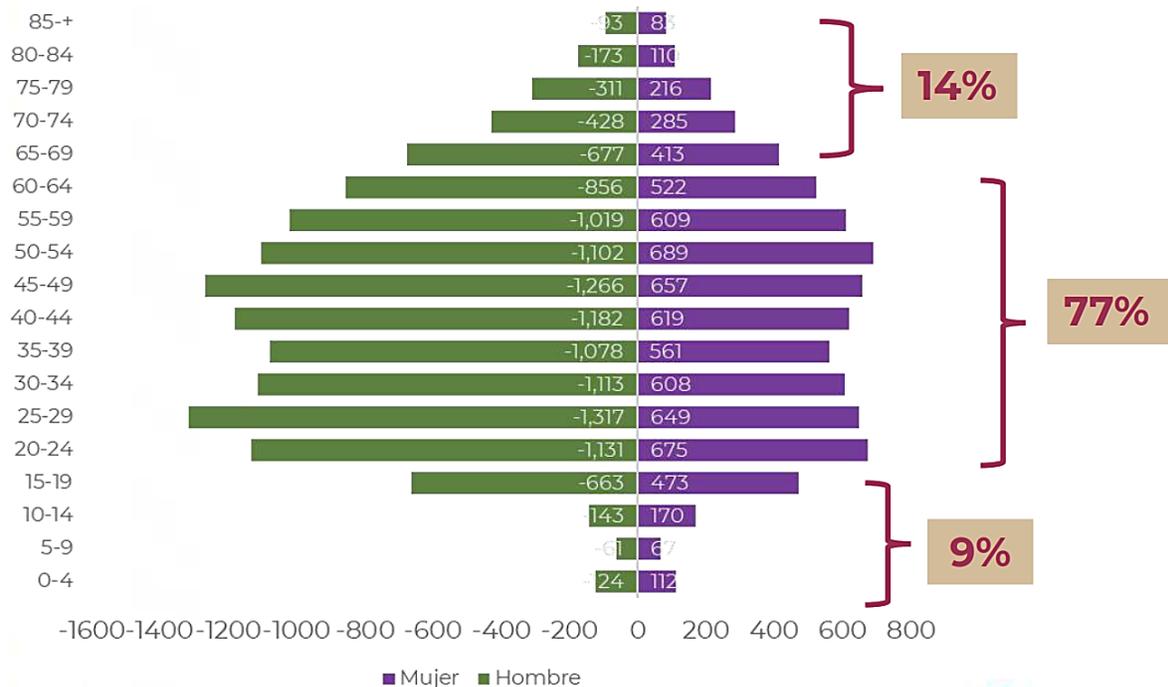


Figura 3. Casos de tuberculosis, por edad y sexo, en México, 2021

Tomado de: “Tuberculosis en México, 2021*”, por CENAPRECE, 2021, *Continuemos este 2022, trabajando unidos para poner fin a la tuberculosis*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/722796/1.-SITUACION EPIDEMIOLOGICA 2021_preliminar.pdf

Por otro lado, a la emergencia global de TB se suman los casos de tuberculosis multirresistente (TB-MDR), de los cuales se registraron 410,000 casos contraídos en el 2022; en este grupo sólo dos personas de cada cinco tuvieron acceso a tratamiento (OMS, 2023).

Con todo lo anterior, queda claro que la TB es un problema de suma importancia en la salud pública, por lo que acabar con tal infección hacia el 2030 es una de las metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) relacionadas con la salud (OMS, 2023). Éste plan tiene 3 indicadores de alto nivel: a) reducir el número de muertes por tuberculosis en un 95% comparado con 2015, b) reducir los nuevos casos en un 90% entre 2015 y 2035, y c) garantizar que ninguna familia enfrente costos catastróficos debidos a la tuberculosis (OPS, 2023).

“Cada año, el 24 de marzo, conmemoramos el Día Mundial de la Tuberculosis para sensibilizar a la opinión pública sobre las devastadoras consecuencias sanitarias, sociales y económicas de la TB, y para redoblar los esfuerzos para acabar con la epidemia mundial de TB [...].

El tema del Día Mundial de la Tuberculosis 2023 “¡Sí! ¡Podemos poner fin a la TB!”- transmite un mensaje de esperanza de que es posible volver a encaminarse para cambiar la tendencia de la epidemia de tuberculosis a través de un liderazgo de alto nivel, un aumento de las inversiones, una adopción más rápida de las nuevas recomendaciones de la OPS/OMS y la adopción de innovaciones, una acción acelerada y una colaboración multisectorial.” (OPS, 2023).

1.2. Signos y síntomas

La TB clásica o pulmonar (TB-P) se caracteriza por ser una afección del sistema respiratorio, por lo que se presenta con tos prolongada, producción de esputo (algunas veces con presencia de sangre), dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración excesiva (particularmente por la noche) (IMSS, 2022).

En caso de ocurrir una diseminación hematológica y/o linfática de MTB, se desarrolla una tuberculosis extrapulmonar (TB-EP), representando alrededor de un 25% de tuberculosis de todas las formas (TB-TF) (Ramírez Lapausa y otros, 2015).

Si bien la TB-EP puede afectar a cualquier órgano y tejido, algunas de las más comunes son:

- *Tuberculosis ganglionar:* Afecta los ganglios linfáticos, especialmente en el cuello, axilas e ingle. Se presenta con adenomegalia, fiebre, y pérdida de peso.
- *Tuberculosis pleural:* Afecta la pleura, membrana que recubre los pulmones. Se presenta con dolor pleurítico, disnea y derrame pleural.
- *Tuberculosis meníngea:* Afecta las meninges, las membranas que recubren el cerebro y la médula espinal. Se presenta con fiebre, cefalea, rigidez de nuca, y cambios en el estado mental. (Hernández Solís y otros, 2023)
- *Tuberculosis ósea:* Afecta los huesos y las articulaciones. Se presenta con dolor, inflamación y deformidad.
- *Tuberculosis genitourinaria:* Afecta los órganos del sistema reproductor y urinario. Se presenta con dolor abdominal, disuria, hematuria y urogenital.

- *Tuberculosis miliar*: Es una forma diseminada de la enfermedad que afecta a varios órganos del cuerpo. Se presenta con fiebre, pérdida de peso, y afectación del estado general. (Zumla y otros, 2013)

1.3. Tratamiento

Mycobacterium tuberculosis presenta una cubierta rica en lípidos, confiriéndole resistencia a diversos antimicrobianos, por lo que se cuentan con pocas opciones terapéuticas. Las personas con TB-P deben de someterse al Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), cuya duración es de 6 meses y en caso de abandono éste debe ser reiniciado en su totalidad (IMSS, 2022). Dentro del TAES se consideran los siguientes antimicrobianos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina. Sin embargo, en casos de tuberculosis resistente (TB-DR) o TB-MDR se requiere de un tratamiento más agresivo (OMS, 2023)

Tanto la TB-P, como la TB-EP debe seguir el esquema estándar recomendado por la OMS, el cual consiste en una fase intensiva inicial de 2 meses seguida de una fase de continuación de 4 meses (Tabla 01).

Tabla 01. Esquema estándar de tratamiento para todas las formas de tuberculosis recomendado por la OMS		
Antimicrobiano	Fase intensiva inicial (2 meses)	Fase de continuación (4 meses)
Rifampicina (R)	600 mg/día	600 mg/día
Isoniazida (H)	300 mg/día	300 mg/día
Etambutol (E)	1200 mg/día o 15 mg/kg/día	NA
Pirazinamida (Z)	1500 mg/día o 25 mg/kg/día	NA

NA: No aplica

De ser necesario, se pueden realizar algunas modificaciones al régimen en los siguientes casos:

- *TB resistente a la isoniazida*: se puede sustituir la isoniazida por etambutol o por otro medicamento antituberculoso de segunda línea.
- *TB meníngea*: la fase intensiva se puede extender hasta 4 meses y la fase de continuación hasta 7 meses.

- *TB miliar*: la fase intensiva se puede extender hasta 3 meses y la fase de continuación hasta 9 meses.
- *TB en pacientes pediátricos*: el régimen de tratamiento debe ajustarse a la edad y peso.

2. Descripción de *Mycobacterium tuberculosis*

MTB pertenece al filo Actinobacteria, orden *Actinomycetales* y familia *Mycobacteriaceae*. Este microorganismo se caracteriza por su gruesa pared celular rica en lípidos, y cuyo tamaño oscila de 1 a 10 μm de largo. Es de crecimiento lento (2 – 8 semanas), y requiere de la presencia de oxígeno (Murray y otros, 2014). Debido a su forma de transmisión, su manejo requiere de un nivel 3 de bioseguridad en el laboratorio.

2.1. Infectómica y patogénesis

El contagio se produce habitualmente por vía aérea de pacientes que cursan la infección y presentan lesiones pulmonares conectadas con el exterior por un bronquio de drenaje. Al toser se generan *gotas de Flügge*, en cuyo interior se encierran uno o dos BAAR. Al evaporarse queda tan sólo el núcleo de bacilos que permanece flotando en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire pudiendo ser aspirado por otras personas. Las partículas de tamaño superior a 10 μm quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y 5 μm) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenan la primoinfección. (Lozano, 2002)

Para sobrevivir y establecer la infección, MTB invade más allá del epitelio mucoso o alveolar. A medida que fluye a través de las vías respiratorias superiores e inferiores, MTB puede infectar células epiteliales que se encuentran en el tejido mucoso asociado a la nariz o en el tejido mucoso asociado a los bronquios como ruta inicial de tránsito desde las vías respiratorias. Una vez que se pasan las vías respiratorias superiores y distales más grandes, el siguiente sitio de interacción con el huésped ocurre dentro del alvéolo.

Debido a que los alvéolos están continuamente expuestos a partículas y patógenos en el aire, también contienen células inmunes innatas especializadas conocidas como macrófagos alveolares que toman muestras de antígenos en el aire y se relacionan con ellos.

Además de los macrófagos alveolares, las células dendríticas que se encuentran dentro del espacio intersticial también pueden interactuar con partículas en el aire. Así, durante la infección primaria, el MTB que llega al alvéolo infecta a los macrófagos alveolares que residen en el espacio alveolar, así como a las células dendríticas intersticiales. Como vía de entrada alternativa, las células epiteliales alveolares tipo II también pueden infectarse por MTB. Estas células no logran controlar la infección con altas tasas asociadas de muerte celular. Dado que las células epiteliales alveolares superan ampliamente en número a los macrófagos alveolares, esta ruta puede representar un mecanismo importante a través del cual MTB atraviesa la mucosa.

Los macrófagos alveolares y las células dendríticas infectadas con MTB sirven como reservorios tempranos de infección y funcionan para activar una respuesta inmune adaptativa. Los macrófagos alveolares infectados migran desde el saco alveolar hacia el espacio intersticial. En algunas circunstancias, los macrófagos infectados residirán dentro del intersticio y, en otras circunstancias, los macrófagos infectados, además de las células dendríticas infectadas, migran desde el pulmón a los ganglios linfáticos de drenaje para preparar y activar las células T y B que funcionan para limitar progresión de la infección. Dentro del intersticio, los macrófagos intersticiales residentes engullen bacterias extracelulares que escapan de la fagocitosis inicial o después de su liberación de las células moribundas. Ambos tipos de macrófagos infectados (alveolares e intersticiales) junto con los macrófagos no infectados, los monocitos inflamatorios, los neutrófilos y las células T reclutadas por la inflamación y el daño tisular forman el granuloma característico de la tuberculosis. Sin embargo, en la mayoría de las infecciones primarias, la infección se controla, ya sea mediante la erradicación completa de las bacterias, dejando sólo la memoria inmunológica de la interacción o mediante la formación de un granuloma estable.

Desde la perspectiva del huésped, un granuloma estable y bien formado limita la progresión de la infección y restringe cualquier daño tisular a una región pequeña y bien circunscrita. La mayoría de las personas infectadas con MTB contendrán la enfermedad en este paso y serán asintomáticas. Desde la perspectiva bacteriana, el granuloma permite a las bacterias mantener un estado de latencia y así evitar su eliminación por parte del sistema inmunológico. Así, contenida, MTB puede persistir indefinidamente. Aparte de durante la

autopsia o la cirugía, donde se pueden cultivar bacilos de un granuloma identificado subrepticamente, esta afección actualmente solo se puede diagnosticar con prueba de la tuberculina o por ensayo de liberación de interferón Gamma (IGRA, por sus siglas en inglés). Recientemente, algunos han cuestionado si el gran número de personas con infección latente de TB, aproximadamente 1/4 a 1/3 de la población mundial según lo estimado por la OMS, realmente coexisten con organismos viables en lugar de haber eliminado la infección. (Rahlwes y otros, 2023)

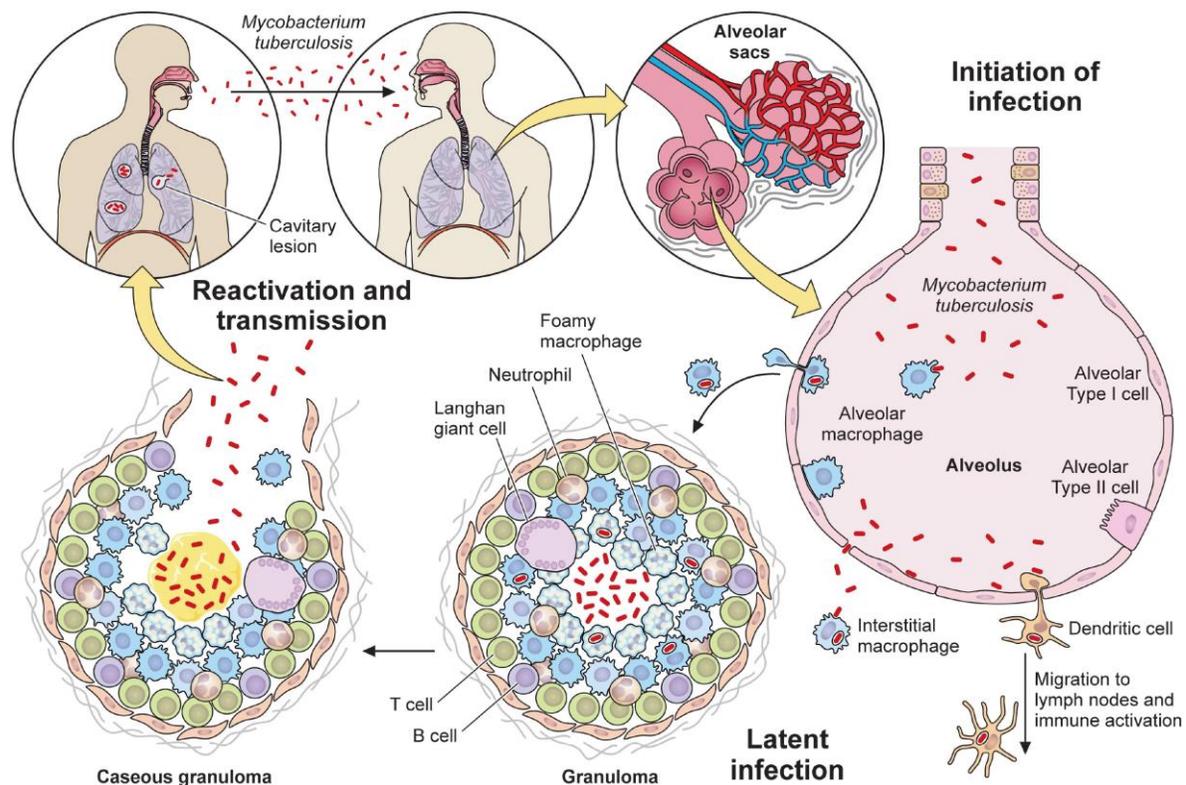


Figura 4. Panorama de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*
Tomado de: "Overview of Mtb infection" por Rahlwes *et al.*, 2023, *Virulence*.

2.2. Descripción molecular

El genoma de MTB es relativamente grande, con un tamaño de aproximadamente 4.4 millones de pares de bases (pb), con un contenido de G+C del 65.5%. Su genoma codifica alrededor de 4,000 genes.

El complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) presenta una diversidad baja, a pesar de ello muestra importantes diferencias biológicas entre cepas y linajes filogenéticos. Por ejemplo, se ha visto una asociación de linajes MTBC con poblaciones específicas. Un

artículo publicado en *Nature communications* en 2019 postula al realizar estudios sobre un conjunto limitado de muestras que las diferencias transcripcionales en el MTBC se deben a la acción diferencial de factores de transcripción, patrones de metilación o expresión de ARN no codificantes.

3. La biología molecular en el estudio de *Mycobacterium tuberculosis*

El diagnóstico clásico de TB se basa en cultivo microbiológico, baciloscopías y análisis de biopsias, así como pruebas rápidas (IMSS, 2022). Sin embargo, la OMS recomienda el uso de pruebas rápidas de diagnóstico molecular como pruebas iniciales en todo aquel individuo sobre el que se sospeche la infección. Algunas de estas pruebas que se recomiendan es GeneXpert MTB/RIF Ultra y Truenat, las cuales tienen una alta precisión diagnóstica y ayudarán a mejorar notablemente la detección precoz de TB, y TB-MDR (OMS, 2023).

La biología molecular ha permitido el estudio a profundidad de MTB, haciendo uso de diversas técnicas como la amplificación de ácidos nucleico (NAA) y técnicas de secuenciación, que en conjunto al análisis bioinformático permite conocer la relación filogenética y patrones de RAM en este BAAR.

3.1. Espoligotipificación

Es una técnica clásica y vigente para la caracterización molecular de MTB y el MTBC. Se basa en la amplificación mediante PCR de una región específica del cromosoma bacteriano, conocida como Región de Repeticiones Directas (Direct Repeat o DR). Esta región contiene una serie de espaciadores de ADN no codificante, que pueden variar en número y tamaño entre diferentes cepas de MTB (Viveros Luna y otros, 2021).

El procedimiento de espoligotipificación implica la amplificación del locus DR mediante PCR utilizando cebadores específicos para estas secuencias. Posteriormente, los productos de PCR se separan por electroforesis en gel, y los patrones de bandas resultantes se interpretan para determinar el espoligotipo único de una cepa de MTB. Cada espoligotipo se caracteriza por la presencia o ausencia de bandas en posiciones específicas del gel, lo que representa la variabilidad en las secuencias DR del genoma de MTB (Supply y otros, 2006).

La espoligotipificación se utiliza principalmente para (Kamerbeek y otros, 1997):

1. Estudios de epidemiología molecular: Permite la identificación y seguimiento de cepas de MTB en estudios epidemiológicos y de vigilancia de la TB. La comparación de espoligotipos entre diferentes cepas ayuda a determinar la relación genética entre ellas, lo que puede ser útil para investigar brotes de TB y rutas de transmisión.
2. Identificación de Linajes: Permite la clasificación de cepas de MTB en diferentes linajes genéticos con base en sus perfiles de espoligotipo. Esto proporciona información sobre la diversidad genética y la distribución geográfica de las cepas de MTB.
3. Estudios de Resistencia: Se ha utilizado en algunos estudios para investigar la asociación entre determinados espoligotipos y la resistencia a fármacos antituberculosos. Sin embargo, su utilidad en este contexto puede ser limitada debido a la baja resolución de la técnica para discernir las variaciones genéticas responsables de la resistencia.

3.2. Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de elemento genético transponible IS6110 (RFLP IS6110)

La técnica funciona identificando variaciones en el número y ubicación de un elemento de secuencia de inserción (IS) específico llamado IS6110 dentro del genoma bacteriano. Los elementos IS son piezas móviles de ADN que pueden insertarse en diferentes lugares del cromosoma. Esta metodología hace uso de la técnica de Southern Blot, que le procede una hibridación de IS6110. Sólo los fragmentos que contengan el elemento IS6110 se unirán a la sonda. Luego, estos fragmentos se visualizan mediante autorradiografía (para sondas radiactivas) o imágenes de fluorescencia (para sondas fluorescentes). El número y tamaño de los fragmentos que se unen a la sonda variarán dependiendo del número y ubicación de los elementos IS6110 en el genoma bacteriano. Cada cepa de MTB tendrá un patrón RFLP único, que actúa como una huella digital y permite a los investigadores distinguir entre diferentes cepas.

Este método se basa en la presencia del elemento genético transponible IS6110 en el genoma de MTB. El IS6110 es un fragmento de ADN que se inserta en el genoma bacteriano

y que se encuentra en múltiples copias en la mayoría de las cepas clínicas de MTB. La técnica de RFLP implica la digestión del ADN genómico de MTB con una enzima de restricción que reconoce secuencias específicas cercanas a los elementos IS6110. La digestión produce fragmentos de ADN de diferentes longitudes, que pueden ser separados por electroforesis en gel y visualizados como bandas en un gel de agarosa (van Embden y otros, 1993).

El patrón de bandas resultante en el gel de agarosa se interpreta para determinar el perfil de RFLP único de una cepa de MTB. Cada cepa de MTB tendrá un perfil de RFLP único, que está determinado por el número y la ubicación de los elementos IS6110 en su genoma. Comparando los perfiles de RFLP entre diferentes cepas, se puede investigar la relación genética entre ellas y obtener información sobre la epidemiología y la transmisión de la TB en una población determinada (van Soolingen y otros, 1993).

3.3. Caracterización mediante análisis de Unidades Repetitivas Interespaciadas de Micobacterias-Número Variable de Repeticiones en Tándem (MIRU-VNTR)

Su principio se basa en utilizar la variabilidad en el número de repeticiones en tándem presentes en unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRU) específicas ubicadas en el genoma de MTB. Las MIRU son secuencias de ADN cortas y no codificantes que se encuentran dispersas por todo el genoma. Cada cepa de MTB tendrá un patrón MIRU-VNTR único basado en el número de repeticiones en cada locus MIRU. Este patrón se puede utilizar para diferenciar entre cepas, identificar la fuente de infección y rastrear la transmisión de la tuberculosis.

El método MIRU-VNTR implica la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de un conjunto de loci MIRU (Unidades Repetitivas Interespaciadas de Micobacterias) y VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tándem). Estos loci consisten en secuencias repetidas de ADN de longitud variable que se encuentran dispersas en el genoma de MTB. La amplificación de cada locus MIRU-VNTR produce un perfil único de bandas de diferentes longitudes, que se determina mediante electroforesis en gel y visualización de las bandas resultantes (Supply y otros, 2006).

El perfil de MIRU-VNTR de una cepa de MTB se caracteriza por el número de repeticiones en cada locus MIRU-VNTR amplificado. Cada cepa de MTB tendrá un perfil

de MIRU-VNTR único, que puede ser utilizado para la tipificación y la epidemiología de la TB. Comparando los perfiles de MIRU-VNTR entre diferentes cepas, se puede investigar la relación genética entre ellas, así como la distribución y transmisión de cepas en una población determinada (Supply y otros, 2000).

3.4. Determinación de patrones de resistencia a los antimicrobianos mediante análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

La determinación de patrones de resistencia a los antimicrobianos mediante análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la tuberculosis (TB) implica la identificación de cambios en nucleótidos específicos del genoma de MTB que están asociados con la resistencia a los fármacos antituberculosos.

Este enfoque se basa en la detección de mutaciones puntuales en genes específicos de MTB que codifican proteínas involucradas en el modo de acción o la entrada de los fármacos antituberculosos en la bacteria. Estas mutaciones pueden alterar la estructura o la función de la proteína, lo que conduce a la resistencia a los fármacos (Casali y otros, 2012).

El análisis de SNP para determinar la resistencia a los antimicrobianos en MTB generalmente implica la secuenciación o la genotipificación de genes conocidos por estar asociados con la resistencia a los fármacos antituberculosos. Algunos de los genes objetivo comunes incluyen (Miotto y otros, 2015):

1. ***rpoB* y *rpoA***: Asociado con la resistencia a rifampicina, uno de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB.
2. ***katG*, *inhA* y *ahpC***: Asociados con la resistencia a isoniazida, otro fármaco de primera línea.
3. ***embB***: Asociado con la resistencia a etambutol.
4. ***gyrA* y *gyrB***: Asociados con la resistencia a fluoroquinolonas.

La identificación de SNP en estos genes se realiza mediante técnicas de secuenciación de ADN o genotipificación de alto rendimiento, que permiten la detección rápida y precisa de mutaciones asociadas con la resistencia a los fármacos. Los resultados de estos análisis

proporcionan información sobre los patrones de resistencia a los antimicrobianos en cepas de MTB y pueden guiar decisiones clínicas sobre el tratamiento de la TB.

3.5. qPCR por GeneXpert®

GeneXpert® MTB/RIF Ultra es una prueba de diagnóstico molecular rápido fabricada por Cepheid® (EE.UU.). Puede detectar MTB y la resistencia a la rifampicina en una sola prueba en 80 minutos. Es un método automatizado que combina la amplificación por qPCR y la detección de fluorescencia en tiempo real en un solo dispositivo, lo que permite una detección rápida y sensible de MTB y la resistencia a la rifampicina (Boehme y otros, 2010).

El proceso de qPCR utilizando GeneXpert implica la extracción automatizada del ADN de una muestra clínica, seguida de la amplificación específica del ADN de MTB y la resistencia a la rifampicina mediante PCR en tiempo real. Durante la amplificación, se utiliza una sonda de ADN específica que se une a la secuencia objetivo en el ADN de MTB y genera una señal de fluorescencia detectable cuando se amplifica el objetivo (Steingart y otros, 2014).

El sistema GeneXpert puede detectar y cuantificar la carga bacteriana de MTB en muestras clínicas con una alta sensibilidad y especificidad. Además, puede identificar rápidamente las mutaciones asociadas con la resistencia a la rifampicina, lo que permite la selección de regímenes de tratamiento adecuados para pacientes con TB resistente a fármacos.

No obstante, debe utilizarse junto con otros métodos de diagnóstico y evaluación clínica para un diagnóstico integral de la TB.

3.6. Secuenciación de genoma completo (Whole Genome Sequencing, WGS)

La secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) es una técnica avanzada de biología molecular que se ha utilizado cada vez más en el campo de la TB para el análisis genómico de MTB. La WGS permite la determinación de la secuencia completa del ADN en el genoma de MTB, lo que proporciona una visión detallada de la variabilidad genética y la evolución de las cepas de MTB (Gardy y otros, 2011).

El proceso de WGS implica la secuenciación de todo el genoma de MTB, lo que permite la identificación de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y otros tipos de variación genética en el genoma bacteriano. Esta información se utiliza para caracterizar las cepas de MTB y para investigar la epidemiología, la transmisión y la resistencia a los fármacos de la TB (Walker y otros, 2013).

Algunas de las aplicaciones principales de la WGS en el campo de la TB incluyen:

1. **Epidemiología Molecular:** La WGS permite la comparación de genomas de diferentes cepas de MTB para investigar la transmisión y la propagación de la TB en poblaciones humanas. Esto incluye la identificación de brotes de TB y la reconstrucción de cadenas de transmisión.
2. **Detección de Resistencia a Fármacos:** La WGS puede identificar mutaciones asociadas con la resistencia a los fármacos anti-tuberculosos en el genoma de MTB. Esto proporciona información precisa sobre la resistencia a los fármacos y ayuda en la selección de tratamientos adecuados para pacientes con TB resistente a fármacos.
3. **Estudios de Evolución:** La WGS permite investigar la evolución de MTB y la aparición de nuevas variantes genéticas. Esto incluye el estudio de la diversidad genética y la evolución de las cepas de MTB en diferentes regiones geográficas y poblaciones humanas.

A medida que la tecnología continúa desarrollándose, la WGS se convertirá en una herramienta aún más importante para la lucha contra la TB.

Resolución de la epidemiología molecular

La WGS permite una alta resolución en la epidemiología molecular al proporcionar una visión detallada de las relaciones filogenéticas entre diferentes aislados de *M. tuberculosis*. Esto ayuda a rastrear la propagación de cepas específicas y comprender la dinámica de transmisión de la TB en poblaciones humanas y animales.

Identificación de RAM

Esto es crucial para orientar el tratamiento de pacientes con TB, especialmente en casos TB-MDR y TB-XDR.

Detección de mutaciones asociadas con la virulencia

La WGS puede ayudar a identificar mutaciones en genes asociados con la virulencia de *M. tuberculosis*, lo que contribuye a una mejor comprensión de los mecanismos de patogenicidad y la adaptación del patógeno al hospedador humano.

Estudios de genómica comparativa

La comparación de genomas completos de cepas de MTB de diferentes regiones geográficas o contextos clínicos puede proporcionar información sobre la evolución bacteriana, la diversidad genética y la selección de linajes dominantes en diferentes poblaciones.

Desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas

La secuenciación del genoma completo también impulsa el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas para el manejo de la TB, incluyendo la identificación de nuevos objetivos terapéuticos y biomarcadores de resistencia a fármacos.

JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una emergencia de salud pública global debido a su alta morbilidad y mortalidad. Esto se atribuye a la naturaleza única de *Mycobacterium tuberculosis*, cuya adaptación al huésped y la ganancia de fenotipos de resistencia a los antimicrobianos dificulta su control.

La zona metropolitana de Monterrey es una región de alta afluencia de personas de todo el país, donde se han detectado altas tasas de incidencia de tuberculosis de todas las formas. Por lo anterior, conocer la epidemiología molecular de los linajes del complejo *M. tuberculosis* que circulan actualmente, así como sus perfiles genómicos de resistencia a los antimicrobianos, contribuirá significativamente en la información para planear un manejo óptimo de esta infección, y con ello aportar al logro de uno de los Objetivos del Desarrollo Sostenible en materia de salud.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son linajes del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que circulan actualmente en la zona metropolitana de Monterrey y qué patrones genómicos de resistencia a los antimicrobianos se presentan entre aislados clínicos provenientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”?

HIPÓTESIS

El sublinaje del MTBC de aislamientos clínicos en la zona metropolitana de Monterrey en el período 2021 – 2023 circulando con mayor frecuencia es el L.4.1.1.3 (Tipo X), y el porcentaje de cepas multidrogorresistentes es <15 %.

OBJETIVOS

General

Determinar la epidemiología molecular de los linajes circulantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y sus patrones genómicos de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante secuenciación de genoma completo, de aislados clínicos de la zona metropolitana de Monterrey en el período 2021 – 2023.

Específicos

- Obtener 60 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de muestras de pacientes que atienden la consulta en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y recabar su información epidemiológica.
- Extraer el ADN de los aislamientos de *M. tuberculosis* y someterlo a secuenciación de genoma completo para establecer su linaje en el MTBC.
- Establecer de manera *in silico* el perfil genómico y de susceptibilidad a los antimicrobianos de las secuencias del MTBC, y su relación frente a los datos epidemiológicos y demográficos de interés.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y autorización del estudio

El presente estudio lleva a cabo en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (LIID) del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y en las instalaciones del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

El proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la dependencia académica, asignando la clave de registro: DE23-00008.

Población de estudio

Se consideraron a pacientes con diagnóstico confirmado de tuberculosis, sin discernir en edad, sexo, origen, raza, etnia, ni ningún otro rubro psicosocial similar, que acudieron a consulta en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, en el período del 2021 al 2023.

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Diagnóstico confirmado de tuberculosis.

Criterios de exclusión

- Ausencia de información clínica completa.
- Mala calidad de muestra biológica.

Manejo de muestras

Se recibieron los datos clínicos y muestras biológicas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en el período 2021 – 2023, los cuales tuvieron un diagnóstico confirmado de tuberculosis, considerando tanto TB-P como TB-EP. Las muestras provinieron de los diversos departamentos o servicios del Hospital Universitario.

El presente estudio considero un total de muestras de 60.

Base de datos clínicos y epidemiológicos

De cada paciente se colectó su información clínica y epidemiológica, a partir de su expediente clínico multiservicio, abordando: diagnóstico anatomopatológico y

citopatológico, estudios de imagen, diagnóstico de laboratorio clínico, notas pre y posoperatorias (en el caso de TB-EP), evolución clínica, conciliación de medicamentos, resumen clínico y notas de egreso. A partir de ello se construyó una base de datos interna del universo de muestras para fines de este proyecto, la cual contenía los siguientes datos: ID asignado por el LIID, sexo, nombre completo, no. de expediente, edad de ingreso, edad de confirmación diagnóstica de TB, fecha de nacimiento, fecha de diagnóstico, entidad federativa de origen, municipio de residencia, comorbilidad, antecedentes personales no patológicos, diagnóstico de radiología e imagen, cuadro clínico, presencia o ausencia de complicaciones, estado de defunción, escolaridad, situación de empleabilidad tipo de TB diagnosticada, altura, peso, origen de la muestra biológica.

En todo momento se protegió la privacidad de los participantes, y no se dio uso indebido o diferente a lo marcado en los consentimientos informados. Además, se tuvo aplicabilidad y seguimiento de acuerdo con la NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.

Para los fines prácticos del presente estudio, sólo se consideraron algunos datos clínicos y demográficos de la base de datos.

Recepción de muestras biológicas

Se recibieron las muestras biológicas – patológicas directas de su origen anatómico o, en su defecto, el cultivo en tubos de cultivo de agar Löwenstein-Jensen. En ambos casos se consideró si la muestra provenía de esputo, líquido pleural, lavado bronquial, cavidades quirúrgicas, granulomas, líquido ascítico, biopsia, múltiples sitios, u otras relacionadas al origen del diagnóstico de TB. Cada muestra fue tratada adecuadamente de acuerdo con lo establecido en la NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis, y la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo. A cada muestra se le asignó un número de identificación único e interno en el LIID.

Aislamiento de ADN genómico de MTB

El manejo de las muestras se realizó en la zona del LIID designada para ello, haciendo uso de cabina de seguridad nivel 3 (BSL3) de Clase II, y Equipo de Protección Personal completo.

De cada muestra se realizaron cultivos para *M. tuberculosis* en tubos con agar Löwenstein-Jensen, incubándose a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂, hasta su crecimiento adecuado.

1. Incubar durante 10-20 días en un incubador de CO₂ al 5-10% a 37 °C sin agitar. El tiempo necesario para obtener un crecimiento suficiente depende de la condición del cultivo original. La inoculación en una inclinación Löwenstein-Jensen puede requerir de 2 a 3 semanas de tiempo de incubación.
2. Para inclinaciones de Löwenstein-Jensen: Usando un hisopo de algodón estéril, recolectar tantas colonias en la inclinación como sea posible, evitando tomar cualquier medio de Löwenstein-Jensen. Transferir las células a un tubo de microcentrífuga que contenga 500 µL de Buffer TE.
3. Inactivación celular.
4. Mezclar antes de agregar lisozima, añadir 50 µL de lisozima (10 mg/mL), invertir para mezclar (20 veces) e incubar a 37 °C durante un mínimo de una hora (la incubación puede durar toda la noche).
5. Añadir 70 µL de SDS al 10% y 6 µL de proteinasa K (10 mg/mL). Combinar SDS y Proteinasa K y agregar 76 µL a cada tubo. Invertir para mezclar (20 veces) e incubar a 65 °C durante 10 minutos.
6. Añadir 100 µL de NaCl al 5 M e invertir para mezclar (20 veces).
7. Añadir 80 µL de bromuro de n-cetil N,N,N-trimetilamonio, *Merck* (CTAB), precalentado (en microtubos) a 65 °C y agitar hasta que esté lechoso. Incubar a 65 °C durante 10 minutos.
8. Añadir un volumen igual (0.7 mL) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Agitar en vórtex durante 10 segundos para mezclar bien. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 12,000 g.

9. Transferir la capa superior acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga con una micro pipeta (usar ajuste de 0.75 mL). (Repetir el paso de cloroformo/alcohol isoamílico si es necesario).
10. Añadir 500 μ L de isopropanol. Agitar brevemente. Colocar a -20°C durante al menos una hora (puede durar toda la noche).
11. Centrifugar durante 15 minutos a temperatura ambiente a 12,000 g. Desechar el sobrenadante.
12. Lavar el sedimento de ADN con 1 mL de etanol al 70% frío para eliminar el CTAB residual e isopropanol. Agitar brevemente.
13. Centrifugar durante 5 minutos a temperatura ambiente a 12,000 g. Desechar el sobrenadante. Fijar en papel absorbente.
14. Centrifugar el sedimento al vacío durante 15 minutos con calor medio para secar el sedimento. Alternativamente, el sedimento puede secarse a temperatura ambiente sin vacío.
15. Disolver el sedimento de ADN en 20 μ L de Buffer TE. Incubar a 37°C durante 30-60 minutos para disolver el ADN.

La concentración y calidad del material genético se determinó mediante espectrofotometría por NanoDrop™ 2000, considerando una pureza óptima en relación $A_{260}/_{280}: \geq 1.8 - 2.1$ & $A_{260}/_{230}: \geq 1.8 - 2.2$.

Las muestras de ADN se identificaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.

Secuenciación de genoma completo (WGS) por Illumina MiSeq

Preparación de biblioteca genómica (genoteca) con Nextera XT

1. Corte de ADN: Se basa en el corte enzimático de acuerdo con el inserto. Además, en caso de bajas concentraciones de ADN (se recomiendan 100 ng), se ajustaron las condiciones de reacción.
2. Ligadura de adaptadores: Ligar adaptadores de Illumina que contienen índices únicos para multiplexación según el protocolo. Se debe garantizar la proporción adecuada de adaptador a fragmento para una construcción óptima de la genoteca.
3. Amplificación por PCR: PCR de ciclo limitado (8-12 ciclos) utilizando *primers* específicos para secuencias adaptadoras.

4. Purificación de genotecas: Purificar las genotecas amplificadas utilizando perlas *Agencourt AMPure XP* en proporción 1.8X para eliminar dímeros adaptadores, productos que solo contienen *primers* y artefactos de amplificación no deseados.
5. Cuantificación de la genoteca: Cuantificar la concentración final de la genoteca mediante un método fluorométrico.
6. Control de calidad: Analizar la genoteca purificada utilizando una *TapeStation*. Y evaluar la distribución del tamaño de los fragmentos, asegurándose de que la mayoría de los fragmentos se encuentren dentro del rango de tamaño deseado () para una secuenciación óptima.

Parámetros de secuenciación con Illumina MiSeq

1. Química de secuenciación: Para la secuenciación del genoma completo de MTB (alrededor de 4,4 Mb), se empleó el kit de reactivos *MiSeq v3* con lecturas de extremos emparejados de 150 pb. Esta longitud de lectura ofrece un buen equilibrio entre cobertura y costo al tiempo que proporciona información suficiente para la detección de variantes.
2. Concentración de carga: Seleccionar la concentración óptima de acuerdo al inserto y garantizar una densidad de grupo óptima en la celda de flujo.
3. Multiplexación: Considerar la cantidad de muestras y la profundidad de secuenciación deseada al decidir sobre la multiplexación.

Configuración de ejecución de MiSeq

1. Desnaturalización e hibridación: El equipo *MiSeq* realiza una amplificación del puente en la superficie de la celda de flujo. Durante este proceso, los fragmentos de la biblioteca amplificada se hibridan con secuencias adaptadoras complementarias en la celda de flujo.
2. Secuenciación por síntesis (SBS): Se incorporan nucleótidos marcados con fluorescencia en las cadenas de ADN en crecimiento basándose en la plantilla complementaria. Cada ciclo captura la identidad de la base incorporada mediante detección de fluorescencia. Se realizan millones de estos ciclos para secuenciar todo el fragmento de la genoteca.

3. Análisis de imágenes y llamado de bases: El equipo captura imágenes de la celda de flujo en cada ciclo y el *software* interpreta las señales de fluorescencia para determinar la secuencia de bases. Este proceso genera datos de secuenciación sin procesar (archivos FASTQ) que contienen millones de lecturas.

Control de calidad durante la secuenciación

1. Monitoreo de la densidad del grupo: El equipo monitorea la densidad del grupo en la celda de flujo durante la ejecución. La densidad de clúster óptima garantiza una generación suficiente de datos de secuenciación sin comprometer la calidad debido al hacinamiento.
2. Consumo de *buffer* de lavado: Controlar el consumo de *buffer* de lavado durante todo el proceso. Un consumo excesivo puede indicar problemas con la celda de flujo o con la genoteca.
3. *Software* de monitoreo en tiempo real: Utilizar el *software* de monitoreo en tiempo real de *Illumina* para realizar un seguimiento del progreso de la secuencia, monitorear parámetros clave e identificar posibles problemas durante la ejecución.

Consideraciones posteriores a la secuenciación

1. Llamado de bases y demultiplexación: Una vez completada la secuenciación, el *software* realiza un llamado de bases para convertir señales de fluorescencia en secuencias de nucleótidos. Si se multiplexa, la demultiplexación separa las lecturas que se originan en diferentes bibliotecas en función de sus índices únicos.
2. Salida de datos: Los datos de secuenciación salen en formato FASTQ y contienen millones de lecturas para cada muestra. Estas lecturas de secuenciación sin procesar requieren procesamiento y análisis adicionales para llamadas de variantes y aplicaciones posteriores (Véase “Procesamiento Bioinformático”).

Proceso bioinformático

Partiendo de las lecturas crudas (archivos FASTQ), se procesaron a través de la herramienta en línea BV-BRC (Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana y Viral, por sus siglas en inglés) (<https://www.bv-brc.org/>), la cual es una plataforma digital integral diseñada para el análisis genómico y metagenómico de microorganismos, incluido su

ensamblaje, alineamiento, predicción genética, análisis filogenético, entre otros; permitiendo así un estudio completo de *Mycobacterium tuberculosis* (Olson y otros, 2023).

Así mismo, se hizo uso de la herramienta bioinformática TB-Profiler (<https://tbdr.lshtm.ac.uk/>). Esta es una herramienta en línea desarrollada específicamente para el análisis genómico del MTBC; está diseñada para identificar la resistencia a medicamentos y las variantes genéticas relevantes en las cepas de TB a partir de datos de secuenciación de nueva generación (NGS), aportando informes completos y comprensibles sobre su linaje, SNP asociadas a RAM, códigos octales, familias y subfamilias del MTBC, entre otras (Phelan y otros, 2019). Esta información se integró en una base de datos, la cual se sometió posteriormente en análisis estadísticos de correlación.

La construcción de árboles filogenéticos se realizó con la herramienta BV-BRC y se enriqueció con la herramienta iTOL (Árbol de la Vida Interactivo, por sus siglas en inglés) (<https://itol.embl.de/>), que permitió la visualización y personalización de árboles filogenéticos. Es ampliamente utilizada en bioinformática y biología evolutiva para analizar y presentar datos filogenéticos de manera intuitiva y visualmente atractiva (Letunic & Bork, 2024).

Ensamblaje del genoma completo de MTB con la herramienta BV-BRC

El servicio Genome Assembly de BV-BRC permite emplear uno o varios ensambladores, como *Unicycler*, para comparar resultados. El servicio intenta seleccionar el mejor ensamblaje.

1. Registro y Acceso:

- a. Cree una cuenta: Visite la página web de BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/>) y regístrese para obtener una cuenta gratuita. Proporcione su información de contacto e institucional.
- b. Inicio de sesión: Inicie sesión en su cuenta de BV-BRC utilizando su dirección de correo electrónico y contraseña.

2. Carga de datos:

- a. Acceso al proyecto: Seleccione el proyecto en el que desea realizar el ensamblaje del genoma. Si no tiene un proyecto existente, cree uno nuevo.

- b. Carga de FASTQ: Haga clic en el botón "Cargar datos" y seleccione los archivos FASTQ de su secuenciación de MTB. Puede cargar archivos FASTQ individuales o comprimidos en formato ZIP o GZIP.
- 3. Configuración del ensamblaje:**
- a. Tipo de datos: Especifique si sus datos de secuenciación son de pares cortos (150 bp) o largos (300 bp).
 - b. Referencia del genoma: Seleccione un archivo de referencia del genoma MTB de alta calidad, como H37Rv (NC_000962.3), que esté disponible en la biblioteca de referencias de BV-BRC.
 - c. Opciones avanzadas: Ajuste las opciones avanzadas de ensamblaje, como el tamaño mínimo de *contig* y el número máximo de *threads*, según las necesidades específicas.
- 4. Ejecución del ensamblaje:**
- a. Inicio del ensamblaje: Haga clic en el botón "Iniciar ensamblaje" para iniciar el proceso de ensamblaje del genoma.
 - b. Monitoreo del progreso: Observe la barra de progreso y los mensajes de estado para monitorear el avance del ensamblaje.
- 5. Descarga de resultados:**
- a. Visualización del ensamblaje: Una vez finalizado el ensamblaje, puede visualizar el ensamblaje en un navegador web integrado.
 - b. Descarga del ensamblaje: Descargue el ensamblaje en formato FASTA o GFF3 para su análisis posterior.
 - c. Anotación del genoma: Utilice herramientas de anotación de genes en línea o fuera de línea para identificar y anotar genes en el ensamblaje.

Análisis completo del genoma de MTB con la herramienta BV-BRC

El servicio de "Comprehensive Genome Analysis" de BV-BRC proporciona un "metaservicio" de análisis simplificado que acepta lecturas sin procesar y realiza un análisis integral que incluye ensamblaje, anotación, identificación de especies vecinas más cercanas, un análisis comparativo básico que incluye un resumen del subsistema, un árbol filogenético y las características que distinguen el genoma de sus vecinos más cercanos.

1. Iniciar Sesión en BV-BRC

2. Acceso a la Herramienta de Análisis: En el panel de control, navegue a la sección de herramientas y seleccione “*Comprehensive Genome Analysis*”.
3. Cargar Datos Genómicos: Haga clic en “*Upload Data*” para cargar sus archivos genómicos, luego seleccione los archivos desde su computadora y espere a que se complete la carga.
4. Configurar el Análisis
 - a. Nombre del Proyecto: Asigne un nombre a su proyecto para identificarlo fácilmente.
 - b. Tipo de Datos: Indique si sus datos son de genoma completo, metagenoma, etc.
 - c. Opciones de Análisis: Seleccione los parámetros específicos para el ensamblaje de genomas, anotación de genes y análisis de variantes, según sus necesidades.
5. Anotación del Genoma: Active la opción de anotación automática para que BV-BRC identifique genes, ARN y otras características genómicas. Luego, configure parámetros adicionales si es necesario (p. ej., umbrales de homología, bases de datos específicas para anotación).
6. Análisis de Resistencias y Virulencia: Habilite los módulos para la identificación de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia. Luego, seleccione las bases de datos de referencia que desee utilizar (p. ej., CARD, VFDB).
7. Comparación Genómica: Si desea comparar su genoma con otros genomas, seleccione las bases de datos y genomas de referencia pertinentes. Luego, configure los parámetros de comparación (p. ej., alineamiento múltiple, construcción de árboles filogenéticos).
8. Iniciar el Análisis:
 - a. Revise todas las configuraciones.
 - b. Haga clic en “*Run Analysis*” para iniciar el proceso.
 - c. Espere a que se complete el análisis (esto puede llevar desde minutos hasta varias horas, dependiendo del tamaño del genoma y las opciones seleccionadas).
9. Revisión de Resultados
 - a. Una vez completado el análisis, acceda a los resultados desde el panel de control.
 - b. Revise los informes generados que incluyen: Anotación de genes y características genómicas, Identificación de genes de resistencia y factores de virulencia, Comparaciones genómicas y análisis filogenéticos.

10. Exportación y Descarga de Resultados: Exporte los resultados en formatos deseados (e.g., tablas de anotación en CSV, imágenes de árboles filogenéticos en PNG). Luego, descargue los archivos para su posterior análisis o presentación.

Construcción de árbol filogenético de especies de MTBC con la herramienta BV-BRC

El servicio “*Bacterial Genome Tree*” de BV-BRC permite la construcción de árboles filogenéticos personalizados para genomas seleccionados por el usuario utilizando el método del árbol de codones.

Para la construcción de los árboles filogenéticos, en principio se analizaron las 60 secuencias obtenidas; posteriormente se realizaron árboles filogenéticos únicamente con las secuencias que hayan presentado mutaciones asociadas a la RAM, en comparación con otros genomas de trabajos realizados en México, con el objetivo de establecer la relación entre cepas. Para ambos casos el protocolo general fue el siguiente:

1. Carga de secuencias:
 - a. Acceso a Bacterial Genome Tree: En la plataforma BV-BRC, navegue hasta la sección "Herramientas" y seleccione "*Bacterial Genome Tree*".
 - b. Carga de secuencias FASTA: Haga clic en el botón "Cargar archivo" y seleccione el archivo FASTA que contiene las secuencias genómicas de MTBC. Puede cargar un archivo FASTA individual o comprimido en formato ZIP o GZIP.
2. Selección de opciones de análisis:
 - a. Selección de método filogenético: Elija el método filogenético *Maximum Likelihood*.
 - b. Selección de modelo de evolución: Seleccione el modelo de evolución nucleotídica GTR.
 - c. Configuración de parámetros adicionales: Ajuste parámetros opcionales como el número de iteraciones, el porcentaje de *bootstrap* y la distancia genética según sus necesidades específicas.
3. Construcción del árbol filogenético:
 - a. Inicio del análisis: Haga clic en el botón "Iniciar análisis" para comenzar el proceso de construcción del árbol filogenético. BV-BRC utilizará las secuencias cargadas, las opciones seleccionadas y los algoritmos filogenéticos para generar el árbol.

- b. Monitoreo del progreso: Observe la barra de progreso y los mensajes de estado para monitorear el avance del análisis. El tiempo de ejecución puede variar según la cantidad de secuencias y la complejidad del análisis.
- 4. Visualización y descarga de resultados:
 - a. Visualización del árbol filogenético: Una vez finalizado el análisis, BV-BRC mostrará el árbol filogenético generado en una interfaz web interactiva. Puede explorar el árbol, ampliar y reducir ramas, y visualizar información adicional sobre las cepas.
 - b. Descarga del árbol filogenético: Descargue el árbol filogenético en formato Newick o como una imagen PNG para su posterior análisis y visualización en otras herramientas.
 - c. Interpretación del árbol filogenético: Analice el árbol filogenético en el contexto de la epidemiología local, la información clínica de las cepas y la clasificación taxonómica del complejo MTBC.

Diseño y personalización de árboles filogenéticos con la herramienta iTOL

Preparativos Previos

1. Acceso a Internet: Asegúrese de tener una conexión a Internet estable.
2. Cuenta en iTOL: Regístrese y cree una cuenta en iTOL.
3. Archivo del Árbol Filogenético: Prepare el archivo del árbol filogenético en formato Newick, Nexus, o PhyloXML.

Pasos para el Diseño y Personalización del Árbol Filogenético

1. Iniciar Sesión en iTOL
 - Vaya al sitio web de iTOL.
 - Inicie sesión con sus credenciales.
2. Cargar el Árbol Filogenético
 - Haga clic en “*Upload tree*” en la página principal.

- Seleccione el archivo del árbol desde su computadora y cárguelo en iTOL.
- Una vez cargado, el árbol se mostrará en la interfaz de iTOL.

3. Visualización Básica del Árbol

- Explore la visualización básica del árbol. Puede hacer *zoom* y desplazarse para ver diferentes partes del árbol.
- Haga clic en los nodos y hojas para obtener información adicional y opciones de personalización.

4. Personalización del Árbol

- Colores de Ramas y Hojas:
 - Seleccione una rama o hoja, haga clic derecho y elija "*Edit*" para cambiar el color.
 - Utilice la herramienta de selección de color para aplicar colores específicos a diferentes partes del árbol.
- Etiquetas y Anotaciones:
 - Agregue etiquetas a las hojas o ramas haciendo clic derecho en el nodo correspondiente y seleccionando "*Add label*".
 - Personalice el texto de las etiquetas y su posición.
- Formas y Símbolos:
 - Haga clic derecho en una hoja y seleccione "*Add shape*" para agregar formas o símbolos (e.g., círculos, cuadrados).
 - Ajuste el tamaño, color y tipo de las formas según sea necesario.

5. Integración de Datos Adicionales

- Datos de Atributos:

- Cargue datos de atributos adicionales (e.g., metadatos) seleccionando “*Datasets*” en el menú lateral y luego “*Add dataset*”.
- Elija el tipo de *dataset* (e.g., etiquetas, colores, barras) y cargue un archivo de datos en formato adecuado (CSV, TSV).
- Mapas de Calor y Gráficos:
 - Añada mapas de calor, gráficos de barras o gráficos circulares para visualizar datos cuantitativos.
 - Configure los valores y colores para representar adecuadamente sus datos.

6. Ajustes de Visualización

- Forma del Árbol: Cambie la forma del árbol (e.g., circular, radial, rectilíneo) desde el menú de opciones de visualización.
- Estilos de Ramas: Ajuste el grosor y estilo de las ramas para mejorar la claridad visual.
- Leyenda: Añada una leyenda para explicar los colores, símbolos y datos utilizados en el árbol. Esto se puede hacer desde “*Datasets*” -> “*Legend*”.

7. Revisión y Ajustes Finales

- Revise la visualización completa del árbol para asegurarse de que todas las personalizaciones sean correctas.
- Haga ajustes adicionales según sea necesario, como reordenar nodos o ajustar etiquetas.

8. Exportación del Árbol

- Formatos de Exportación: Exporte el árbol en varios formatos de alta resolución, como PDF, SVG, PNG, y más.

- Configuración de Exportación: Ajuste la resolución y tamaño del archivo exportado para asegurar la calidad adecuada para presentaciones o publicaciones.

Análisis genómico, asignación de linajes e identificación de mutaciones asociadas a RAM con herramienta TB-Profiler

El uso de TB-Profiler aporta información sustancial y específica sobre el perfil genómico de MTB, pues a partir de los archivos FASTQ obtenidos en el proceso de WGS por *Illumina*, se realiza un alineamiento, indicando la calidad del mismo, y tiene como datos de salida a: linajes y sublinajes del MTBC al que pertenece la secuencia, código octal de espoligotipo, identificación de mutaciones y su relación con el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos, detección de regiones de diferenciación (RDs), familias y subfamilias del MTBC, entre otros.

Preparativos Previos

1. Acceso a Internet: Asegúrese de tener una conexión a Internet estable.
2. Cuenta en TB-Profiler: Si es necesario, regístrese y cree una cuenta en TB-Profiler.
3. Datos de Secuenciación: Tenga a mano los datos de secuenciación del genoma en formato FASTQ.

Pasos para el Análisis del Genoma Completo

1. Acceso a la Plataforma TB-Profiler
 - Vaya al sitio web de <https://tbdr.lshtm.ac.uk/>
 - Inicie sesión con sus credenciales si es necesario.
2. Carga de Datos de Secuenciación
 - En la página principal, haga clic en “*Upload Files*” o “*Analyze Data*”.
 - Seleccione los archivos de secuenciación en formato FASTQ desde su computadora y cárguelos en la plataforma.

3. Configuración del Análisis

- Nombre del Proyecto: Asigne un nombre a su proyecto para identificarlo fácilmente.
- Tipo de Datos: Verifique que el tipo de datos (lecturas de secuenciación) esté correctamente seleccionado.
- Opciones de Análisis: Asegúrese de que las opciones de análisis sean apropiadas para *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Iniciar el Análisis

- Revise todas las configuraciones y haga clic en “*Start Analysis*” o “*Run Analysis*” para iniciar el proceso.
- Espere a que se complete el análisis, lo cual puede tomar desde minutos hasta varias horas dependiendo del tamaño de los datos y la carga del servidor.

5. Revisión de Resultados

- Una vez completado el análisis, acceda a los resultados desde el panel de control.
- Los resultados estarán organizados en diferentes secciones que incluyen:
 - Resistencia a los antimicrobianos: Un informe detallado sobre las mutaciones asociadas con la resistencia a diversos medicamentos antifímicos como isoniazida, rifampicina, etambutol, y pirazinamida.
 - Perfil de Linaje: Identificación del linaje de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis*.
 - Mutaciones Específicas: Una lista de todas las mutaciones identificadas en el genoma con su posible impacto.
 - Estadísticas de Calidad: Información sobre la calidad de las secuencias y el mapeo.

- Códigos Octales: Interpretación de los códigos octales que representan combinaciones de datos asociados a espoligotipo que posteriormente se someten a bases de datos para la identificación de espoligotipos *in silico*.

6. Exploración Detallada de Resultados

- Resistencia a los antimicrobianos:
 - Revise las mutaciones específicas responsables de la resistencia a cada medicamento.
 - Consulte las interpretaciones y las bases de datos de referencia usadas para la predicción.
- Perfil de Linaje:
 - Determine a qué linaje y sublinaje pertenece la cepa analizada.
 - Compare con linajes conocidos y sus distribuciones geográficas.
- Mutaciones Específicas:
 - Analice cada mutación reportada para entender su impacto potencial en la resistencia y la virulencia.
- Estadísticas de Calidad:
 - Verifique la calidad de las secuencias y el alineamiento para asegurar la fiabilidad de los resultados.
- Códigos Octales:
 - Revise los códigos octales. Estos códigos son representaciones compactas de los perfiles de resistencia y pueden ser interpretados de la siguiente manera:

- Cada posición en el código octal representa la resistencia a un medicamento específico.
- Un dígito en el código octal puede variar de 0 a 7, donde cada número indica una combinación específica de resistencias.
- Consulte la tabla de referencia proporcionada por TB-Profiler para interpretar cada código octal en términos de resistencias específicas.

7. Exportación y Descarga de Resultados

- Exporte los resultados en formatos deseados (e.g., CSV, PDF) para su posterior análisis o presentación.
- Descargue todos los informes generados para almacenarlos localmente o compartirlos con colegas.

Espoligotipificación in silico en la base de datos SITVIT2

Partiendo de los códigos octales obtenidos con TB-Profiler, estos se evalúan en la base de datos SITVIT2 (Surveillance of Inherited Tuberculosis Variants in Isolates and Transmissions), la cual es una base de datos global del Instituto Pasteur de Guadalupe; recopila y analiza variantes genéticas asociadas a la transmisión y la resistencia a los antimicrobianos en *Mycobacterium tuberculosis*, además de contener información acerca de los espoligotipos (SIT) depositados en la misma.

Preparativos Previos

1. **Acceso a Internet:** Asegúrese de tener una conexión a Internet estable.
2. **Cuenta en TB-Profiler:** Asegúrese de tener una cuenta en TB-Profiler.
3. **Acceso a la Base de Datos SITVIT2:** Familiarícese con la base de datos SITVIT2 disponible en <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>
4. **Resultados de TB-Profiler:** Tenga a mano los resultados del análisis del genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo los códigos octales.

Pasos para Establecer el Espoligotipo

1. Acceso a la Plataforma TB-Profiler

- Vaya al sitio web de TB-Profiler.
- Inicie sesión con sus credenciales si es necesario.

2. Revisión de Resultados del Análisis en TB-Profiler

- Acceda a los resultados del análisis del genoma completo.
- Localice los códigos octales proporcionados en el informe de resultados. Estos códigos representan los patrones de espoligotipo.

3. Interpretación de Códigos Octales

- Cada posición en el código octal representa un espacio de 3 bits del espoligotipo binario.
- Convertir el código octal a binario es esencial para obtener el patrón de espoligotipo:
 - 0 = 000
 - 1 = 001
 - 2 = 010
 - 3 = 011
 - 4 = 100
 - 5 = 101
 - 6 = 110
 - 7 = 111
- Por ejemplo, un código octal de 756 sería convertido a binario como 111101110.

4. Conversión de Códigos Octales a Binario

- Escriba cada dígito del código octal y conviértalo a su equivalente binario.

- Combine los bits binarios para formar una secuencia continua que representa el patrón de espoligotipo.

5. Acceso a la Base de Datos SITVIT2

- Vaya al sitio web de SITVIT2.
- Navegue a la sección de búsqueda de espoligotipo.

6. Búsqueda del Espoligotipo en SITVIT2

- Introduzca la secuencia binaria obtenida en el campo de búsqueda correspondiente.
- Realice la búsqueda para encontrar coincidencias en la base de datos.

7. Interpretación de Resultados en SITVIT2

- La base de datos proporcionará el espoligotipo correspondiente al patrón binario.
- Revise la información adicional proporcionada por SITVIT2, como la identificación del linaje (SIT) y la distribución geográfica.

8. Documentación y Registro de Resultados

- Registre el espoligotipo obtenido junto con el código octal original y la información del genoma.
- Documente cualquier observación relevante sobre la coincidencia y la información epidemiológica asociada.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se basó en análisis e interpretación de frecuencias (estadística descriptiva), y análisis de correlación (estadística inferencial), empleando los *software* SPSS IBM® Statistics V.27 y GraphPad Prism V.9. Se realizaron pruebas de normalidad para establecer el tipo de análisis de correlación, considerándose Pearson para datos con

normalidad, o τ de Kendall para datos no paramétricos. La información se gráfico o interpretó en tablas.

IV. RESULTADOS

Descripción epidemiológica de la población de estudio:

Se recolectó la información clínica y muestras de pacientes diagnosticados con TB que atendieron consulta en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (Monterrey, N.L., MX.) durante el período 2021 – 2023. La población de estudio se conformó de 60 pacientes, de los cuales: 10 (16.7 %) se diagnosticaron en 2021, 13 (21.7 %) en 2022, y 37 (61.7 %) en 2023.

De 60 pacientes, su mayoría reportó tener educación básica concluida ($n = 42$; 70.0 %) – incluyendo nivel primaria y/o secundaria, de acuerdo con los niveles educativos impartidos en México –, 5 (8.3 %) reportó tener educación media superior, 3 (5.0 %) grado superior, y 10 (16.7 %) sin nivel de estudios, en algunos casos relacionados con la edad (menores de edad).

Con relación al sexo de la población, 46 (76.7 %) correspondieron a sexo masculino, y 14 (23.3 %) a personas de sexo femenino. De ello, las edades que presentaron más casos de TB se encontraban entre los 25 y 55 años para ambos sexos (Figura 5), con una media de 37 años, desviación estándar de 16 años, y rango de 3 a 84 años.

En la evaluación de comorbilidades reportadas, la mitad de los casos ($n = 30$; 50.0 %) no se reportaron comorbilidades, y entre los casos que sí se encontraban presentes destacó la DM ($n = 17$, 28.3 %), e infección con VIH ($n = 6$; 10.0 %); el resto se distribuyó entre otras comorbilidades (Figura 6). Un análisis de correlación por la prueba de τ de Kendall demostró que existe correlación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con un -0.588 entre las comorbilidades y edades de los pacientes (Figura 7), destacando que personas de 40 a 63 años presentan DM y TB, mientras que en los casos de coinfección con VIH se presentaron principalmente en personas de 35 a 50 años.

De acuerdo con el tipo de TB diagnosticada en su momento, el 83.3 % ($n = 50$) fue de tipo pulmonar, y el 16.7 % tuvo hallazgo extrapulmonar ($n = 10$).

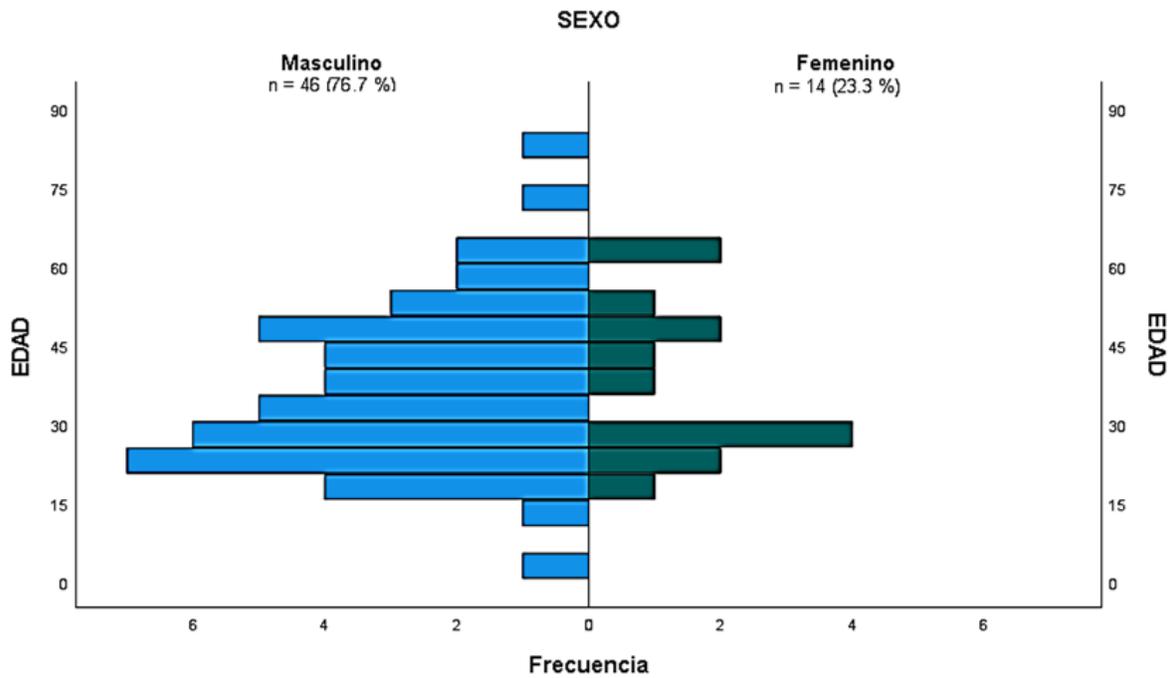


Figura 5. Pirámide poblacional de los 60 pacientes diagnosticados con TB en el Hospital Universitario, durante el período 2021 – 2023, y analizados en este estudio
n = 60.

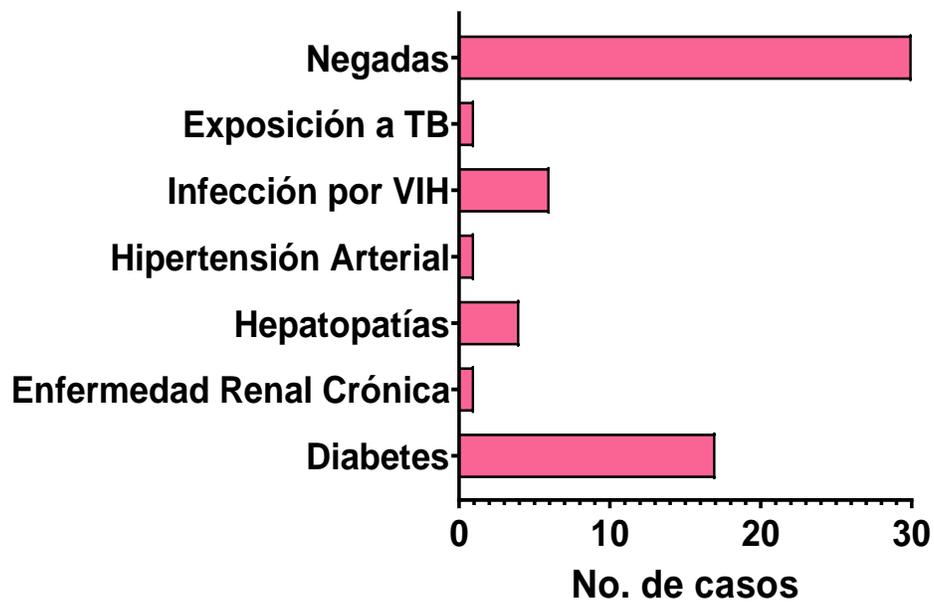


Figura 6. Comorbilidades reportadas en la población de estudio
n = 60.

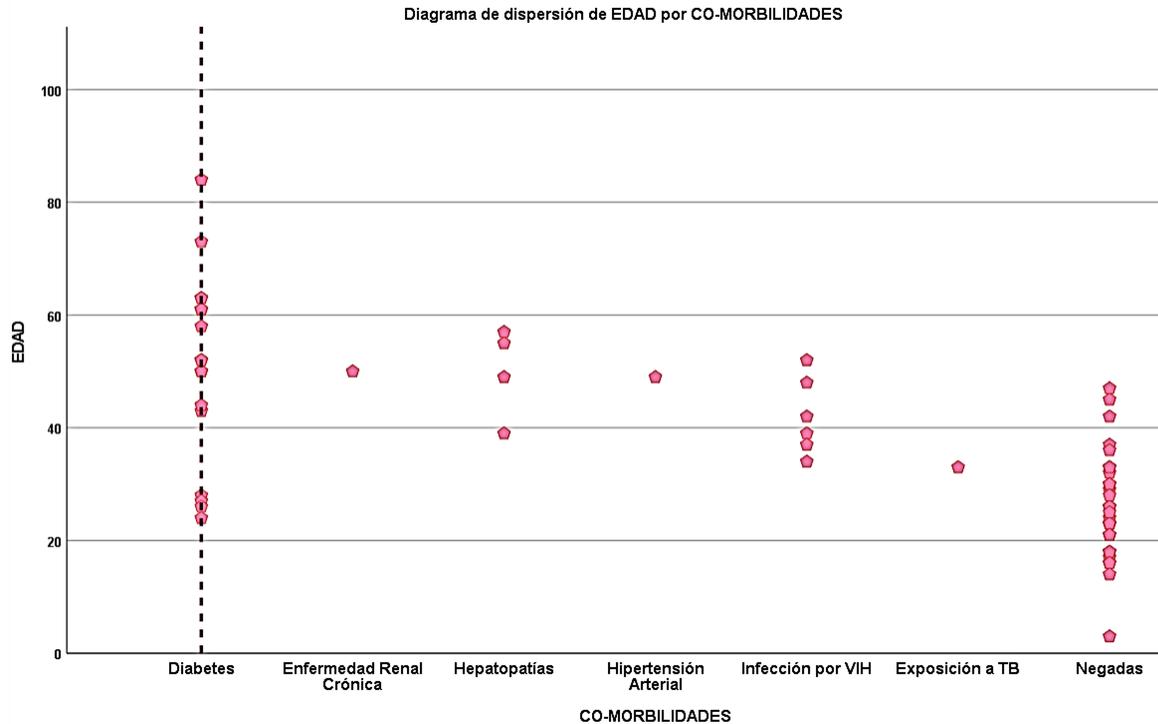


Figura 7. Diagrama de dispersión de edad y comorbilidades de la población de estudio
 n = 60; Correlación significativa bilateral ($P < 0.001$) por τ de Kendall.

Finalmente, se consideró como datos sociodemográficos de interés la entidad federativa de origen de los pacientes; esto debido a evaluar o sugerir la posible migración de los sublinajes del MTBC hacia la zona metropolitana de Monterrey. De mano con lo anterior, también se consideró en municipio de residencia al momento de realizar el diagnóstico (Tabla 02). Los resultados mostraron que el 76.7 % (n = 46) tuvieron como entidad federativa de origen al estado de Nuevo León, así mismo se tuvo reporte de personas originarias de otros estados de la frontera norte de México como Chihuahua (n = 2; 3.3 %), Coahuila (n = 3; 5.0%) y Tamaulipas (n = 3; 5.0 %); hacia la zona centro – norte del país, se tuvieron personas originarias de San Luis Potosí y Zacatecas, con 2 (3.3 %) y 3 (5.0 %) casos respectivamente; además se reportó un caso (1.7 %) de una persona originaria de Cuba. Por otro lado, sobre los municipios de residencia indicados por los pacientes al momento de su diagnóstico, se encontró que el 50 % (n = 30) residían en la ciudad de Monterrey; el resto de la población se distribuyó entre otros municipios que conforman la zona metropolitana de Monterrey (Tabla 02).

Tabla 02. Frecuencias por municipio de residencia reportados en la población de estudio		
Municipio de residencia	n	%
Apodaca	9	15.0 %
García	5	8.3 %
General Escobedo	4	6.7 %
General Zuazua	1	1.7 %
Guadalupe	3	5.0 %
Juárez	2	3.3 %
Monterrey	30	50 %
Santa Catarina	1	1.7 %
Foráneo	5	8.3 %

n = 60

Secuenciación de Genoma Completo y asignación de linajes del MTBC a los aislados clínicos de MTB:

Posterior al procesamiento de cada muestra se obtuvo el ADN purificado de los 60 pacientes y se llevó a secuenciación de genoma completo por *Illumina MiSeq*. Los archivos resultantes de las lecturas crudas (FASTQ) se ensamblaron y alinearon en la plataforma BV-BRC (*Comprehensive Genome Analysis*) usando como referencia a *M. tuberculosis* H37Rv (NCBI: NC_000962.3), y se realizó un diagnóstico de su calidad. Todos los genomas tuvieron una buena calidad, obteniendo el genoma completo de cada una de ellas, con un tamaño de ~4.22 Mpb, contenido de GC del 65 %, rango de *contigs* de 80 – 150, cobertura y consistencia >99 %, y profundidad >60.

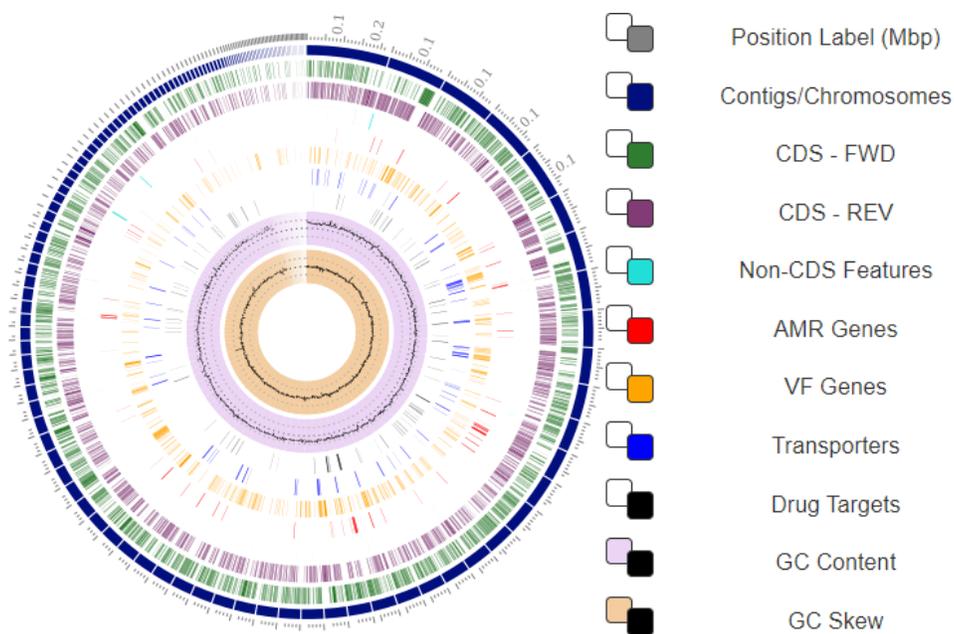


Figura 8. Ejemplo representativo del genoma completo de *M. tuberculosis* obtenido

Genoma de 4.33 Mpb, 138 *contigs*, contenido de GC de 65.56 %.

Paralelamente, los archivos FASTQ fueron sometidos a su alineamiento en la herramienta Tb-Profiler, para la asignación de su linaje en el MTBC y otras características de su perfil genómico, así como la identificación de SNP asociados a la resistencia a los antimicrobianos.

Tabla 03. Perfil genómico dentro del MTBC de las cepas de estudio				
ID	Sublinaje del MTBC	Familia	Tipo de familia	RDs
TBPO6839	1.2.1.2	Indo-Oceánica	Clásica	RD239
TBPO6858	2.2.1.1	Este-Asiática	Beijing	RD105;RD207;RD181;RD150
TBPO5254	2.2.1.2	Este-Asiática	Beijing	RD105;RD207;RD181;RD142
TBPO6859	2.2.1.2	Este-Asiática	Beijing	RD105;RD207;RD181;RD142
TBPO9256	2.2.1.2	Este-Asiática	Beijing	RD105;RD207;RD181;RD142
TBPO9274	2.2.1.2	Este-Asiática	Beijing	RD105;RD207;RD181;RD142
TBPO5249	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO5250	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO6852	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO9264	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO9266	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO9275	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO9276	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO9282	4.1.1	Euro-Americana	X-type	None
TBPO9272	4.1.1.1	Euro-Americana	X-type	RD183
TBPO9277	4.1.1.1	Euro-Americana	X-type	RD183
TBPO5246	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO6840	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO6847	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO6850	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO6862	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO9262	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193

TBPO9265	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO9268	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO9270	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO9273	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO9283	4.1.1.3	Euro-Americana	X-type	RD193
TBPO6843	4.1.2	Euro-Americana	Clásica	None
TBPO9259	4.1.2	Euro-Americana	Clásica	None
TBPO5245	4.1.2.1	Euro-Americana	Haarlem	RD182
TBPO6846	4.1.2.1	Euro-Americana	Haarlem	RD182
TBPO6848	4.1.2.1	Euro-Americana	Haarlem	RD182
TBPO6851	4.1.2.1	Euro-Americana	Haarlem	RD182
TBPO9269	4.1.2.1	Euro-Americana	Haarlem	RD182
TBPO6854	4.3.2	Euro-Americana	LAM	None
TBPO6855	4.3.2	Euro-Americana	LAM	None
TBPO9263	4.3.2	Euro-Americana	LAM	None
TBPO9281	4.3.2	Euro-Americana	LAM	None
TBPO6842	4.3.3	Euro-Americana	LAM	RD115
TBPO6860	4.3.3	Euro-Americana	LAM	RD115
TBPO9254	4.3.3	Euro-Americana	LAM	RD115
TBPO9258	4.3.3	Euro-Americana	LAM	RD115
TBPO9279	4.3.3	Euro-Americana	LAM	RD115
TBPO6864	4.3.4.1	Euro-Americana	LAM	RD174
TBPO9257	4.3.4.1	Euro-Americana	LAM	RD174
TBPO6844	4.3.4.2	Euro-Americana	LAM	RD174
TBPO6845	4.3.4.2	Euro-Americana	LAM	RD174
TBPO6856	4.3.4.2	Euro-Americana	LAM	RD174
TBPO9278	4.3.4.2	Euro-Americana	LAM	RD174
TBPO5247	4.4.1.1	Euro-Americana	S-type	None
TBPO6849	4.4.1.1	Euro-Americana	S-type	None
TBPO9271	4.4.1.2	Euro-Americana	S-type	None

TBPO5255	4.7	Euro-Americana	Mainly T	None
TBPO5248	4.8	Euro-Americana	Mainly T	RD219
TBPO6841	4.8	Euro-Americana	Mainly T	RD219
TBPO6853	4.8	Euro-Americana	Mainly T	RD219
TBPO6857	4.8	Euro-Americana	Mainly T	RD219
TBPO9267	4.8	Euro-Americana	Mainly T	RD219
TBPO9280	4.8	Euro-Americana	Mainly T	RD219
TBPO9260	4.9	Euro-Americana	H37Rv-like	None

Los resultados de la población de estudio mostraron un predominio del 90 % (n = 54) correspondiente al linaje 4 (Familia Euro-Americana) del MTBC; además, se registraron 5 casos (8.3 %) del linaje 2 (Familia Este-Asiática) y un único caso (1.7 %) del linaje 1 (Familia Indo-Oceánica), no siendo común su presencia en el noreste de México (Tabla 03). Al realizar una evaluación más exhaustiva sobre los sublinajes del MTBC se encontró que el caso del linaje 1 correspondió al L.1.2.1.2; mientras que para el caso del linaje 2 se clasificaron en 2 sublinajes: L.2.2.1.1 (n = 1; 1.7 %) y L.2.2.1.2 (n = 4; 6.7 %). El linaje 4 presentó mayor diversidad de sublinajes, destacando que los más predominantes fueron el L.4.1.1.3 (n = 11, 18.3 %), L.4.1.1 (n = 8; 13.3 %) y L.4.8 (n = 6; 10.0 %); el resto de las cepas se distribuyeron en otros sublinajes (Tabla 04 y Figura 9).

Tabla 04. Frecuencias de los sublinajes encontrados en la población de estudio		
Sublinaje del MTBC	n	%
1.2.1.2	1	1.7%
2.2.1.1	1	1.7%
2.2.1.2	4	6.7%
4.1.1	8	13.3%
4.1.1.1	2	3.3%
4.1.1.3	11	18.3%
4.1.2	2	3.3%
4.1.2.1	5	8.3%
4.3.2	4	6.7%
4.3.3	5	8.3%
4.3.4.1	2	3.3%
4.3.4.2	4	6.7%
4.4.1.1	2	3.3%
4.4.1.2	1	1.7%

4.7	1	1.7%
4.8	6	10.0%
4.9	1	1.7%

n = 60

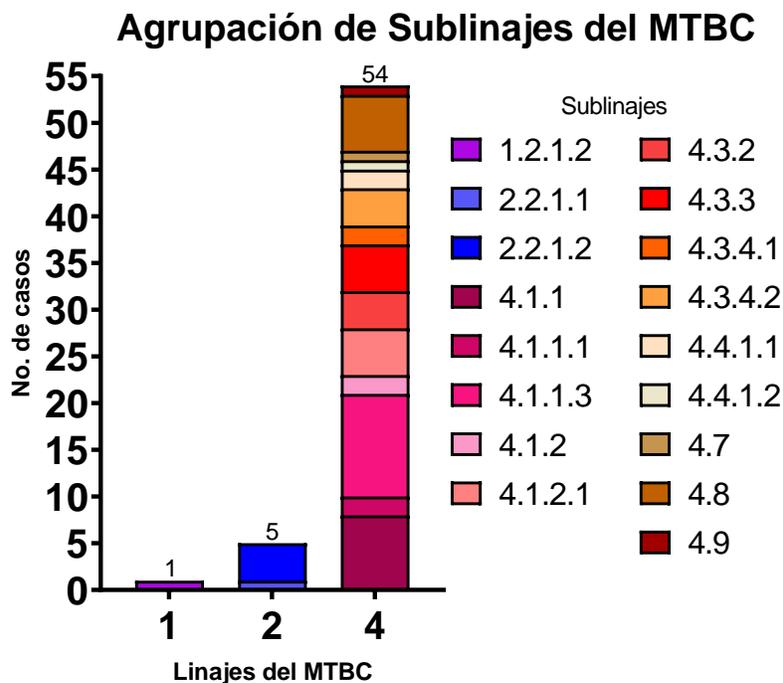


Figura 9. Agrupación de sublinajes del MTBC de la población de estudio
n = 60.

Con relación a las subfamilias del MTBC a las que pertenecen, las cepas del linaje 2 tienen como subfamilia al tipo Beijing, mientras que las cepas del linaje 4 presentaron siete subfamilias, dónde predominaron las de tipo X (n = 21; 35.0 %), LAM (n = 15; 25.0 %) y tipo T (n = 7; 11.7 %) (Tabla 05).

Tabla 05. Frecuencias de las subfamilias del MTBC de la población de estudio		
Subfamilia del MTBC	n	%
Clásica	3	5.0%
Beijing	5	8.3%
Tipo X	21	35.0%
Haarlem	5	8.3%
LAM	15	25.0%
Principalmente T	7	11.7%
Tipo H37Rv	1	1.7%
Tipo S	3	5.0%

n = 60

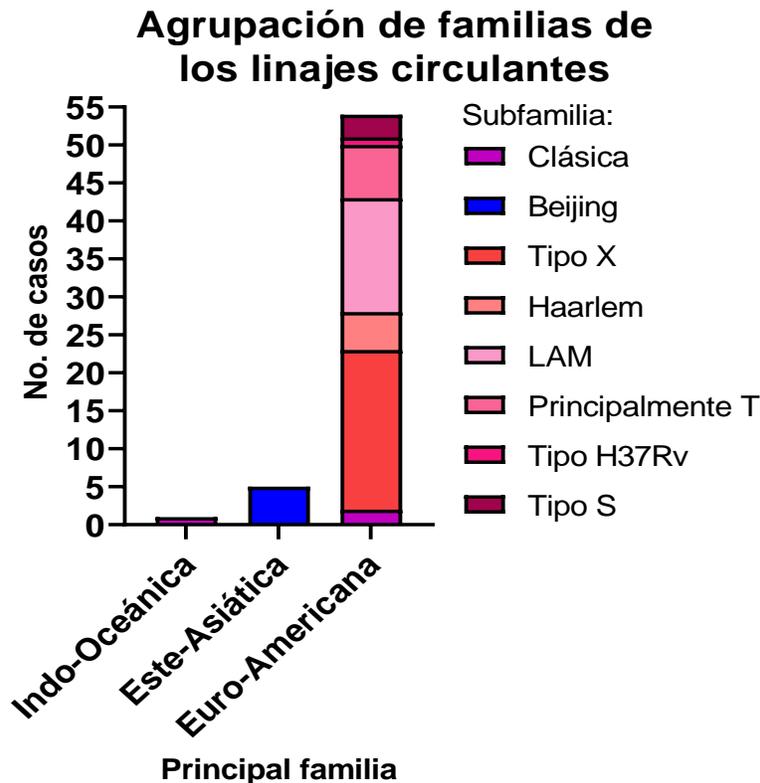


Figura 10. Agrupación de subfamilias del MTBC de la población de estudio n = 60.

Análisis filogenético de los perfiles de las secuencias de MTB obtenidas:

Sumado a la información obtenida por el TB-Profiler, la herramienta aporta el código octal de espoligotipo de cada cepa; tal código fue analizado en la base de datos del Instituto Pasteur de Guadalupe SITVIT2, a fin de determinar su espoligotipo y clado. Los resultados mostraron una amplia diversidad de códigos octales, y por ende de su representación binaria (Tabla 06). Aunque al determinar el espoligotipo en el cual se agruparon tales códigos octales se encontró que SIT119 tiene la mayor frecuencia (n = 13; 21.7 %) como espoligotipo circulante entre los aislados analizados; a esto le sigue SIT53 con 8 casos (13.3 %) y SIT1 con 5 casos (8.3 %); además se reportaron 12 casos (20.0 %) con espoligotipo huérfano. Cabe mencionar que tanto SIT119 (Clado X1) como SIT53 (Clado T1) se encontraron en cepas de linaje 4, mientras que SIT1 (Clado Beijing) pertenece a las cepas de linaje 2. Además, el único caso de linaje 1 mostró espoligotipo SIT19 de clado EAI2-Manila (Tablas 06 a 08).

TB-Profiler categoriza los perfiles de susceptibilidad con base en las mutaciones asociadas a ello de acuerdo con la literatura bien definida como libros, o reportes de la OMS. En este sentido, determina como sensible a toda aquella cepa que no cuente con mutaciones en genes asociados a la adquisición de resistencia a los antimicrobianos, o en su defecto sean mutaciones sin sentido. Otras categorías que incluye esta herramienta bioinformática son: exclusivamente resistencia a rifampicina (Rifampicin Resistant, RR-TB), resistencia de alto riesgo (High Risk, HR-TB) cuando se tiene resistencia a Isoniazida, multiresistencia (MDR-TB) cuando existe resistencia a 2 o más antifímicos y que incluya resistencia a rifampicina, Pre-extremadamente resistente (Pre-XDR-TB) cuando tiene resistencia a los 4 antifímicos y además presenta resistencia a otros antimicrobianos no inyectables, Extremadamente resistente (XDR-TB) cuando además de incluir las resistencias ya mencionadas también tiene resistencia a inyectables, y finalmente resistente a otros antimicrobianos (Other) cuando se tiene resistencia a antimicrobianos de 2ª o 3ª línea como fluoroquinolonas o estreptomina, pero no así a los de 1ª línea.

De acuerdo con la información genómica dada por las 60 secuencias analizadas, y los perfiles emitidos por TB-Profiler, se determinó que el 58.3 % (n = 35) presentan un perfil sensible a los antimicrobianos; el 41.7% (n = 25) restante mostró resistencia a uno o más antimicrobianos, agrupándose en los siguientes perfiles: RR-TB (n = 1; 1.7%), HR-TB (n = 9; 18.3 %), Other (n = 11; 18.3 %), MDR-TB (n = 3; 5.0%), Pre-XDR-TB (n = 1; 1.7 %).

Al realizar un cruzamiento de esta información con los sublinajes del MTBC, se estableció que la cepa de linaje 1 no presenta mutaciones asociadas a la resistencia de los antimicrobianos, al igual que dos cepas del linaje 2. De manera similar, aproximadamente el 66 % de las cepas pertenecientes al linaje 4 (n = 32/54) tampoco mostraron mutaciones asociadas a la RAM, pero las 22 cepas restantes de este mismo linaje sí presentaron perfiles de RAM, incluidos el 100 % de los casos de Pre-XDR-TB, MDR-TB, HR-TB y RR-TB (Figura 11).

Posteriormente se realizaron pruebas de correlación de τ de Kendall para evaluar si existía entre los perfiles de susceptibilidad y los perfiles genómicos de los aislados clínicos. Se encontró que para el caso de la susceptibilidad frente al tipo de familia del MTBC, y el caso de susceptibilidad frente a los sublinajes del MTBC sí existe una correlación

significativa ($P < 0.05$, para ambos casos). En la evaluación de perfil de susceptibilidad \times tipo de familia (Coef. de correlación -0.296) se observó que la familia de tipo X alberga la mayoría de los perfiles RAM, con excepción de RR-TB, es cual está relacionado con la familia de tipo T; así mismo, la familia de tipo S presentó perfil MDR-TB y HR-TB (Figura 12). Por otro lado, la evaluación perfil de susceptibilidad \times sublinaje (Coef. de correlación -0.321) mostró que el L.4.1.1.3 presenta tres perfiles RAM, incluido el caso Pre-XDR-TB y algunos de los casos MDR-TB; este último perfil también se vio presente en el L.4.4.1.1. Uno de los perfiles RAM con mayor diversidad entre sublinajes fue el HR-TB, el cual se detectó entre miembros de los sublinajes 4.1.1, 4.1.1.3, 4.1.2.1 y 4.4.1.2. Otro hallazgo detectado fue que el único caso RR-TB correspondía a una cepa del L.4.8 (Figura 13).

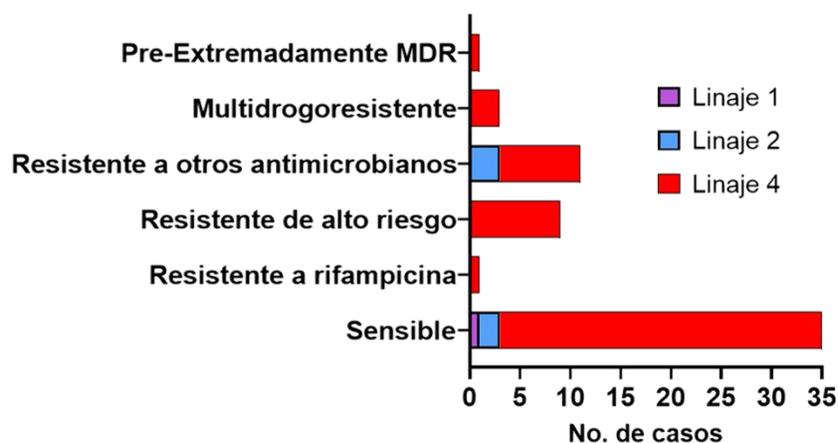


Figura 11. Perfil (genómico) de susceptibilidad a los antimicrobianos y linajes del MTBC que lo presentan
n = 60.

Sobre las mutaciones identificadas se encontró que para el caso de resistencia a la rifampicina 5 muestras contenían mutaciones en *rpoB*: Phe424Ser, Ser450Leu; esta última estuvo presente en 4 de las 5 muestras, que además incluían los perfiles de Pre-XDR-TB y MDR-TB. Para el caso de resistencia a la isoniazida, se encontraron mayor diversidad de genes mutados asociado a ello, incluyendo mutaciones en *ahpC* (Asp73His), *katG* (Ser315Thr), *fabG1* (c.-15C>T)¹, *inhA* (c.-154G>A; Ile21Val); se destaca el hecho que la cepa Pre-XDR-TB contenía mutaciones en *ahpC* y *katG*, así como una cepa MDR-TB. Por su parte, la resistencia al etambutol estuvo asociada a 3 mutaciones diferentes del gen *embB*:

¹ Actualmente la mutación en *fabG1* (c.-15C>T) se ha actualizado a ser *inhA* (c.-777C>T)

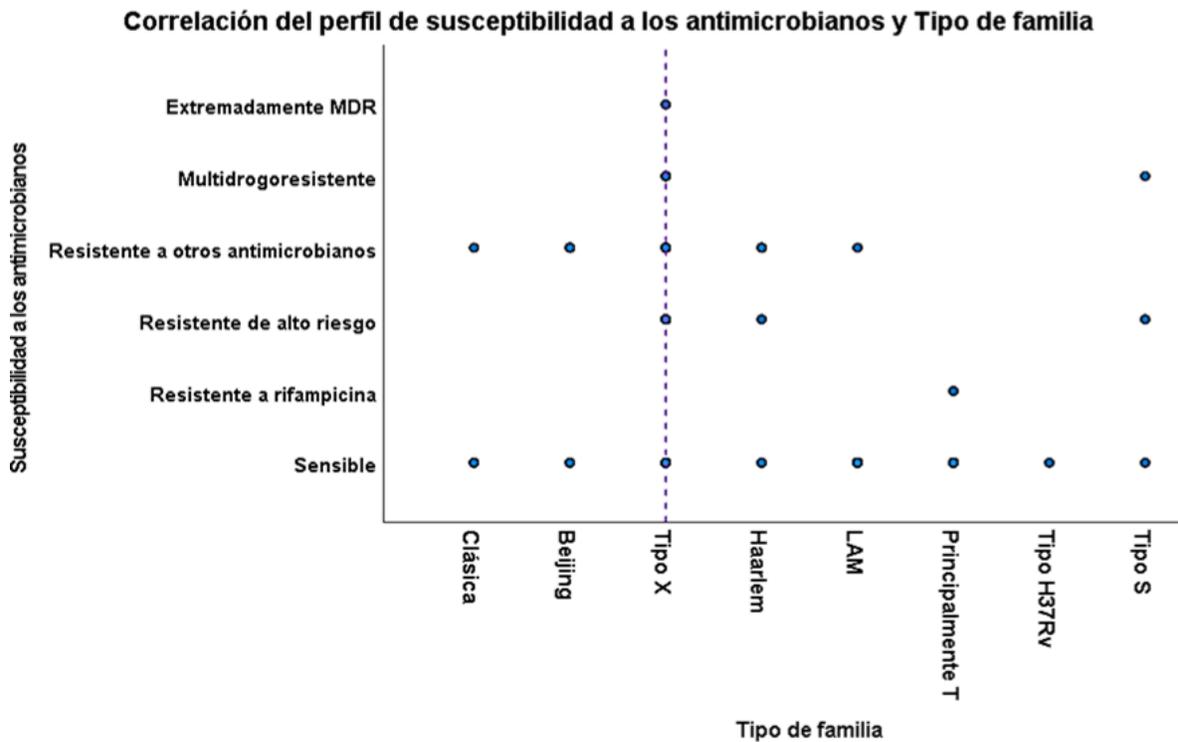


Figura 12. Correlación del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y el tipo de familia del MTBC n = 60, Correlación significativa bilateral ($P < 0.05$) por τ de Kendall ($P = 0.007$).

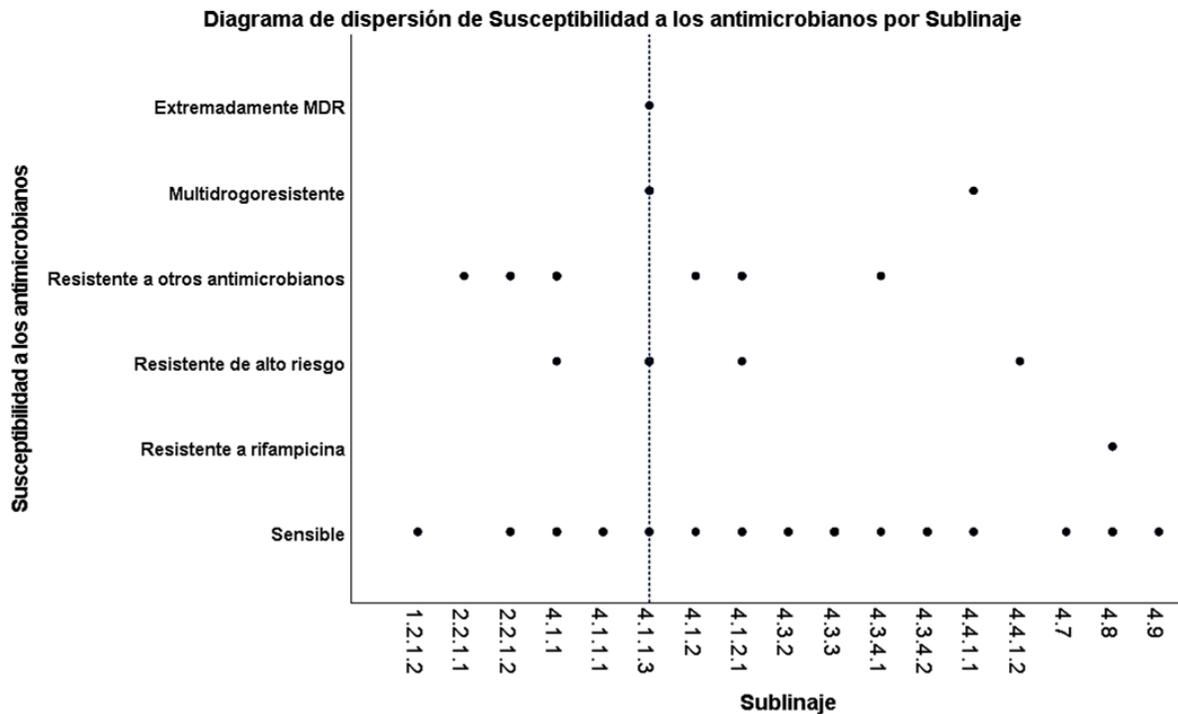


Figura 13. Correlación del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y sublinajes del MTBC n = 60, Correlación significativa bilateral ($P < 0.05$) por τ de Kendall ($P = 0.041$).

Met306Leu, Met306Ile y Asp1024Asn. De forma similar, la resistencia a la pirazinamida se relaciona con 3 mutaciones diferentes en el gen *pncA*: Asp63Ala, Gly78Asp y Val139Gly. Además, se encontraron mutaciones en otros genes asociados a resistencia a otros antimicrobianos, detallados en la Tabla 09; destaca el hallazgo de la detección de mutaciones en *ethA* (Glu223Lys) y *folC* (Glu40Gln; Glu40Gly), relacionadas con resistencia a la etionamida y ácido p-aminosalicílico respectivamente, fármacos en desuso desde un tiempo considerable; esto sugiere la preservación de estas mutaciones a través del tiempo.

Tabla 09. Mutaciones detectadas en los perfiles genómicos de MTB-RAM										
Antimicrobiano	Gen mutado	Mutación	Linaje que la presenta	n	Perfil de susceptibilidad	ID	N			
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Phe424Ser	4.1.1.3	1	MDR-TB	TBPO6862	5			
		Ser450Leu	4.1.1.3	2	Pre-XDR-TB	TBPO9273				
			4.4.1.1	1	MDR-TB	TBPO9883				
			4.8	1	MDR-TB	TBPO5247				
			4.8	1	RR-TB	TBPO6841				
Isoniazida	<i>ahpC</i>	Asp73His	4.1.1.3	9	HR-TB	TBPO6840	16			
						TBPO6850				
						TBPO9262				
						TBPO9268				
						TBPO9270				
						TBPO5246				
					MDR-TB	TBPO6862				
						TBPO9283				
						TBPO9273				
	<i>katG</i>	Ser315Thr	4.1.1.3	2	MDR-TB	TBPO9283				
						Pre-XDR-TB		TBPO9273		
					4.4.1.1			1	MDR-TB	TBPO5247
					4.4.1.2			1	HR-TB	TBPO9271
					<i>fabG1</i>	c.-15C>T		4.1.1	1	HR-TB
<i>inhA</i>	c.-154G>A	4.1.2.1	1	HR-TB	TBPO6851					
<i>inhA</i>	Ile21Val		1							
Etambutol	<i>embB</i>	Met306Leu	4.3.4.1	1	Other	TBPO6864	6			
		Met306Ile	4.1.1.3	1	Pre-XDR-TB	TBPO9273				
			4.4.1.1	1	MDR-TB	TBPO5247				
			4.4.1.2	1	HR-TB	TBPO9271				
		4.4.1.1	1							
		Asp1024Asn	4.4.1.1	1	MDR-TB	TBPO5247				

Pirazinamida	<i>pncA</i>	Asp63Ala	4.4.1.1	1	MDR-TB	TBPO5247	3	
		Gly78Asp	4.1.1.3	1	Pre-XDR-TB	TBPO9273		
		Val139Gly	4.4.1.2	1	HR-TB	TBPO9271		
Estreptomicina	<i>Gid</i>	p.Gln125*	4.1.1	2	HR-TB	TBPO6852	7	
					Other	TBPO9266		
		c.115delC	4.1.1.3	1	HR-TB	TBPO9268		
	<i>rpsL</i>	Lys43Arg		2.2.1.1	1	Other		TBPO6858
				4.1.1.3	2	Pre-XDR-TB		TBPO9273
						MDR-TB		TBPO9283
				4.1.2.1	1	Other		TBPO9269
Fluoroquinolonas, Moxifloxacino, Ofloxacino, Levofloxacino, Ciprofloxacino	<i>gyrA</i>	Ala90Val	4.1.1.3	1	Pre-XDR-TB	TBPO9273	7	
		Ser91Pro	2.2.1.2	2	Other	TBPO5254		
					Other	TBPO6859		
		Asp89Asn	4.1.2	1	Other	TBPO9259		
		Asp94Gly		2				
			4.1.1		Other	TBPO5250		
Asp94Ala	4.1.2.1	1	Other	TBPO6846				
Etionamida	<i>ethA</i>	Glu223Lys	4.1.1	3	Other	TBPO9282	5	
					Other	TBPO9264		
					Other	TBPO5250		
	<i>inhA</i>	c.-154G>A	4.1.2.1	1	HR-TB	TBPO6851		
	<i>fabG1</i>	c.-15C>T	4.1.1	1	HR-TB	TBPO6852		
Ácido P-aminosalicílico	<i>folC</i>	Glu40Gln	4.1.1.3	2	Pre-XDR-TB	TBPO9273	3	
					MDR-TB	TBPO9283		
		Glu40Gly	4.3.4.1	1	Other	TBPO6864		

n = 25

Para la construcción del árbol filogenético de las 60 secuencias de estudio se empleó la herramienta BV-BRC, por método de máxima verosimilitud de clado, y se incluyó a *M. canettii* CIPT140010059 como miembro raíz debido a que es el antecesor común del MTBC. Además, se incluyeron miembros representativos del MTBC como: *M. microti* ATCC 19422, *M. pinnipedii* ATCC BAA-688, *M. mungi* BM22813, *M. bovis* ATCC BAA-935 y *M. africanum* K85; y *M. tuberculosis* H37Rv como cepa de referencia.

La distribución de hojas y ramas del árbol fue la esperada, pues agrupó de forma independiente a los diferentes linajes encontrados (L.1, L.2 y L.4). A nivel de sublinaje, el agrupamiento fue casi perfecto, pues con excepción de 2 casos (TBPO9271 y TBPO6846), cada uno de los miembros se agrupó según su sublinaje; las excepciones se pueden deber en

parte a que desde la asignación de sublinaje en TB-Profiler, se contemplaban como dos probables asignaciones a ellos. No obstante, de acuerdo con el *bootstrap* se demuestra una fuerte confianza en la distribución entre ramas, aunque no se estableció una relación entre clonas, por lo que cada cepa es diferente entre sí.

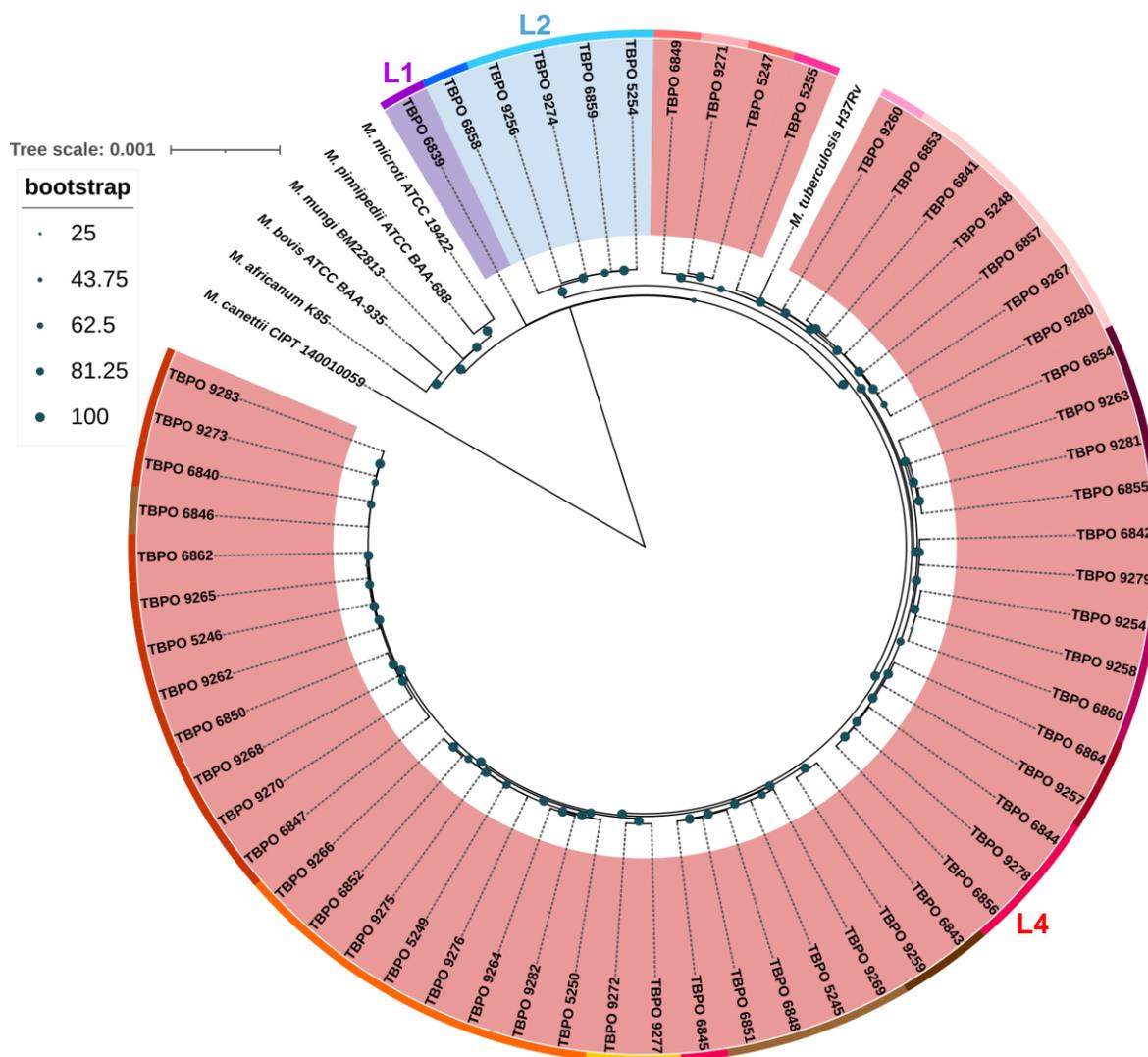


Figura 14. Árbol filogenético de las 60 secuencias de *M. tuberculosis* analizadas en este estudio n = 60; se incluyen miembros representativos de MTBC y *M. canettii* como antecesor común.

Posteriormente, a fin de tener una visión más exhaustiva de las cepas con perfiles RAM, se realizó la construcción de otro árbol incluyendo únicamente a las 25 cepas con mutaciones detectadas asociadas a RAM. Sumado a ello, se incluyeron 19 secuencias cuyas lecturas crudas (FASTQ) fueron descargadas de la base de datos *European Nucleotide Archive* con número de proyecto [PRJEB30933](https://www.ebi.ac.uk/ena/record/PRJEB30933) (Jiménez Ruano y otros, 2021). Se descargaron los FASTQ correspondientes a las 85 secuencias de su proyecto, y fueron

procesadas de la misma manera que se procesaron las secuencias de nuestro estudio, luego se seleccionaron 19 secuencias a conveniencia que presentaran mutaciones similares a las detectadas en nuestro estudio; el objetivo de lo anterior fue conocer si existía relación clonal o movilidad de cepas entre nuestras muestras de estudio y la del proyecto de Jiménez Ruano y otros (2021), debido que su proyecto incluía cepas de todo México, particularmente de la zona sur del país.

Los resultados de la construcción del árbol filogenético de cepas RAM (Figura 15), mostró el predominio del L.4.1.1.3 con perfiles HR-TB, MDR-TB y Pre-XDR-TB. En ningún caso se mostró una relación clonal, pero sí similitud filogenética estrecha con valores de *bootstrap* >95. Uno de los hallazgos de interés fue la similitud entre la cepa Pre-XDR-TB (TBPO9273) con una cepa MDR-TB (TBPO9283), pues ambas presentaban las mismas mutaciones en los genes *rpoB* (Ser450Leu), *ahpC* (Asp73His) y *katG* (Ser315Thr); esto pone en interés la vigilancia de los casos MDR-TB. Otra agrupación por similitud fue entre dos de los cuatro casos del L.4.1.1, TBPO9264 y TBPO9282 presentaron un perfil “Other”, relacionado con la misma mutación en el gen *ethA* (Glu223Lys), que sugiere la conservación de esta mutación en el tiempo sólo en el L.4.1.1. Dos cepas que igualmente compartieron el perfil “Other”, pero relacionado al gen *gyrA* (Ser91Pro), fueron dos miembros del L.2.2.1.2 (TBPO6859 y TBPO5254), que además fueron las únicas reportadas con esta mutación. Un caso de interés fue la cepa TBPO5247, único miembro del L.4.4.1.1 que presentó perfil MDR-TB, cuyas mutaciones presentes fueron: *rpoB* (Ser450Leu), *katG* (Ser315Thr), *embB* (Met306Leu), *embB* (Asp1024Asn) y *pncA* (Val139Gly), es decir, presenta resistencia (genómica) a los 4 antifímicos de 1ª línea, lo cual pone en interés la vigilancia de este tipo de casos y la búsqueda y rastreo de transmisión.

Por otro lado, en la comparación con las cepas del proyecto PRJEB30933, en general no se encontraron que estuviesen relacionadas con nuestras cepas de estudio, salvo un caso del L.4.8 con perfil RR-TB, que comparte el mismo perfil y mutación en *rpoB* (Ser450Leu). Otras agrupaciones ocurrieron con miembros del L.4.1.2, no obstante, los *bootstrap* tuvieron valores <90.

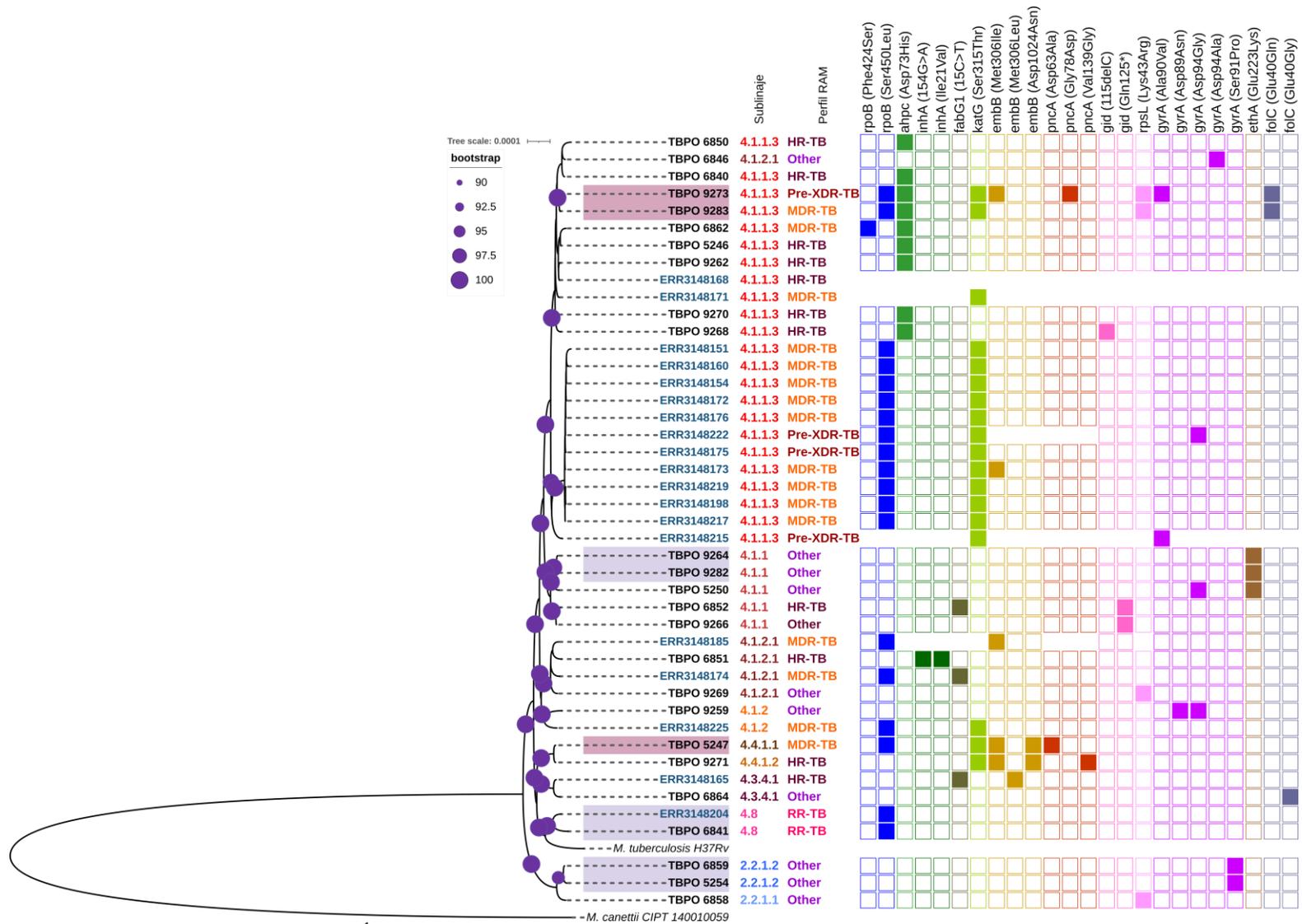


Figura 15. Árbol filogenético de MTB con perfiles RAM y mutaciones asociadas a ello

n = 25; se incluyen miembros del proyecto PRJEB30933 (letras en color azul, iniciando con “ERR”) y *M. canettii* como antecesor común.

Partiendo de las mismas 25 cepas con perfil RAM, se evaluó de donde provenían los casos de acuerdo con la entidad federativa de origen y municipio de residencia de los pacientes. 18 casos (72 %) fueron nativos de Nuevo León, albergando los cuatro perfiles RAM reportados, que de hecho incluyó el total de los casos de MDR-TB, RR-TB y Pre-XDR-TB. Además, otros pacientes con perfil RAM de tipo HR-TB reportaron como entidad federativa a Chihuahua, Tamaulipas y Zacatecas.

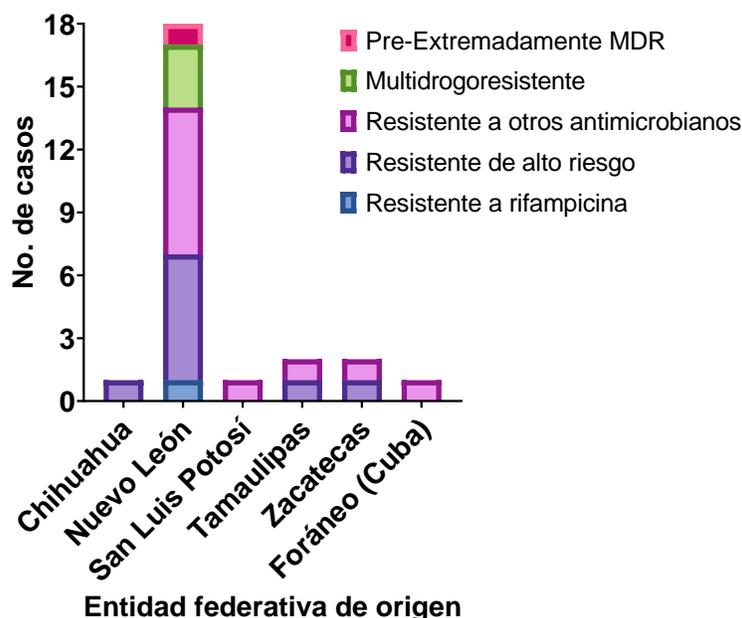


Figura 16. Agrupación de perfiles de MTB RAM y entidad federativa de origen
n = 25.

Centrándose en los municipios de residencia reportados en los casos de cepas de MTB RAM (Figura 17) se encontró que 10 (40 %) personas reportaron residir en Monterrey, que alberga 2/3 de los casos MDR-TB y el caso de RR-TB. El tercer caso MDR-TB correspondía al municipio de Juárez, que además presentó un caso de tipo “Other”. En lo respectivo a los casos de tipo HR-TB, se distribuyeron entre los municipios de la zona metropolitana de Monterrey, tales como: Santa Catarina, General Zuazua, García y Apodaca. Es de resaltar que en este último municipio fue donde igualmente se reportó como residencia del caso Pre-XDR-TB, poniendo en pie nuevamente la importancia de mejorar la vigilancia epidemiológica en los distintos municipios de la zona metropolitana de Monterrey, particularmente en aquellos que presenten casos Pre-XDR-TB, MDR-TB y HR-TB.

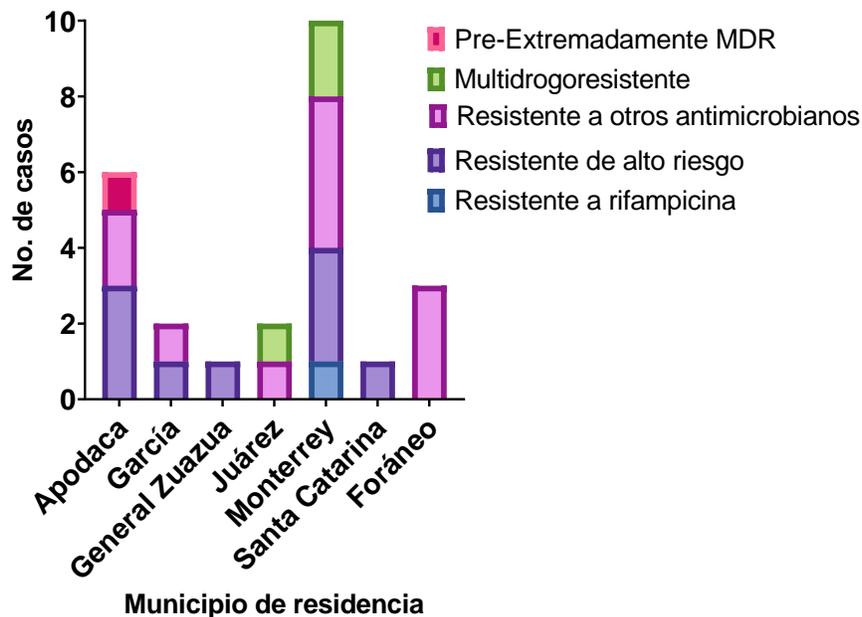


Figura 17. Agrupación de perfiles de MTB RAM y municipio de residencia
n = 25.

Adicionalmente se construyó un árbol filogenético siguiendo la metodología del anterior (Figura 15), pero enfocándolo en evaluar su información de espoligotipado, para lo cual se incluyó el espoligotipo (SIT) y clado obtenido del SITVIT2 de cada una de las muestras, incluidas las del proyecto PRJEB30933, así como el código octal y representación gráfica del código binario. Los resultados mostraron un predominio de SIT119 (n = 10; 40 %), clado X1, en nuestra población de estudio, relacionado principalmente con perfil RAM de tipo HR-TB, y que también incluye dos casos MDR-TB y el caso Pre-XDR-TB. Por su parte, las secuencias seleccionadas de Jiménez Ruano y otros (2021) mostraron predominio del SIT3278, clado X3, lo cual explica que estas no sean agrupadas con nuestras secuencias y, por tanto, que no exista relación clonal entre ellas. (Figura 18).

Otro hallazgo de interés fue la amplia diversidad de códigos octales, como ocurrió en los casos de los miembros del linaje 2 donde las tres cepas se reportaron como SIT1, clado Beijing, aunque los códigos octales fueron diferentes, explicando en la confiable asociación de las ramas del árbol, pero que no sean cepas clonales.

En conjunto con la información proporcionada por los dos árboles filogenéticos de cepas con perfiles RAM se establece que el L.4, particularmente el L.4.1.1.3 (Tipo X), se asocia al SIT119 (clado X1), y se relaciona con la presencia de mutaciones asociadas a RAM.

Finalmente, se realizó una agrupación de sublinajes del MTBC y SIT detectados frente a la entidad federativa de origen reportados. Cabe mencionar que al momento de análisis de este estudio no es factible realizar afirmaciones acerca del origen de la enfermedad infecciosa o movilidad de poblaciones, pues no se tuvo registro certero de cuándo y dónde se contrajo la enfermedad; por lo que los resultados siguientes sólo son de carácter informativo.

De acuerdo con la agrupación de sublinajes y entidad federativa de origen (Figura 19) se observó que Nuevo León albergó la mayor diversidad de sublinajes, teniendo siete sublinajes de los diez que presentaron algún patrón RAM; predominó el L.4.1.1.3 (n = 8; 32 %), seguido del L.4.1.1 (n = 6; 24 %) y L.2.2.1.2 (n = 2; 8 %), el resto de las muestras se dividieron en un solo caso de los sublinajes 4.1.2, 4.1.2.1, 4.4.1.1 y 4.8. Por otro lado, Tamaulipas presentó el caso restante del L. 4.1.1.3 y un caso del L.4.1.2.1; el caso restante de este mismo sublinaje lo presentó Chihuahua. Los casos reportados de personas originarias de San Luis Potosí y Cuba agruparon casos únicos de los sublinajes 4.3.4.1 y 2.2.1.1 respectivamente.

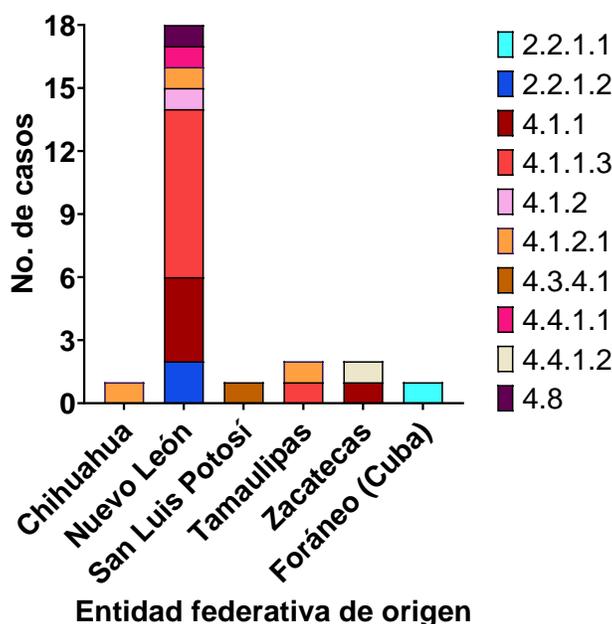


Figura 19. Agrupación de sublinajes del MTBC de cepas RAM y entidad federativa de origen
n = 25.

La agrupación de espoligotipos (SIT) y entidad federativa mostró la diversidad que existe en los casos de entidad federativa de origen de Nuevo León, con predominio de SIT119 (n = 8; 32 %), que coincide con los casos del L.4.1.1.3 en la misma entidad; así mismo, se presentó el total de los casos (n = 4; 16 %) de los espoligotipos huérfanos. Por su parte, Chihuahua y San Luis Potosí albergaron espoligotipos únicos, SIT47 y SIT1215 respectivamente.

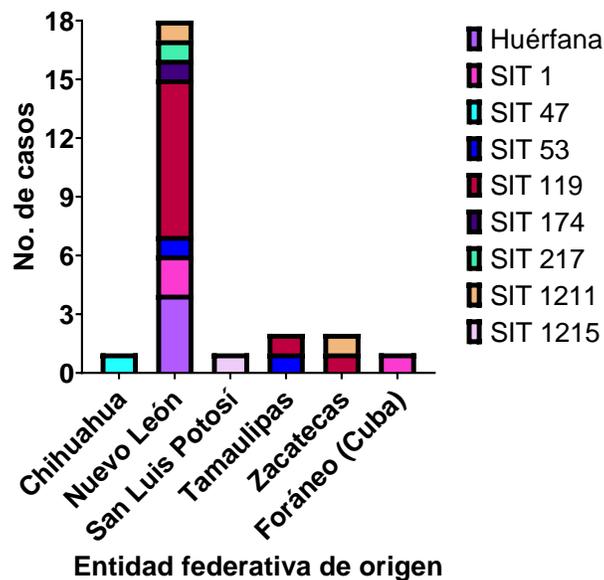


Figura 20. Agrupación de espoligotipos de cepas con RAM y entidad federativa de origen
n = 25.

V. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La TB sigue siendo un problema de salud pública de gran importancia en México, con una incidencia estimada de 25 casos por cada 100,000 habitantes en 2022 (INSP, 2023). La zona metropolitana de Monterrey, como área urbana densamente poblada, presenta un escenario preocupante, con alta prevalencia de la enfermedad.

En este contexto, el estudio presentado aquí, basado en WGS de 60 aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* entre 2021 y 2023, ofrece información crucial para comprender la epidemiología molecular y los patrones de resistencia antimicrobiana de la TB en la región.

Aspectos Demográficos y Clínicos:

El estudio describe una población predominantemente masculina (76.7%) con edades entre 3 y 84 años (media de 37 años), afectando principalmente en ambos sexos a personas de 25 a 55 años. Esto coincide con lo reportado por la CENAPRE en 2021, quienes mencionan que la TB afectó mayormente a hombres en relación 3:1 frente a mujeres, donde las edades más afectadas oscilan entre los 20 y 64 años; esto es de relevancia, pues se observa que la enfermedad infecciosa predomina en personas de edad reproductiva. Por otro lado, al comparar la relación de sexos afectados con estudios de otros países, se encontró esta tendencia a afectar principalmente a personas del sexo masculino como reportó Marçôa y colaboradores (2018) en un estudio realizado en Portugal, donde el 66.5 % de los pacientes con TB analizados eran de sexo masculino; sin embargo, la media de edad de los pacientes fue de 49 años, lo cual parece ser indicativo que en la población de estudio los casos son diagnosticados en pacientes de edades menores a los 40 años.

Sobre el tipo de TB, nuestros datos mostraron un predominio de TB-P (83.3 %), por lo que el porcentaje de casos de TB-EP es menor al 25 % de casos que de acuerdo con la revisión de Ramírez Lapausa (2015) es el % representativo de este tipo de TB. Propiamente en México, el IMSS (2022) reportó que a nivel nacional sólo el 20 % de TB-TF corresponde a la TB-EP; mientras que en Nuevo León en el 2020 se reportaron 1189 casos, de los cuales el 90.82 % TB-P y para el 2021, se reportaron 1181 casos, de los cuales el 84.7 % fue pulmonar (H. Congreso del Estado de Nuevo León, 2023), coincidiendo con nuestro reporte.

La mitad de los pacientes (n = 30) no presentaba comorbilidades, mientras que la diabetes fue la más frecuente entre aquellos con enfermedades concomitantes (n = 17; 28.3 %). Estos hallazgos coinciden con datos epidemiológicos nacionales e internacionales sobre la TB, donde la enfermedad afecta principalmente a adultos jóvenes y hombres. La Secretaría de Salud (2009) mencionó que en México el 20% de los casos de TB se relacionan con la diabetes; donde la tasa es de 20.9 por 100,000 personas al año, frente a 30.7 en pacientes sin diabetes (P<0.0001). Sumado a lo anterior, el Instituto Nacional de Salud Pública ha reportado un incremento en el número de casos y tasas de incidencia de TB-P en pacientes con diagnóstico de DM a lo largo de los años, donde el mayor incremento, así como el grupo etario más afectado es de los 40 a 59 años; esta información es consistente con nuestro reporte, donde los pacientes con diagnóstico de TB y DM se agrupan principalmente entre los 40 y 61 años. La presencia de comorbilidades es de suma importancia en el estudio clínico de la TB, pues su pronóstico se ha relacionado con el estado de salud en general del paciente, por lo que la DM puede complicar el pronóstico.

En Nuevo León, los municipios con mayor incidencia de TB suelen variar según los datos más recientes disponibles. Sin embargo, algunos municipios que históricamente han presentado altos índices de casos de tuberculosis incluyen Monterrey, Guadalupe, San Nicolás de los Garza, General Escobedo y Apodaca. Estos municipios son centros urbanos importantes en el estado y generalmente registran más casos debido a su densidad poblacional y otros factores socioeconómicos. Nuestros resultados mostraron que la mitad de nuestros sujetos de estudio (n = 30) indicaron como municipio de residencia a Monterrey, seguido de Apodaca (n = 9; 15.0 %), García (n = 5; 8.3 %) y General Escobedo (n = 4; 6.7 %). Si bien el número de casos manejados en este estudio es bajo (n = 60) para realizar aseveraciones en materia de salud pública y epidemiología clínica, se da una ventana para tomar mejores medidas en la vigilancia y control de esta enfermedad infecciosa en los municipios mencionados.

Linajes y Sublinajes de MTBC:

La distribución mundial de los linajes y familias del MTBC ha sido reportada previamente entre 7 a 9 linajes según diversos autores, aunque en consenso se puede afirmar que existen al menos 8 linajes bien establecidos. Los de mayor proporción y distribución

mundialmente son los linajes 4 y 2. Sin embargo, su distribución individual entre países de un mismo continente o región suele variar. Por ejemplo, en el caso del continente americano (o región de las Américas, de acuerdo con la OMS) el L.4 (Familia Euro-Americana) es el predominante, pero hacia la región de América del Norte se tiene una distribución considerablemente alta de L.2 (Familia Éste-Asiática) y L.1 (Familia Indo-Oceánica), tal como se reportó en un metaanálisis de la variación global de cepas del MTBC de Wiens y colaboradores (2018).

Considerando lo anterior, nuestros resultados sobre la distribución de linajes del MTBC en la zona metropolitana de Monterrey eran esperados, pues el 90 % (n = 54) correspondían al linaje 4, seguido de un 8.3 % (n = 5) correspondiente al linaje 2, y un caso restante (1.7 %) del linaje 1. Esto es congruente con lo reportado por Wiens y colaboradores (2018), quienes mencionaron que en los Estados Unidos de América se presentan además del linaje 4, casos de linaje 2 y 1. Cabe mencionar que en lo que respecta al linaje 1 este no es frecuente en noreste de México, pero sí lo es hacia la zona de Guerrero (Nava Aguilera y otros, 2011).

A nivel de sublinaje, es bien conocido que su distribución varía entre regiones. Nuestro estudio reportó un predominio del L.4.1.1.3 (n = 11; 18.3 %), seguido del L.4.1.1 (n = 8; 13.3%) y L.4.8 (n = 6; 10.0 %), lo cual difiere a lo reportado en Jalisco (2021) por Rendón Bautista y colaboradores, quienes por WGS de 32 muestras mencionaron que el sublinaje más frecuente fue el 4.8 con 18.75 %, seguido de los sublinajes 4.1.1.3, 4.3.4.1 y 4.3.4.2 con 12.5 % para cada uno; esto a su vez varía considerablemente con el trabajo de Lefort y colaboradores (2021), quienes a través de un estudio transversal en la jurisdicción sanitaria de la capital de Veracruz determinaron mediante espoligotipado y MIRU-VNTR que los sublinajes más frecuentes de un total de 74 muestras fueron: 4.1.2 (39 %), 4.7 (23 %) y 4.3.3 (16 %). Esto reitera que, a pesar del predominio del linaje 4 en diferentes estados de la República de los Estados Unidos Mexicanos, la distribución de sublinajes varía entre ellos, siendo que incluso algunos estados presentan sublinajes que no se reportan en otros. Por tanto, el conocimiento de la epidemiología molecular del MTBC en distintas regiones del país es de suma relevancia para comprender la dinámica de dispersión y probable transmisión o movilidad de poblaciones que padecen TB.

Espoligotipos:

Los estudios de espoligotipado han sido los más empleados en el estudio de MTB, lo que se traduce en una amplia información acerca de su presencia y distribución en distintas regiones. Además, si bien existe una tendencia de que un linaje del MTBC presente ciertos tipos de espoligotipo, no es así cuando se compara a nivel de sublinaje, por lo que la información que aporta la genotipificación por espoligotipado y códigos octales es sustancioso en los estudios de epidemiología molecular. A diferencia de los sublinajes del MTBC, la diversidad de espoligotipos es mayor.

En nuestro estudio el espoligotipado *in silico* demostró un considerable número de casos (n = 12; 20.0 %) con espoligotipo huérfano; de los casos que sí se les asignó un espoligotipo de acuerdo con el SITVIT2 se determinó que los espoligotipos más frecuentes fueron SIT119 (n = 13; 21.7 %), SIT53 (n = 8; 13.3%) y SIT1 (n = 5; 8.3 %). Esta información coincide parcialmente con lo reportado en el 2023 en Nuevo León por Flores Aréchiga y colaboradores, quienes a partir de 190 muestras de TB-P determinaron que los espoligotipos de mayor frecuencia fueron SIT119 (24.21 %), SIT53 (21.05 %) y SIT50 (6.84 %), este último espoligotipo no es reportado en nuestro estudio. Al realizar la comparación respecto al tiempo en este mismo estado, el estudio del 2010 de Molina Torres y colaboradores tuvieron hallazgos diferentes a lo reportado actualmente, pues en su trabajo basado en la técnica de espoligotipado de 180 muestras mostró que los tres espoligotipos más frecuentes en ese entonces fueron: SIT53 (23.89 %), SIT119 (15.56 %) y SIT1211 (5.0 %); esto indica que ha ocurrido un cambio en incidencia de los SIT119 y SIT53, donde ahora SIT119 es el más predominante. Además, se destaca el hecho que en nuestro estudio y el de Flores Aréchiga y colaboradores (2023) se tuvo registros de SIT1, clado Beijing, el cual no había sido reportado en 2010, lo que es indicativo de su introducción en la zona metropolitana de Monterrey en los últimos años.

Otro hallazgo de interés fue la detección del SIT19, clado EAI2-Manila, el cual no es común en el noreste de México, pero sí es el más predominante en Acapulco, Guerrero, de acuerdo a lo reportado por Nava Aguilera y colaboradores (2021); lo que podría ser indicativo de la transición de algunos casos hacia la zona metropolitana de Monterrey.

Resistencia Antimicrobiana:

Un hallazgo considerable del estudio es la alta prevalencia de resistencia antimicrobiana (41.7%). Se identificaron 3 casos multidrogorresistentes (MDR-TB) y 1 caso pre-extremadamente resistente (Pre-XDR-TB). Con el fin de hacer una comparación más certera frente a otros estudios realizados en México, los perfiles de susceptibilidad se ajustaron a ser: monodrogorresistentes (incluidos los casos de RR-TB y Other), polidrogorresistente (incluye HR-TB, Other), multidrogorresistente y pre-extremadamente resistente. Al comparar los datos obtenidos en este estudio frente a lo reportado por Lopez Avalos y colaboradores (2017) en Jalisco, se encontró que en nuestra población de estudio predominan los perfiles sensibles frente a los antimicrobianos con un 58.33 %, frente a solo 25.4 % de lo reportado en Jalisco. Sobre los perfiles RAM, el porcentaje de multi- y polidrogorresistente fue similar en ambos estudios, pero en Jalisco se reportó un considerable mayor número de casos de perfiles mono y pre-extremadamente resistentes. La razón de lo anterior puede deberse al control por parte de los servicios de salud en el manejo de la TB, como la red TAES de Enfermería en Tuberculosis, sin embargo, el tamaño de muestras evaluadas aún es bajo para afirmar algo en relación a ello, a esto debe sumarse que nuestro perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó a partir de los datos obtenidos en la secuenciación.

Como se mostró en la “Tabla 09. Mutaciones detectadas en los perfiles genómicos de MTB-RAM” algunas de las mutaciones asociadas a la resistencia incluyeron: *rpoB* (Ser450Leu), *ahpC* (Asp73His), *katG* (Ser315Thr), *emb* (Met306Ile) y *pncA* (Gly78Asp), mismas que han sido reportadas por Rendón Bautista y colaboradores (2021) y Jiménez-Ruano y colaboradores (2021), cuyos trabajos igualmente realizaron WGS en muestras de TB de Jalisco y México en general, respectivamente. Adicionalmente, en nuestro estudio se detectaron mutaciones no reportadas en los estudios mencionados, como son: *rpoB* (Phe424Ser), *inhA* (154G>T, Ile21Val) y la presencia de mutaciones en *ethA* y *folC*, indicativo de la conservación de mutaciones en el tiempo en nuestras cepas de estudio.

Además, como se discutirá más adelante, la asociación del sublinaje 4.1.1.3 con la resistencia antimicrobiana, observada en este estudio, es consistente con reportes previos y resalta la necesidad de vigilancia y control estrictos de este sublinaje

Relaciones entre Variables:

El análisis estadístico reveló correlaciones significativas entre la edad de los pacientes y la presencia de comorbilidades, así como entre los perfiles de resistencia antimicrobiana, el tipo de familia del MTBC y los sublinajes. Estos hallazgos sugieren que la edad y la presencia de comorbilidades podrían ser factores de riesgo para la adquisición de cepas resistentes, mientras que el tipo de familia del MTBC y los sublinajes podrían estar asociados con diferentes perfiles de resistencia.

Propiamente, el sublinaje 4.1.1.3, familia de tipo X, es el que se correlaciona mayormente con la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia a los antimicrobianos. Esto coincide con el trabajo de Jiménez Ruano y colaboradores (2021), quienes encontraron que el linaje 4 es el que se asocia principalmente a la RAM, concretamente los sublinajes 4.1.2.1 (Subfamilias T1 o H1) y 4.1.1.3 (subfamilias X1 o X3). Por tanto, se sugiere prestar atención en los casos de este tipo de sublinaje.

Análisis filogenético:

En relación con lo anterior, esto quedó plasmado de forma gráfica en la construcción de los árboles filogenéticos de cepas con perfil RAM (Ilustraciones 11 y 14), donde el L.4.1.1.3 fue el más predominante en tener algún perfil RAM de tipo HR-TB, MDR-TB y Pre-XDR-TB, al igual que reportaron Jiménez Ruano y colaboradores (2021), cuyas secuencias se emplearon para comparar y construir los árboles filogenéticos. Es importante conocer que el L.4.1.1.3 ha sido relacionado en diversos estudios a presentar algún perfil RAM, como ejemplo, Bermúdez Hernández y colaboradores (2024) determinaron que este sublinaje se asocia en pacientes con DM, y que además presentaban un perfil RR-TB y HR-TB.

Los resultados sobre la agrupación de ramas y raíces no mostraron relación clonal entre cepas, aunque sí se observó una agrupación principal entre las cepas de Jiménez Ruano y colaboradores, no incluyéndose las cepas de nuestro estudio, por lo que se asume que nuestras cepas son diferentes a otras circulantes en México. Esto queda confirmado al evaluar las mutaciones detectadas en cada secuencia.

Lo anterior se reiteró en el árbol filogenético que incluyó la información sobre su espoligotipo (Figura 14), donde nuevamente la agrupación entre las cepas de Jiménez Ruano y colaboradores no estaba relacionada a las cepas de nuestro estudio. Además, se observó una diversidad de códigos octales en nuestras muestras de estudio, representando que en la zona metropolitana de Monterrey se pueden encontrar varios espoligotipos, predominando SIT119, que a su vez se asocia al L.4.1.1.3, en relación con perfiles de MTB-RAM.

Relación demográfica:

Centrándose en las 25 secuencias que mostraron mutaciones asociadas a la RAM se reportó que 18 pacientes indicaron como entidad federativa de origen a Nuevo León, que a su vez incluye al total de los casos RR-TB, MDR-TB y Pre-XDR-TB; de estos, en la agrupación por municipio de residencia se encontró que el caso Pre-XDR-TB correspondía a un residente de Apodaca, municipio que también se reportó en casos con HR-TB y “Other”; esto muestra la importancia a prestar la atención adecuada en vigilancia epidemiológica y salud pública en este municipio para el control y seguimiento de la TB. Otro municipio de residencia de interés por los tipos de perfiles RAM que se reportaron fueron Monterrey y Juárez, los cuales incluyeron los casos MDR-TB.

A nivel del sublinaje del MTBC y espoligotipos, dentro de los casos que reportaron como entidad federativa de origen a Nuevo León se observó diversidad de ambos, con un predominio hacia los sublinajes 4.1.1.3 y 4.1.1, así como los espoligotipos SIT119 y huérfanos, indicando altas frecuencias en la región; esto se debe tomar en cuenta en el sentido que se asocian a la RAM, por lo que la vigilancia en transmisión es algo imprescindible para evitar la diseminación de MTB resistente.

Todos estos datos contrastan con lo reportado en México en general, como destaca Mejía Ponce y colaboradores (2023), quienes a través de un análisis de epidemiología genómica de la distribución de MTB-RAM en México mostraron que los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos varían entre los diferentes estados de la República de los Estados Unidos Mexicanos, que para Nuevo León es consistente con nuestro reporte al presentar altas tasas de sensibilidad, y para el caso de perfiles RAM se presentan moderadas tasas en HR-TB y “Other”; además las tasas de MDR-TB son más bajas en comparación a otros estados del centro de México. Por otro lado, Mejía Ponce y colaboradores indican que

la distribución de los sublinajes del MTBC en México varían según la región; en nuestro estudio se tuvo un predominio de los sublinajes 4.1.1.3 y 4.1.1, coincidiendo parcialmente con su trabajo.

Implicaciones para la Salud Pública:

Como se ha demostrado con los resultados de este estudio, existen importantes implicaciones para la salud pública en la zona metropolitana de Monterrey y en México en general:

Vigilancia epidemiológica:

La WGS permite una vigilancia más precisa de la circulación de linajes, sublinajes y espoligotipos de MTBC, lo que facilita la identificación de posibles brotes y la toma de medidas de control oportunas. Además, el conocimiento que aportamos es sustancial en virtud de conocer el estado actual de los sublinajes del MTBC y su relación con los perfiles genómicos de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Tratamiento específico:

La información genómica sobre la resistencia antimicrobiana abre la ventana a explorar un tratamiento individualizado de los pacientes con TB, optimizando la eficacia terapéutica y reduciendo el riesgo de selección de cepas resistentes. Además, apunta al control y vigilancia de los casos con perfiles de resistencia, para evitar su transmisión, y de ser posible la identificación del foco de infección.

Desarrollo de estrategias de control:

Los datos sobre la epidemiología molecular y la resistencia antimicrobiana pueden contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de control de la TB, incluyendo intervenciones específicas para poblaciones con mayor riesgo de adquirir o desarrollar resistencia. Así mismo, se invita a los profesionales en salud a realizar la promoción de la salud, particularmente en pacientes que padezcan DM, debido a las complicaciones y relación que tiene con la TB.

Limitaciones y Recomendaciones:

El estudio presentado tiene algunas limitaciones, como el tamaño de la muestra (60 aislamientos) y la naturaleza observacional del diseño. Se recomienda ampliar el estudio para incluir más pacientes y regiones, así como realizar estudios longitudinales para evaluar la evolución de la resistencia antimicrobiana.

VI. CONCLUSIONES

Se analizaron 60 muestras de TB-TF de aislamientos clínicos de pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” durante el período 2021 – 2023. La realización del estudio en esta locación es significativo, pues al localizarse en la ciudad de Monterrey se tiene acceso a pacientes de la zona metropolitana de Monterrey, siendo esto un representativo general de la región. En la población estudiada, se observó mayor frecuencia de TB en personas del sexo masculino (relación 3:1 frente a personas del sexo femenino), concentrándose mayormente en personas de 25 a 55 años; dato que debe considerarse, pues la población afectada entra en la categoría de “edad reproductiva”. Además, la presencia de comorbilidades, como la Diabetes Mellitus, en este rango de edad es otro factor a considerar, dado que es bien conocido que esto puede agravar el estado de salud de los pacientes, afectando así la calidad de vida.

De las 60 secuencias de genoma completo de MTB analizadas, el Linaje 4 (Familia Euro-Americana) circula con mayor frecuencia (n=54/60; 90%) entre los aislados de pacientes que acuden a consulta al Hospital Universitario. De estos, los sublinajes 4.1.1.3 y 4.1.1 son los más predominantes, con 18.3% y 13.3% respectivamente.

Se detectaron 25 secuencias (41.7%) que presentaron perfil de resistencia a uno o más antimicrobianos; de las cuales se encontraron 3 MDR y 1 Pre-XDR-TB; al realizar su agrupación frente a los municipios de residencia se encontró que Apodaca y Monterrey albergaban estos perfiles, por lo que se debe dar seguimiento minucioso a tales casos.

Los análisis de correlación revelaron que el sublinaje 4.1.1.3 (Tipo X) y el espoligotipo SIT119 tiene mayor correlación a presentar mutaciones asociadas a la resistencia a los antimicrobianos. Y dado el hecho que es el más frecuente entre los sublinajes del MTBC circulando en la zona metropolitana de Monterrey, se debe de realizar un seguimiento y vigilancia en este sublinaje, así como en las cepas con espoligotipo SIT119, en el cual se observó un incremento respecto a estudios realizados 14 años atrás.

Los análisis filogenéticos no mostraron relaciones clonales entre las cepas de nuestro estudio, ni con otras representativas de estudios realizados en México, lo cual podría atribuirse a una diversidad en la región, y que aún está en posibilidad de ser controlado; sin

embargo, se reitera que el número de muestras analizadas es una limitante, por lo que realizar aseveraciones requerirá de la amplitud del número de muestras.

Finalmente, de acuerdo con la hipótesis planteada, se acepta que: en el período del 2021 – 2023, el L.4.1.1.3 circula con mayor frecuencia entre aislados clínicos de la zona metropolitana de Monterrey, y el porcentaje de cepas MDR fue del 5%.

Perspectivas

Una de las principales perspectivas de este estudio consiste en aumentar el número de secuencias de genoma completo de *M. tuberculosis* a fin de tener un análisis más exhaustivo y representativo de la población de estudio, y servir como referencia para otros trabajos de este tipo. Para ello, los datos del proyecto en sí se subirán al banco de datos del NCBI, que serán de suma utilidad en estudios de epidemiología molecular en México, Latinoamérica, o cualquier otro estudio que así lo requiera.

En materia de análisis genómico, se considera realizar una evaluación en las Regiones de Diferenciación para determinar si las regiones deletadas son consistentes entre cepas relacionadas.

Así mismo, se buscará integrar estudios de imagen y ampliar la información clínica para lograr un trabajo más profundo que ofrezca una visión clínica y genómica, aplicable a distintos enfoques de investigación. Sumado a ello, un estudio longitudinal sería sustancioso y enriquecedor en el conocimiento actual de la epidemiología molecular del MTBC en la zona metropolitana de Monterrey.

REFERENCIAS

- Bermúdez Hernández, G. A., Pérez Martínez, D., Ortiz León, M. C., Muñiz Salazar, R., Licona Cassani, C., & Zenteno-Cuevas, R. (2024). Mutational dynamics related to antibiotic resistance in *M. tuberculosis* Isolates from serial samples of patients with tuberculosis and Type 2 Diabetes Mellitus. *Microorganisms*, 2(324), 12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020324>
- Boehme, C. C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M. P., Shenai, S., Krapp, F., Allen, J., Tahirli, R., Blakemore, R., Rustomjee, R., Milovic, A., Jones, M., O'Brien, S. M., Persing, D. H., Ruesch Gerdes, S., Gotuzzo, E., Rodrigues, C., Alland, D., & Perkins. (2010). Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*, 363(11), 1005-1015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>
- Casali, N., Nikolayevskyy, V., Balabanova, Y., Ignatyeva, O., Kontsevaya, I., Harris, S. R., Bentley, S. D., Parkhill, J., Nejentsev, S., Hoffner, S. E., Horstmann, R. D., Brown, T., & Drobniowski, F. (2012). Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res*, 22(4), 735-745. <https://doi.org/10.1101/gr.128678.111>
- CENAPRE. (2021). *Continuemos este 2022, trabajando unidos para poner fin a la tuberculosis*. Secretaría de Salud. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/722796/1.-SITUACION_EPIDEMIOLOGICA_2021_preliminar.pdf
- Fennelly, K. P., Martinez, L., & Mandalakas, A. M. (2022). Tuberculosis: first in flight. *Am J Respir Crit Care Med*, 205(3), 272-274. <https://doi.org/10.1164/rccm.202111-2513ED>
- Flores Aréchiga, A., Zacarías Hernández, J. L., Vázquez Cortés, C. G., Tamez Guerra, R. S., De la O Cavazos, M., Rivera Morales, L. G., Llaca Díaz, J. M., Castro Garza, J., & Rodríguez Padilla, C. (2023). Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a tertiary care hospital in northeastern Mexico. *J Infect Dev Ctries*, 17(12), 1753-1760. <https://doi.org/10.3855/jidc.18026>
- Fontalvo Rivera, D., & Gómez Camargo, D. (2015). Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Med. UIS*, 28(1), 39-51.
- Gardy, J. L., Johnston, J. C., Ho Sui, S. J., Cook, V. J., Shah, L., Brodtkin, E., Rempel, S., Moore, R., Zhao, Y., Holt, R., Varhol, R., Birol, I., Lem, M., Sharma, M. K., Elwood, K., Jones, S. J., Brinkman, F. S., Brunham, R. C., & Tang, P. (2011). Whole-genome

sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med*, 364(8), 730-739. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003176>

H. Congreso del Estado de Nuevo León. (22 de Marzo de 2023). *Plantean mayor presupuesto para combatir la tuberculosis*. Sala de Prensa: https://www.hcnl.gob.mx/sala_de_prensa/2023/03/plantean_mayor_presupuesto_para_combatir_la_tuberculosis.php

Hernández Solís, A., Quintana Martínez, A., Quintanar Ramírez, M. I., Álvarez Maldonado, P., & Reding Bernal, A. (2023). Tuberculosis extrapulmonar: un problema de salud pública. *Cir Cir*, 91(1), 131-138. <https://doi.org/10.24875/CIRU.21000688>

IMSS. (2022). *Tuberculosis pulmonar*. Salud en línea [Acercando el IMSS al Ciudadano]: <https://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/tuberculosis-pulmonar>

InDRE. (24 de Septiembre de 2015). Procedimientos básicos en la toma de muestras biológicas para diagnóstico. México: Secretaria de Salud. <https://www.gob.mx/salud/documentos/procedimientos-basicos-en-la-toma-de-muestras-biologicas-para-diagnostico>

INSP. (23 de Marzo de 2023). *Sí, podemos poner fin a la tuberculosis*. Instituto Nacional de Salud Pública: <https://www.insp.mx/avisos/si-podemos-poner-fin-a-la-tuberculosis>

Jiménez Ruano, A. C., Madrazo Moya, C. F., Cancino Muñoz, I., Mejía Ponce, P. M., Licona Cassani, C., Comas, I., Muñiz Salazar, R., & Zenteno Cuevas, R. (2021). Whole genomic sequencing based genotyping reveals a specific X3 sublineage restricted to Mexico and related with multidrug resistance. *Sci Rep*, 11(1), 1870. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80919-5>

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., & van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35(4), 907-914. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>

Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C. Y., & Kook, Y. H. (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol*, 37(6), 1714-1720. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1714-1720.1999>

Koegelenberg, C. F., Schoch, O. D., & Lange, C. (2021). Tuberculosis: the past, the present and the future. *Respiration*, 100(7), 553-556. <https://doi.org/10.1159/000516509>

- Lee, H., Park, H. J., Cho, S. N., Bai, G. H., & Kim, S. J. (2000). Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene. *J Clin Microbiol*, 38(8), 2966-2971. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.8.2966-2971.2000>
- Lefort, B., Pérez Martínez, D., Viveros, D., & Zenteno-Cuevas, R. (2021). Diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* circulando en la jurisdicción V de Jalapa, Veracruz, México. *Rev. chil. infectol*, 38(5), 639-646. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182021000500639>
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res*, 52(W1), W78-W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Lopez Avalos, G., Gonzalez Palomar, G., Lopez Rodriguez, M., Vazquez Chacon, C. A., Mora Aguilera, G., Gonzalez Barrios, J. A., Villanueva Arias, J. C., Sandoval Diaz, M., Miranda Hernández, U., & Alvarez Maya, I. (2017). Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and transmission associated with first-line drug resistance: a first analysis in Jalisco, Mexico. *J Glob Antimicrob Resist*, 11(1), 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.07.004>
- Lozano, J. A. (2002). Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Offarm*, 21(8), 102-110.
- Luna López, F. L., García Avilés, M. A., Martínez Olivares, M. d., Saavedra Herrera, N., Medel Romero, B., Magaña Ocaña, J. C., Muñoz Estrada, A., & Guadarrama Pérez, P. (2021). *Programa nacional de prevención y control de las micobacteriosis (tuberculosis y lepra) 2020-2024*. Secretaría de Salud. México: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/706939/PAE_MIC_cF.pdf
- Marçôa, R., Ribeiro, A. I., Zão, I., & Duarte, R. (2018). Tuberculosis and gender - Factors influencing the risk of tuberculosis among men and women by age group. *Pulmonology*, 24(3), 199-202. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2018.03.004>
- Mejía Ponce, P. M., Ramos González, E. J., Ramos García, A. A., Lara Ramírez, E. E., Soriano Herrera, A. R., Medellín Luna, M. F., Valdez Salazar, F., Castro Garay, C. Y., Núñez Contreras, J., De Donato Capote, M., Sharma, A., & Licona Cassani, C. (2023). Genomic epidemiology analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* distributed in Mexico. *PLoS One*, 18(10), e0292965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292965>
- Miotto, P., Cirillo, D. M., & Migliori, G. B. (2015). Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms challenging fluoroquinolones and pyrazinamide effectiveness. *Chest*, 147(4), 1135-1143. <https://doi.org/10.1378/chest.14-1286>

- Molina Torres, C. A., Moreno Torres, E., Ocampo Candiani, J., Rendon, A., Blackwood, K., Kremer, K., Ratogi, N., Welsh, O., & Vera Cabrera, L. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microbiol*, 48(2), 448-455. <https://doi.org/10.1128/JCM.01894-09>
- Munro Rojas, D., Fernandez Morales, E., Zarrabal Meza, J., Martínez Cazares, M. T., Parissi Crivelli, A., Fuentes Domínguez, J., Séraphin, M. N., Lauzardo, M., & Zenteno Cuevas, R. (2018). Genetic diversity of drug and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Veracruz, Mexico. *PLoS One*, 13(3), e0193626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193626>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2014). *Microbiología médica* (7a ed.). Elsevier España, S.L.
- Nava Aguilera, E., Lopez Vidal, Y., Harris, E., Morales Pérez, A., Mitchell, S., Flores Moreno, M., Villegas Arrizón, A., Legorreta Soberains, J., Ledogar, R., & Andersson, N. (2011). Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors. *Clin Dev Immunol*, 2011(1), 408375. <https://doi.org/10.1155/2011/408375>
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Lefkowitz, E. J., Lu, J., & Stevens, R. L. (2023). Introducing the bacterial and viral bioinformatics resource center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res*, 51(D1), D678-D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
- OMS. (07 de Noviembre de 2023). *10 datos sobre la tuberculosis*. Organización Mundial de la Salud [Datos en Imágenes/Detalle]: <https://www.who.int/es/news-room/facts-in-pictures/detail/tuberculosis>
- OMS. (07 de Noviembre de 2023). *La respuesta a la tuberculosis se recupera de la pandemia pero es necesario acelerar las actividades para cumplir las nuevas metas*. Organización Mundial de la Salud [Comunicado de Prensa]: <https://www.who.int/es/news/item/07-11-2023-tuberculosis-response-recovering-from-pandemic-but--accelerated-efforts-needed-to-meet-new-targets>
- OMS. (07 de Noviembre de 2023). *Tuberculosis*. Organización Mundial de la Salud [Notas descriptivas]: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- OPS. (04 de Marzo de 2021). *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS*. Noticias [Organización Panamericana de la Salud]: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>

- OPS. (2023). *Día mundial de la tuberculosis 2023*. Organización Panamericana de la Salud [Campañas]: <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-tuberculosis-2023>
- OPS. (Diciembre de 2023). *Tuberculosis*. Organización Panamericana de la Salud: <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis>
- Phelan, J. E., O'sullivan, D. M., Machado, D., Ramos, J., Oppong, Y. E., Campino, S., O'Grady, J., Mc Nerney, R., Hibberd, M. L., Viveiros, M., Huggett, J. F., & Clark, T. G. (2019). Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs. *Genome Med*, *11*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0650-x>
- Rahlwes, K. C., Dias, B. R., Campos, P. C., Alvarez Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (2023). Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, *14*(1), 2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
- Ramírez Lapausa, M., Menéndez Saldaña, A., & Noguero Asensio, A. (2015). Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. *Rev. esp. sanid. penit.*, *17*(1), 3-11. <https://doi.org/10.4321/S1575-06202015000100002>
- Rendón Bautista, L. A., Álvarez Maya, I., Sandoval Díaz, M., Villanueva Arias, J. C., Ayala Chavira, N., & Zenteno Cuevas, R. (2021). Characterization of genetic diversity and clonal complexes by whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Jalisco, Mexico. *Tuberculosis*, *129*(1), 102106. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102106>
- SEMARNAT. (2002). NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo.
- Smith, G. S., Van Den Eeden, S. K., Baxter, R., Shan, J., Van Rie, A., Herring, A. H., Richardson, D. B., Emch, M., & Gammon, M. D. (2015). Cigarette smoking and pulmonary tuberculosis in northern California. *J Epidemiol Community Health*, *69*(6), 568-573. <https://doi.org/10.1136/jech-2014-204292>
- SS. (2012). NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.
- SS. (2013). NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis.
- SS. (22 de Marzo de 2023). 079. *En 2022 se registran más de 28 mil casos de tuberculosis en México*. Secretaría de Salud [Prensa]: <https://www.gob.mx/salud/prensa/079-en-2022-se-registran-mas-de-28-mil-casos-de-tuberculosis-en-mexico>
- Steingart, K. R., Sohn, H., Schiller, I., Kloda, L. A., Boehme, C. C., Pai, M., & Dendukuri, N. (2014). Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin

- resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 1(1), CD009593. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009593.pub3>
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso Oelemann, M., S., R. G., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M. C., & van Soolingen, D. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 42(12), 4498–4510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., & Locht, C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*, 36(3), 762-771. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>
- van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., & Shinnick, T. M. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 31(2), 406-409. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.406-409.1993>
- van Soolingen, D., de Haas, P. E., Hermans, P. W., Groenen, P. M., & van Embden, J. D. (1993). Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 31(8), 1987–1995. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.8.1987-1995.1993>
- Viveros Luna, D., Lefort, B., Rendón Bautizta, L., & Zenteno Cuevas, R. (2021). Genotipificación y epidemiología molecular de tuberculosis; su utilidad para la salud. *Rev Med UV*, 20(2), 27-34. <https://doi.org/10.25009/rmuv.2020.2.13>
- Walker, T. M., Ip, C. L., Harrell, R. H., Evans, J. T., Kapatai, G., Dedicoat, M. J., Eyre, D. W., Wilson, D. J., Hawkey, P. M., Crook, D. W., Parkhill, J., Harris, D., Walker, A. S., Bowden, R., Monk, P., Smith, E. G., & Peto, T. E. (2013). Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis*, 13(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70277-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70277-3)
- Wiens, K. E., Woyczynski, L. P., Ledesma, J. R., Ross, J. M., Zenteno-Cuevas, R., Goodridge, A., Ullah, I., Mathema, B., Djoba Siawaya, J. F., Biehl, M. H., Ray, S. E., Bhattacharjee, N. V., Henry, N. J., Reiner Jr, R. C., & Hay, S. I. (2018). Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine*, 16(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1180-x>

Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R., & von Reyn, C. (2013). Tuberculosis. *N Engl J Med*, 368(8), 745-755. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1200894>

