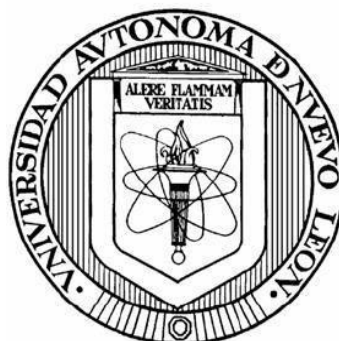


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis Y SU GEORREFERENCIACIÓN OBTENIDOS DE
MUNICIPIOS PERTENECIENTES A LA ZONA URBANA DEL
ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO**

POR

M.C. JOSÉ LUIS ZACARÍAS HERNÁNDEZ

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

Ciudad Universitaria; San Nicolás de los Garza N.L.

2024

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis Y SU GEORREFERENCIACIÓN OBTENIDOS DE
MUNICIPIOS PERTENECIENTES A LA ZONA URBANA DEL
ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO**

Comité de Tesis

Reyes S. Tamez G.

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Presidente

Lydia Guadalupe Rivera Morales

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Secretaria

María Cristina Rodríguez Padilla

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Vocal

Jorge Enrique Castro Garza

Dr. Jorge Enrique Castro Garza
Vocal

José Manuel Vázquez Guillén

Dr. José Manuel Vázquez Guillén
Vocal

Katiushka Arevalo Niño

Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Dirección de Tesis

Reyes S. Tamez G.

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Director

DERECHOS RESERVADOS 2024©

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.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de la Secretaría de Salud de Nuevo León y el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario de la UANL bajo la dirección del Dr. Reyes S. Tamez Guerra.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Secretaría de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la UANL.

- PAICYT clave No. SA 837-19, responsable Dr. Reyes S. Tamez Guerra.
- PAICYT clave No. SA 1217-20, responsable Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto.



AGRADECIMIENTOS

Para la realización de esta investigación, quiero empezar por agradecer la parte académica, siendo la Dra. Cristina Rodríguez Padilla un pilar fundamental con su liderazgo y soporte académico, y que me ha dado la oportunidad de estar en su laboratorio y que ha estado presente en todo el proceso académico en mi formación de posgrado y todos estos años; muchas gracias siempre agradecido. De igual forma quiero agradecer al Dr. Reyes S. Támez Guerra, que siempre se encontró en la mejor disposición de apoyarme en todo, desde lo académico hasta lo personal, para los congresos y actividades extracurriculares siempre con su semblante de calma y presencia, liderazgo y consejos, así como las pláticas y sus enseñanzas las aprecio bastante. A la Dra. Marivel Gómez Treviño, por siempre estar al tanto de los eventos académicos, culturales y su cálida forma de apoyar, le agradezco mucho las atenciones brindadas. Este proyecto hizo que conectáramos con distintos investigadores, así como conocer distintos centros de trabajo, por lo que quiero iniciar con el personal y amigos del laboratorio estatal de Salud Pública de Nuevo León, al Q. Efrén, al Q. Víctor Velázquez, al Q. Alejandro Morales, y en especial a mi amiga y colega Karen Garza por siempre darme la mejor atención para lo que se necesitaba en el cultivo y recolección de las muestras, muchas gracias. Así mismo, al Dr. Manuel de la O, por darnos la oportunidad de trabajar en el laboratorio estatal. Tuvimos que entrenarnos en el área de bioseguridad por lo tanto al personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, agradezco su atención brindada, así como sus enseñanzas, a la Dra. Dulce y en especial al Dr. Rogelio Hernández Pando quién me recibió de la mejor manera y me apoyo en mi estancia académica. Regresando a Nuevo León, la médula espinal de este trabajo fue el Laboratorio de Patología del Hospital Universitario, donde agradezco el apoyo del Dr. Néstor Casillas y de la Q.C.B. Gabriela Cortés quienes el tiempo que estuvimos trabajando en conjunto me brindaron un gran apoyo, así como aprendizajes y resultados para este proyecto. En especial quiero agradecer al Dr. Amador Flores Aréchiga, quien también fue mi compañero durante los años del doctorado y un gran amigo, líder, profesor e investigador que, con su experiencia, conocimientos y un enorme apoyo brindado pudo salir todo esto. Sin él, esto no podría haber sido de esta manera, siempre agradecido con usted Dr., además quiero reconocer y agradecer al Dr. Jorge Castro Garza por su valioso apoyo y disponibilidad que me brindo, así como sus consejos y amistad, muchas gracias Dr. Jorge. Pensando en mi querida facultad quiero agradecer a todos mis profesores y amigos, no quiero omitir a nadie, pero quiero que sepan que siempre su presencia en los pasillos, laboratorio o momentos extraacadémicos están presentes, muchas gracias. Por último, no por menos importante, pero sí mención especial a la Dra. Lydia G. Rivera Morales, que simplemente no hay palabras para expresar todo mi aprecio, cariño y agradecimiento todos estos años...

DEDICATORIA

A mis padres, mis hermanas y mis abuelitos...

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Historia de la Tuberculosis	4
2.2 Descripción de la enfermedad y etiología	5
2.3 Tuberculosis pulmonar.....	8
2.4 Diagnóstico de la tuberculosis.....	8
2.5 <i>México y la Tuberculosis</i>	12
2.6 Cepas farmacorresistentes.....	12
2.7 Sistemas de información geográfica (GIS).....	17
3. JUSTIFICACIÓN... ..	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVO GENERAL.....	21
5.1 Objetivos específicos	21
6. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1. Población de estudio.....	22
6.2. Procesamiento de muestras clínicas	22
6.3 Obtención del DNA.....	23
6.4 Genotipificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante spoligotyping.....	24
6.5 Perfil de farmacorresistencia	25

6.6	Correlación de genotipos de <i>M. tuberculosis</i> y su farmacorresistencia.....	25
6.7	Correlación de pacientes con factores de riesgo.....	25
6.8	Análisis de la georreferenciación.....	25
7.	RESULTADOS.....	27
7.1	Distribución de casos por geolocalización.....	40
7.2	Presencia de sitios de riesgo o <i>hot spots</i>	44
8.	DISCUSIÓN	45
9.	CONCLUSIONES	54
10.	PERSPECTIVAS	55
6.	LITERATURA CONSULTADA	56

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1A	Pirámide poblacional.	28
1B	Distribución por edad y género.	29
2	Identificación de espoligotipos con su número SIT y sub-linaje.	32
3	Distribución de las familias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (n=151) por espoligotipos.	36
4	Susceptibilidad a los antifímicos de primera línea.	37
5	Información epidemiológica y factores de riesgo	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Incidencia estimada de tuberculosis en 2020	6
2	A) Componentes de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> . B) Genoma de la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	7
3	Análisis de los patrones de spoligotyping	11
4	Porcentaje de nuevos casos de tuberculosis multifarmacorresistentes por países.	13
5	Cronología de medicamentos utilizados en la terapia contra la tuberculosis	14
6	Mecanismo de acción de la rifampicina.	15
7	Mecanismo de acción de los fármacos de primera línea contra tuberculosis	17
8	Casos acumulativos del año 2019- primer trimestre del 2020.	27
9	Muestras de pacientes con tuberculosis genotificadas	28
10	Diagrama de Flujo	30
11	Patrones de espoligotipos de las cepas aisladas agrupadas	31
12	Diversidad genética de los 151 aislados clínicos obtenidos.	37
13	Factores de riesgo de los pacientes con tuberculosis pulmonar.	40
14	Distribución de casos de tuberculosis en el área urbana de Nuevo León.	41
15	Incidencias de casos en los municipios del área urbana de Nuevo León.	42
16	Espoligotipos identificados en el área Metropolitana de Monterrey.	43
17	Espoligotipos identificados en el área urbana del estado de Nuevo León	43
18	Incidencia del espoligotipo T1 identificados en el área urbana del estado de Nuevo León	44

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Clúster de diferenciación
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CFU	Unidades formadoras de colonias
CLR	Receptores de lectina tipo C
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMT	Transición epitelial a mesenquimal
FAK	Proteína tirosina quinasa PTK2
Fc	Fracción cristalizante
G	Guanina
GBC	Antígeno específico del grupo B
GIS	Sistema de información geoespacial
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 β
HMGB1	Caja de grupo 1 de alta movilidad
IFN-γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Células linfoides
IP	Intraperitoneal
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por LOOP
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MFR	Multifarmacorresistencia
MLST	Tipificación de secuencias multilocus
MLVA	Análisis de repeticiones en tándem de número variable de multilocus
MTb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAM	N-acetil murámico
NK	Natural-Killer
NLR	Receptores tipo NOD
NT	No tipificable
OD	Densidad óptica
OMS	Organización mundial de la salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TB	Tuberculosis
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
THB	Caldo Todd-Hewitt
TLR	Receptores tipo Toll
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbencidina
TNF-α	Factor de necrosis tumroal- α
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

La tuberculosis (TB), causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, es un gran problema de salud pública mundial, debido a que causa la muerte de millones de personas cada año. Después de la emergencia sanitaria por el SARS-CoV-2, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la renombra como la principal causa de muerte por un agente infeccioso bacteriano único. Además, el problema se agrava debido a la aparición de bacterias multifarmacorresistentes (MFR). La importancia clínica epidemiológica es alta debido a la reemergencia de esta enfermedad que lleva a presentar una alta diversidad genética que puede conducir a que se presenten una mayor resistencia a los antifímicos de primera línea y a la falta de protocolos efectivos para su vigilancia y control. El objetivo es identificar la variabilidad genética de las cepas aisladas de una población para obtener información sobre la epidemiología molecular y su correlación con MFR y comorbilidades (diabetes y VIH/SIDA). Mediante el empleo de métodos moleculares como la técnica de espoligotipos podemos identificar las diferentes familias de *M. tuberculosis* circulando en el estado de Nuevo León y poder observar su epidemiología molecular. Así mismo, el empleo de sistemas de información geoespacial (SIG), nos permite ubicar en lugar y tiempo determinado los casos de tuberculosis para observar cómo puede ser la transmisión, así como la formación de sitios de riesgo. Un total de 151 aislados fueron recolectados, encontrando diecinueve sub-linajes; siendo los más frecuentes T1 con 53 aislados, (35%) y X1 con 29 (19.2%) aislados respectivamente, seguido por el tipo LAM 1,2,4,5,9 con 15 (10.2%), H 1,3 con 5 (3.3%), MANILLA con 3 (2%), U con 4 (2.6%), X2 con 5 (3.3%), X3 con 4 (2.6%), S y T con 3 (2%) aislamientos. Además del sub-linaje BEIJING se encontraron 5 (3.3%) aislamientos y 15 (9.9%) cepas no se pudieron clasificar. En la resistencia, 46 aislamientos mostraron resistencia a los fármacos de primera línea (30.5%); y la multifarmaco resistencia fue detectada en 20 (13.2%) aislamientos. La *Diabetes mellitus* II fue la principal comorbilidad con un 21.85% (n= 33) y de un 2.66% (n=4) se reportaron como VIH positivos, aunque no se encontró una correlación con la comorbilidad y tipo de cepa. El municipio con el mayor número de aislamientos fue Monterrey, seguido por Apodaca y Juárez. Estos resultados pueden contribuir en el entendimiento de la prevalencia y la alta variabilidad genética de las cepas en el área metropolitana de Monterrey; así también, esta información se puede utilizar para mejorar los protocolos en la vigilancia contra la tuberculosis y la prevención de nuevos casos.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping, GIS, epidemiología molecular.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused by bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, is a major global public health problem since it kills millions of people each year. Before the SARS-CoV-2 health emergency, the World Health Organization (WHO) considered it the leading cause of death from a single bacterial infectious agent. Furthermore, the problem is aggravated by the appearance of multi-drug resistant (MDR) bacteria. The clinical epidemiological importance is high due to the re-emergence of this disease that leads to a high genetic diversity that can lead to greater resistance to first-line antimicrobials and the lack of effective protocols for its surveillance and control. The objective is to identify the genetic variability of the strains isolated from a population to obtain the molecular epidemiology and its correlation with MDR and comorbidities (diabetes and HIV/AIDS). A total of 151 isolates were collected, finding nineteen sub-lineages; being the most frequent T1 with 53 isolates, (35%) and X1 with 29 (19.2%) isolates respectively, followed by the type LAM 1,2,4,5,9 with 15 (10.2%), H 1,3 with 5 (3.3%), MANILLA with 3 (2%), U with 4 (2.6%), X2 with 5 (3.3%), X3 with 4 (2.6%), S and T with 3 (2%) isolates. In addition to the BEIJING sub-lineage, 5 (3.3%) isolates were found, and 15 (9.9%) strains could not be classified (orphan). In the resistance against the first drugs line, it was observed in 62 isolates (41%); and Resistance to at least one first-line drug was detected in 36 (23.8%) isolates. *Diabetes mellitus* II was the main comorbidity with 20% (n= 30) and 5% (n=8) were reported as HIV positive, although no correlation was found with comorbidity and strain type. The municipality with the highest number of isolates was Monterrey, followed by Apodaca and Juárez. These results can contribute to the understanding of the prevalence and high genetic variability of strains in the Monterrey metropolitan area; likewise, with this information it can be used to improve the protocols in surveillance against tuberculosis and the prevention of new cases.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping, GIS, molecular epidemiology.

Successus in circumstantiis mutandis pone est. Memento mori

1. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es la principal causante de la enfermedad infectocontagiosa conocida como tuberculosis (TB) y que causa alteraciones inmunológicas múltiples (Rook & Hernandez-Pando, 1996), esta pertenece a un complejo de bacterias que incluyen a *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. canettii* (Sylvain et al., 2010). Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) destacan que cada año hay 9 millones de casos nuevos y tan sólo en el año 2022 hubo 1.4 millones de muertes a causa de esta enfermedad y que han ido en aumento. Por lo anterior, la convierte en la enfermedad infecciosa más importante en el mundo después de los cinco años, motivo por el cual la OMS la ha declarado emergencia mundial (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.). De acuerdo con las estadísticas presentadas por la Secretaría de Salud (SS), en México durante el año 2022, se registraron más de 28,000 casos de TB pulmonar a nivel nacional; siendo el estado de Nuevo León uno de los más afectados con más de 1,100 casos nuevos (Salud, s. f.). Estas cifras siguen colocando a México en el tercer lugar entre los países con mayor morbilidad y mortalidad por TB en América Latina. El esfuerzo para la erradicación de la TB se complica debido a factores como la pobreza y el hacinamiento, la desnutrición (Bustamante-Montes et al., 2000), los flujos migratorios de las zonas endémicas, algunas enfermedades inmunosupresoras como la diabetes y la presencia de VIH/SIDA (Cáceres et al., 2022). Aunado a lo anterior, se aumenta el problema debido al surgimiento de cepas multirresistentes a los antifímicos de primera o segunda línea (MFR), (Ormerod, 2005). La forma de transmisión, así como la gravedad de la enfermedad, la coloca en una importancia clínica epidemiológica alta debido a que no se tienen protocolos con cambios significativos para su identificación y control (Vynnycky & Fine, 2000). En la última década se observó un dramático resurgimiento en la incidencia de la TB en el mundo, ocasionando la necesidad de nuevos y mejores métodos para el diagnóstico y prevención en la diseminación de esta enfermedad (Corbett et al., 2003). Los avances en la biología molecular y el entendimiento del genoma de *Mycobacterium* nos han proporcionado nuevas técnicas y herramientas que pueden ser usadas para la identificación y confirmación de aislados provenientes de muestras clínicas. Una de estas herramientas son los espoligotipos. Este método ha sido utilizado de manera satisfactoria para la genotipificación de las cepas de *M. tuberculosis* obteniendo un

diagnóstico más rápido y confiable, además que mejoran el estudio en la información epidemiológica (Kamerbeek et al., 1997). Se basa en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un locus de repetición directa (DR) Polimórfico que contiene múltiples repeticiones en tándem separadas por secuencias espaciadoras y permite detectar la presencia o ausencia de estas secuencias espaciadoras de las DR en el genoma de *M. tuberculosis*; es fácil de desarrollar y no requiere de una gran cantidad de microorganismos. Los resultados pueden obtenerse de un cultivo de *M. tuberculosis* en 1 día. Por lo tanto, la utilidad de los espoligotipos se fundamenta en su rapidez, tanto en la detección de bacterias causales de la enfermedad como en la obtención de información epidemiológica sobre las identidades de las diferentes cepas; siendo de gran utilidad para la vigilancia de la transmisión de la TB y las intervenciones para prevenir la propagación de esta enfermedad (Groenen et al., 1993). El uso de espoligotipos ha proporcionado información para poder agrupar las cepas dentro de familias, que nos permiten estudiar su distribución filogeográfica de las cepas. Asimismo, gracias al genotificado podemos correlacionar la emergencia de cepas multi farmacorresistentes con el tipo de familia (Glynn et al., 2002) siendo de vital importancia, pues se estiman 170,000 muertes por tuberculosis MDR, y un gran total de 450,000 casos de TB-MDR (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.). Además, gracias a la tecnología e innovación de softwares, es posible utilizar sistemas de información geoespacial (GIS), uno de estos softwares es ArcGIS®. El uso de este software ha sido ventajoso para la captura, edición, análisis, tratamiento, diseño, publicación e impresión de información geográfica para el monitoreo, análisis e identificación de los pacientes diagnosticados con TB y su comportamiento en una región determinada (Moonan et al., 2004). Con esto pretendemos tener información para la identificación de conglomerados o clusters, zonas de riesgo (*hot spots*) y monitoreo en tiempo real de la enfermedad; como ha sido utilizado en estudios similares a nivel nacional. Por otra parte, las investigaciones realizadas en modelos animales de TB, estudios clínicos en humanos (Altare et al., 1998), resultados epidemiológicos de la susceptibilidad genética de *Mycobacterium* (Fieschi et al., 2003) y trabajos in vitro con líneas celulares primarias de humano indican que la respuesta inmune innata juega un rol muy importante en el control de la tuberculosis y la activación a una respuesta inmune adaptativa (Philips & Ernst, 2012). Sin embargo, *M. tuberculosis* ha desarrollado múltiples estrategias para modular la respuesta inmune y con ello prevenir la

activación óptima de la inmunidad adaptativa. Por consecuencia, es crítico comprender la relación entre las células de la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa en la TB para identificar nuevos blancos de terapias inmunomoduladoras y para elucidar los mecanismos de la inmunidad protectora (Sia et al., 2015). La proteína nuclear de unión al DNA de alta movilidad-1 (HMGB1) es una molécula conocida de daños asociados a patrones moleculares (DAMPs) que activan el sistema inmune innato (Lotze & Tracey, 2005), y se libera por células necróticas y monocitos / macrófagos en respuesta a citoquinas y a la estimulación de antígenos bacterianos (Grover et al., 2014). La HMGB1 interactúa con otras moléculas (por ejemplo, LPS bacteriano), y se une a receptores incluyendo el Receptor de Productos de Glicación Avanzada (RAGE y existe en células tanto en la forma "transmembranal" y como de receptor "señuelo" soluble) y los receptores de tipo Toll (TLR2), para activar una cascada de genes pro-inflamatorios (Lamkanfi et al., 2010). Además de la liberación de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TNF- α), HMGB1 activará las funciones de las células inmunes e inducirá su maduración (por ejemplo, monocitos, células dendríticas). El papel pro-inflamatorio de HMGB1 se ha demostrado en las enfermedades autoinmunes, trauma, sepsis y neumonía bacteriana (Angus et al., 2007). Sin embargo, los datos sobre TB son escasos. Estudios limitados *in vitro* y modelos animales han demostrado que *M. tuberculosis* y *M. bovis* pueden inducir con eficacia la secreción de HMGB1, dando lugar a una hiperactivación de citoquinas y dañar tejido pulmonar. Recientemente, se ha observado el aumento de la proteína HMGB1 en suero de pacientes infectados con tuberculosis, pero su significado aún se desconoce (Magryś et al., 2013), por lo que es de nuestro gran interés estudiar la correlación y los mecanismos celulares involucrados en la señalización a la respuesta inmune innata en el paciente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Historia de la Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad que ha estado con la humanidad durante miles de años; ha ido evolucionando en conjunto con los humanos y se ha mantenido persistentemente. El origen, así como la evolución del patógeno, aún está lejos de estar completamente entendido; esto incluye la comprensión de los mecanismos en la interacción hospedero-patógeno, el desarrollo bacteriano y su virulencia. Sin embargo, se tienen indicios donde se puede hipotetizar que el género *Mycobacterium* surgió hace más de 150 millones de años (Hayman, 1984), teniendo rasgos de colonización durante el periodo jurásico. Gracias a las técnicas modernas aplicando la biología molecular y la secuenciación genética, ha sido posible analizar un gran número de cepas de *Mycobacterium* permitiendo una estimación rigurosa y con mayor fidelidad para determinar el origen en el tiempo de las micobacterias. Estas estimaciones se facilitan debido a la baja tasa evolutiva que se ha observado en *M. tuberculosis* (Daniel, 2006), y que sirvió para analizar las cepas. Se observó que existió un linaje progenitor a *M. tuberculosis* en el este de África hace unos 3 millones de años, y se sugiere que esta cepa pudo haber infectado los primeros homínidos en ese tiempo (Gutierrez et al., 2005). De cualquier forma, todos los miembros actuales del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo las variantes africanas como *M. africanum* y *M. canettii*, así como *M. bovis*, tienen un ancestro común africano de 35,000-15,000 años de antigüedad (Kapur et al., 1994); (Brosch et al., 2002). Si bien se sabe que los primeros ancestros provienen del este de África, ya se han identificado los primeros registros en los egipcios como causante de muertes y deformidades óseas hace más de 5000 años, encontradas en las momias (Zimmerman, 1979). Desde que comenzaron las primeras migraciones masivas en África hace unos 1.7 millones de años y se desplazaron fuera de ahí, llevaron sus enfermedades a las nuevas poblaciones, incluyendo la tuberculosis (Daniel, 2006). Existen escritos que describen a la tuberculosis en la India hace unos 3300 años (Wells, 1968), y en China hace unos 2300 años («The Story of Clinical Pulmonary Tuberculosis.», 1941). Así como en Egipto, en el continente americano la evidencia inicial que se obtuvo de la enfermedad fue

por medio de la observación ósea de momias tomadas de Perú y posteriormente, mediante el análisis del DNA bacteriano, se corroboró que habían sido infectadas por *M. tuberculosis*, en la época pre- colombiana, hace unos 1500 años (Daniel, 2006), posiblemente debido a las primeras migraciones europeas hacia el continente. A través de los siglos, todo el conocimiento, la descripción y el tratamiento hacia la enfermedad fue meramente empírico. No fue hasta 1882 que se tuvo un cambio radical en el conocimiento de la tuberculosis de la mano de Robert Koch, quién demostró que el agente de la enfermedad era una bacteria y con ello nacieron las técnicas para su identificación (Philip, 2019). A partir de este punto, el conocimiento y el esfuerzo por desarrollar tratamientos efectivos para su erradicación avanzó considerablemente.

2.2 Descripción de la enfermedad y etiología

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa causada principalmente por el bacilo *M. tuberculosis*, la cual muestra altas tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.

M tuberculosis sensu stricto forma parte de un grupo conocido como complejo M tuberculosis (MTCB) formado por ocho especies, donde se incluyen: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. cannetii* y *M. pinnipedii*, siendo *M. tuberculosis* sensu stricto el agente causante de un 90 % de los casos de tuberculosis pulmonar. La tuberculosis sigue siendo serio problema de salud pública, con aproximadamente un tercio de la población mundial infectada; en el año 2022 fue causa de 1.5 millones de muertes (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.). el 86% de los nuevos casos de tuberculosis se produjeron en los 30 países con mayor carga de tuberculosis, entre los países mas afectados estan: India, Indonesia, Filipinas, China, Bangladesh (Figura 1).

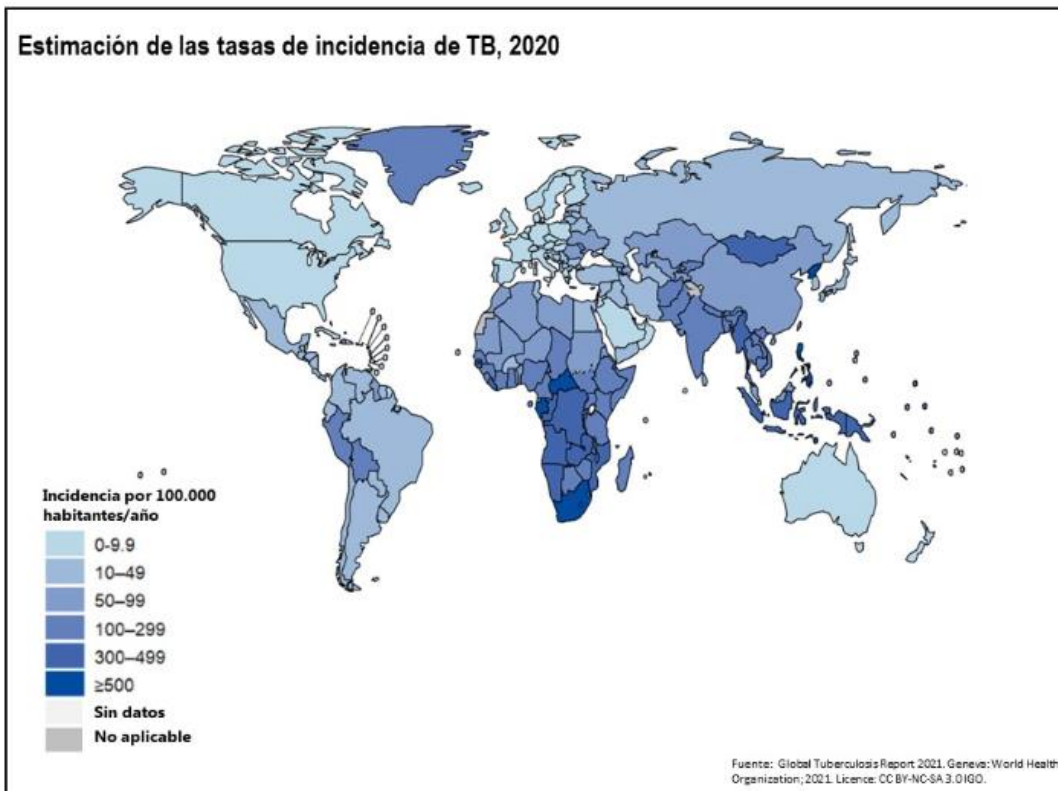


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en 2020. Las diferentes intensidades de color azul representan el rango de casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes (<https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/PlanTuberculosis/mapas.htm>)

M. tuberculosis es una bacteria de forma bacilar, inmóvil, no esporulada, mide de 2 a 4 μm de longitud por 0.2 a 0.5 μm de ancho. Ésta es una bacteria aerobia estricta, condición que favorece su localización en los alvéolos pulmonares (Pai et al., 2016). Es un patógeno intracelular de lento crecimiento con un tiempo de generación de 15 a 20 horas. La pared celular de la micobacteria es una estructura compleja que se requiere para el crecimiento celular, la resistencia a los antibióticos y la virulencia (Asselineau et al., 2002). Es una bacteria que no puede ser teñida con la coloración de Gram, debido a su alto contenido en lípidos, pero sí puede ser teñida con la coloración diferencial de Ziehl-Neelsen, por lo que es clasificada como una bacteria ácido alcohol resistente (BAAR). Además de la resistencia a los colorantes, también su alto contenido en lípidos le confiere una mayor resistencia a los desinfectantes y la desecación (Asselineau et al., 2002). La pared celular es parte principal de la virulencia de la bacteria, está compuesta de tres macromoléculas distintas: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos (Figura 2-A), que están rodeadas por una capa externa de lípidos libres que constituyen una estructura similar a una cápsula, la

cual contiene además de lípidos, proteínas y polisacáridos (Maitra et al., 2019). Gracias a la tecnología de secuenciación, sabemos que el genoma de *M. tuberculosis* se conforma por más de 4,411,529 millones de pares de bases (Figura 2-B), que codifican para unos 4000 genes (Cole et al., 1998), obteniendo un mejor conocimiento en la biología y síntesis de proteínas y factores que intervienen en la virulencia (Figura 2-B).

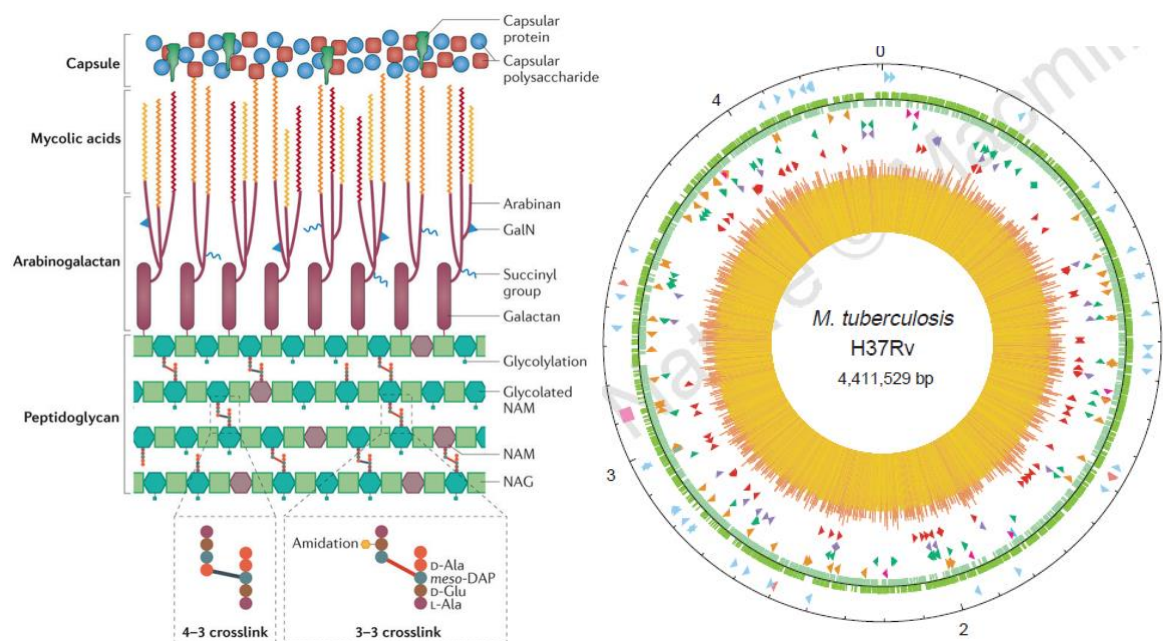


Figura 2. A) Componentes de la pared celular de *M. tuberculosis*. B) Genoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Nature Reviews, 2002, 1998).

La infección de *M. tuberculosis* con mayor frecuencia se transmite de persona a persona por medio de gotitas de 1 - 5 micras de diámetro suspendidas en el aire en forma de aerosol. Las gotitas infecciosas se generan cuando las personas que tienen la enfermedad activa de tuberculosis pulmonar al toser, estornudar o al hablar. Las gotitas que contienen dos o tres bacilos son lo suficientemente pequeñas para permanecer suspendidas en el aire durante largos periodos de tiempo, la transmisión se produce cuando una persona inhala las gotitas, éstas entran por vía aérea pasando por los bronquios hasta alcanzar los alvéolos pulmonares, lugar donde los bacilos se replican (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.). Globalmente existen seis linajes de *M. tuberculosis*: linaje indo- oceánico, linaje Este-asiático, linaje del este africano-asiático, linaje Euroamericano, linaje del oeste africano 1 y linaje del oeste africano 2 (Gagneux, 2013), sugiriendo que las cepas se adaptan a cierto tipo de población.

2.3 Tuberculosis pulmonar

La tuberculosis puede afectar cualquier órgano del cuerpo, sin embargo, cerca del 85-90% de los casos de tuberculosis son a nivel pulmonar (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.), ya que la vía aérea es la principal vía de entrada a los pulmones. La forma de transmisión para que una persona sana se contagie de tuberculosis pulmonar es permaneciendo en contacto con una persona con enfermedad pulmonar activa de manera continua, aspirando gotitas de saliva que contienen dos o tres bacilos, estas gotitas son lo suficientemente pequeñas para permanecer en el aire durante largos periodos de tiempo y entrar por vía aérea y establecerse en los alveolos pulmonares donde los bacilos se replican una vez establecidos, para que se implante una infección puede darse en cualquier región del pulmón pero más frecuentemente en el lóbulo distal inferior. Las células que participan en esta infección primaria son los macrófagos que se encuentran en los alvéolos y las células del epitelio pulmonar, se lleva a cabo un reclutamiento de células inflamatorias para dar lugar a la formación del granuloma (Escombe et al., 2007). Algunas personas podrán desarrollar una infección activa por *M. tuberculosis* y presentar síntomas clínicos, sin embargo, la mayoría no desarrollarán síntomas clínicos pero son capaces de desarrollar una respuesta inmune eficiente, esto ocurre porque el sistema inmune puede controlar la infección, ya que hay un equilibrio dinámico entre los mecanismos de defensa del individuo y la bacteria, en este caso las personas desarrollarán una infección latente por este agente.

2.4 Diagnóstico de Tuberculosis

2.4.1 Técnicas de identificación

Para llegar al diagnóstico de Tuberculosis, se realiza por medio de los hallazgos clínicos que presente el paciente y por rayos X, y con respecto a las técnicas de laboratorio utilizadas para la identificación se encuentran las técnicas convencionales, así como las técnicas moleculares. Los métodos convencionales utilizados son, la baciloscopia y el cultivo en medio de Lowenstein Jensen además de pruebas para investigación bioquímicas para identificar a especies del complejo MTB (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.) Las muestras fueron procesadas en gabinete de bioseguridad nivel II para

realizar los procedimientos de cultivo, todas las muestras fueron inoculadas directamente en el medio de Lowenstein Jensen (LJ), tinción y descontaminación por el método de Petroff.

Para realizar la descontaminación por el método de Petroff (Petroff, 1915), se realiza colocando la muestra de la expectoración en un tubo estéril con un volumen igual de NaOH 4%. La baciloscopía, se realiza utilizando la tinción diferencial de Ziehl-Neelsen para la identificación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), ésta utiliza carbol fucsina fenicada y como colorante secundario el azul de metileno, las bacterias se tiñen de color rojo con un fondo azul como contraste, este procedimiento es uno de los más rápidos y económicos. El Cultivo en el medio de Lowenstein Jensen de las muestras clínicas es fundamental para el diagnóstico de las infecciones por este microorganismo, es un método más sensible que la baciloscopía pero para tener un resultado positivo hay que esperar de 6 a 8 semanas y esto produce un retardo en el inicio del tratamiento. Las colonias son identificadas por el tiempo de crecimiento, producción de pigmento y por las pruebas bioquímicas como la producción de niacina y la reducción de nitratos, además de la prueba de catalasa realizada a temperatura ambiente (25°C) y a 68°C, *M. tuberculosis* es sensible a esta temperatura a diferencia de otras micobacterias no tuberculosas (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.).

2.4.2 Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares nos permiten identificar la especie a nivel de genotipo y determinar la variabilidad genética entre los aislados a estudiar, entre los métodos para realizar genotipificación están: Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción IS6110 (RFLP IS6110) (Groenen et al., 1993), el Número Variable de Repeticiones en Tandem de las Unidades Intercaladas Repetitivas de Micobacterias (MIRU-VNTR) y la tipificación con los Oligonucleótidos espaciadores (*Spoligotyping*) (Gori et al., 2005).

2.4.2.1 Técnica RFLP-IS6110

Esta técnica (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción de la región IS6110) se basa en la restricción enzimática y la hibridación del DNA con una sonda correspondiente a un fragmento de la secuencia de inserción IS6110. Dicha secuencia de inserción se

encuentra presente con una variación de 0 a 20 copias en todas las cepas de *M. tuberculosis*, en posiciones variables, por lo cual, se puede observar un polimorfismo de distintas bandas para cada cepa. A este resultado se le denomina perfil genético RFLP-IS6110 (Sylvain et al., 2010).

2.4.2.2 Técnica de MIRU-VNTR

Esta técnica (Número Variable de Repeticiones en Tándem de las Unidades Intercaladas y Repetitivas de Micobacterias) está basada en la comparación de las repeticiones de locus múltiples de secuencia corta y consisten en la detección de segmentos más simples de repeticiones en tándem de 2-5 pb, situados en diversos sitios del genoma como marcadores genéticos; generando así un polimorfismo de elementos repetitivos diferentes entre cada cepa de micobacterias, pudiéndose asignar un patrón para determinar genotípicamente un linaje o sub-linaje al que corresponde (Sylvain et al., 2010).

2.4.2.3 Técnica de Spoligotyping

La técnica de espoligotipos o “*Spoligotyping*” se basa en la presencia y ausencia de secuencias espaciadoras conocidas que se presentan entre las repeticiones directas DR (región Direct Repeat) que se encuentran situadas en un locus cromosómico exclusivo del complejo *M. tuberculosis*. Una vez que se extrae el DNA de las micobacterias, se realiza una amplificación utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de estas secuencias obteniendo productos de amplificación de diferentes tamaños, para posteriormente realizar una hibridación utilizando 43 oligonucleótidos los cuáles están fijados en una membrana como soporte y se revelan patrones de espacios diferentes entre cada cepa del complejo, observando la presencia o ausencia de los 43 espaciadores de secuencia única de este locus como marcas oscuras (Gori et al., 2005). Dichas marcas de los patrones obtenidos se convierten a un formato binario, que se interpretará utilizando los números 1 y 0. El “1” indicará la presencia de una hibridación; mientras que el “0”, se utilizará cuando no se encuentre marca en el espacio, por lo tanto no hay hibridación. Posteriormente, se obtendrá un código que será separado en 14 grupos de tres dígitos, dejando al espaciador 43 con sólo un dígito separado del resto. Posteriormente, cada grupo de tres dígitos se interpreta de la forma siguiente:

000=0
 001=1
 010=2
 011=3
 100=4
 101=5
 110=6
 111=7

El último espaciador 43 de la siguiente forma: 0=0, 1=1 (Figura 3). Este código, llamado también octal se ingresa en la base de datos internacional SITVIT2 database del Instituto Pasteur Guadeloupe. Esta base de datos se encuentra disponible en (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr>).

Una vez obtenidos los valores se caracterizan de acuerdo a lo obtenido para clasificarlos en la familia correspondiente; o bien si se detecta un espoligotipo no definido se notificará como desconocido (Orphan), (Driscoll, 2009).

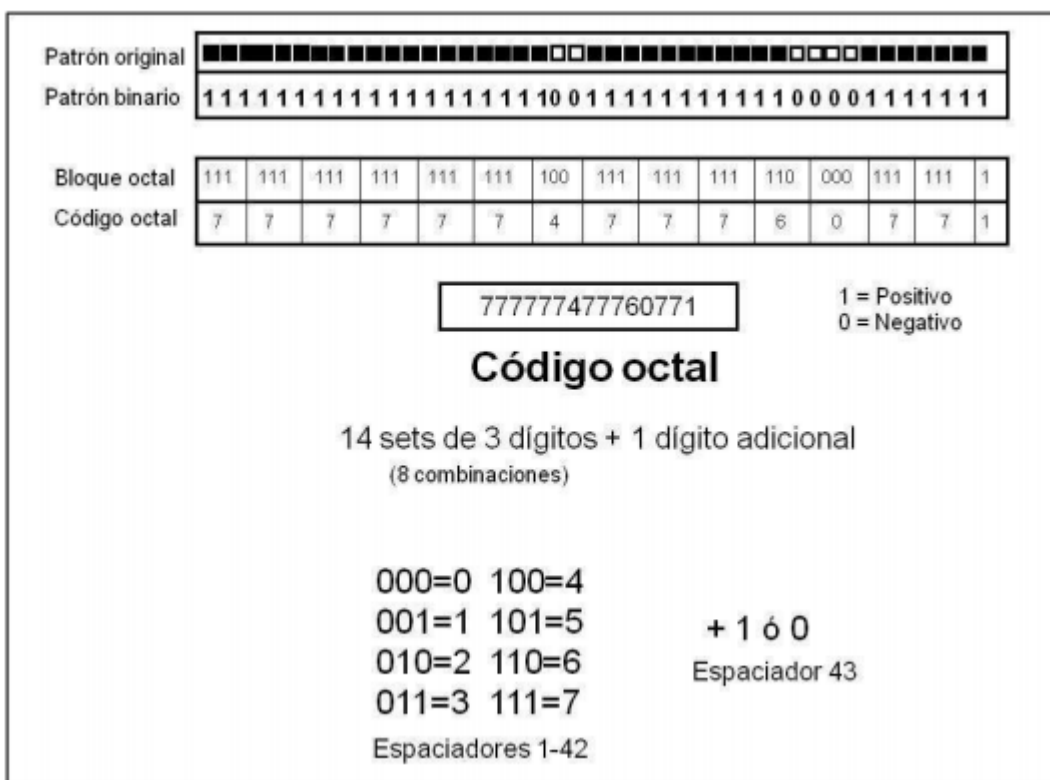


Figura 3 . Análisis de los patrones de spoligotyping. Se muestra cómo se debe realizar la lectura para posteriormente obtener el código octal y revisarlo en la base de datos.

2.5 México y la tuberculosis

En México, la tuberculosis mantiene una tendencia ascendente en la incidencia de mortalidad por la enfermedad, tan sólo en el año 2022 se diagnosticaron cerca de 30,000 casos nuevos de tuberculosis pulmonar (Salud, s. f.). En Nuevo León, en el año 2022, se reportaron más de mil casos nuevos reportados por la secretaria de Salud del estado (Salud, s. f.)teniendo un aumento en más de cien casos comparado al mismo tiempo que el año anterior.

2.6 Cepas Farmacorresistentes

La aparición de cepas farmacorresistentes, han considerado a la tuberculosis como una emergencia de salud pública y una enfermedad reemergente (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.), esto se ha observado porque lejos de contener la enfermedad, los números de casos han aumentado de manera alarmante. La línea de primera atención incluye a los antifímicos isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, los cuales son administrados por un periodo de 6 meses con supervisión (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.). Sin embargo, pocos años después de haberse iniciado su uso como fármacos anti-TB se reportó el surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los dos medicamentos más eficaces (rifampicina e isoniazida). Estas cepas se denominaron multifarmacorresistentes (Figura 4). Además, la resistencia a rifampicina generalmente está asociada a la resistencia de otros fármacos de primera línea. Esta situación ha comprometido el control de la TB y ha contribuido al resurgimiento de la TB en todo el mundo (Pai et al., 2016), debido a que los pacientes portadores de cepas MFR tienen escasa probabilidad de curarse. A pesar de la seriedad de la TB-MFR, este problema aún no se aborda en una forma adecuada por parte de la comunidad médica y científica mundial, no teniendo protocolos eficientes para contener la enfermedad ni para la prevención de la misma (*Global Tuberculosis Report 2023*, s. f.).

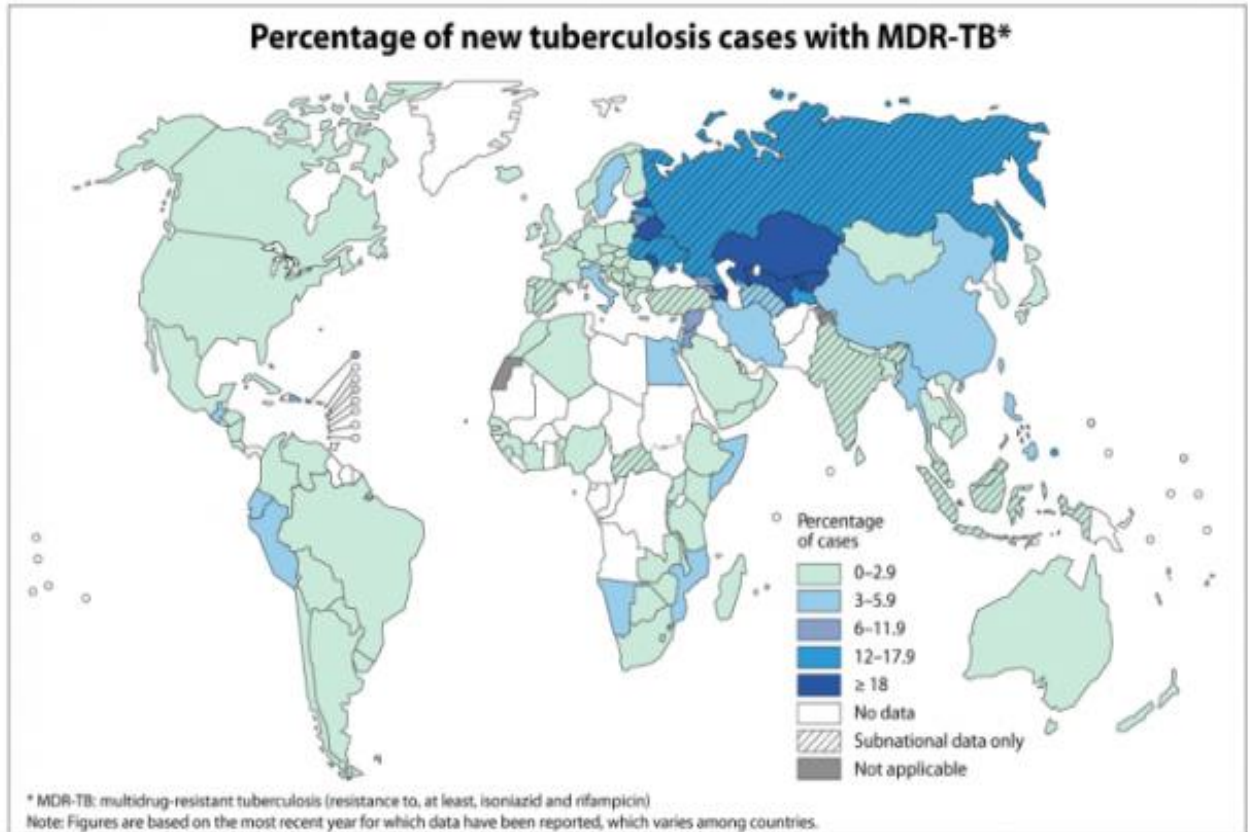


Figura 4. Porcentaje de nuevos casos de tuberculosis multifarmacorresistentes por países.
 Las figuras están basadas en el año más reciente reportado, el cual puede variar entre países (WHO 2018).

2.6.2 Mecanismos de acción de fármacos antituberculosos.

El tratamiento que se le brinda a una persona con tuberculosis pulmonar suele tener un periodo largo y requiere de distintos fármacos que en conjunto, tendrán una acción antituberculosa; los fármacos de elección como primera línea son la rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol y estreptomina, mismos que fueron descubiertos y aplicados a través del tiempo (Figura 5) la cronología de medicamentos utilizados en la terapia contra la tuberculosis (Ormerod, 2005).

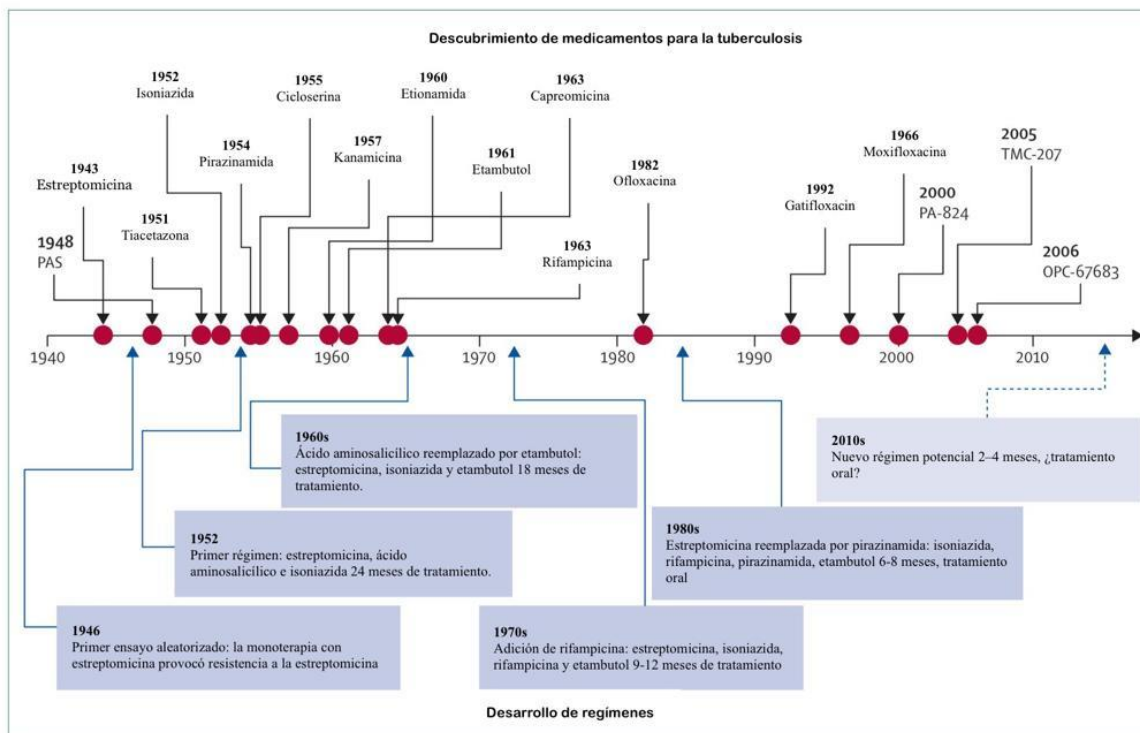


Figura. 5. Cronología de medicamentos utilizados en la terapia contra la tuberculosis.

Tomado y modificado de: The Lancet, 375(9731), 2100–2109

2.6.2.1 Rifampicina

La rifampicina es un bactericida derivado de la rifamicina B aislada partir de cultivos derivados de un bosque de pinos cerca de Niza, Francia, en los laboratorios de Lepetit y Ciba. En dichos laboratorios se buscaba disminuir la rápida eliminación del medicamento por vía biliar y aumentar su efecto antibiótico. La rifamicina B fue modificada a rifamicina-SV y de esta surgió la rifampicina que actualmente conocemos. Este medicamento era de primera línea para tratar a los pacientes con tuberculosis, sin embargo, después de la aparición de bacterias resistentes se combinó el medicamento con otros (etambutol, estreptomina e isoniazida) durante periodos más largos de tratamiento (18 meses). El mecanismo de acción es mediante la unión a la subunidad beta de la RNA polimerasa dependiente de DNA, logrando así que no se forme la parte inicial de la cadena de síntesis de RNA (Figura 6). Actualmente MTB presenta resistencia a este medicamento debido a una mutación del gen *rpoB* por el cambio del aa 420 de serina a leucina (Ormerod, 2005).

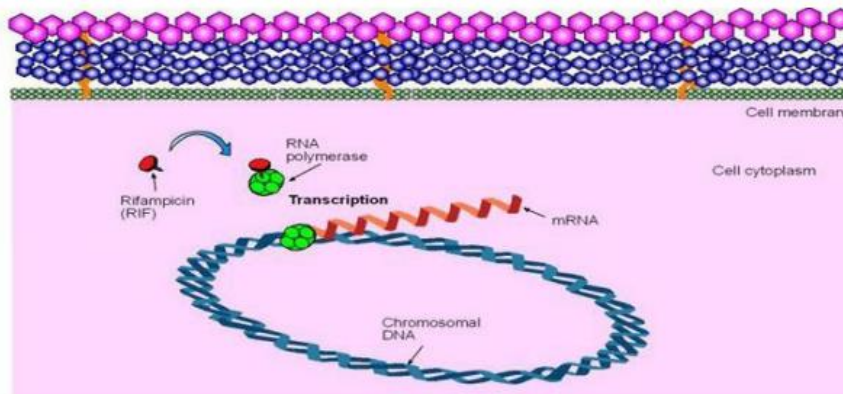


Figura 6. Mecanismo de acción de la rifampicina. Este antibiótico interfiere con la transcripción del mRNA al unirse a la subunidad beta de la RNA polimerasa.

2.6.2.2 Isoniazida

La Isoniazida es un fármaco sintético derivado del ácido nicotínico. Es un fármaco de gran importancia ya que constituye la mayor actividad bactericida en el tratamiento antituberculoso, siendo muy efectivo tanto para los bacilos extracelulares, como los intracelulares (González-Martín et al., 2010). Su mecanismo de acción no está bien definido, sin embargo, se han sugerido algunas formas de cómo actúa frente al bacilo, principalmente, se ha mencionado que actúa inhibiendo la síntesis del ácido micólico, constituyente importante de la pared celular micobacteriana (Takayama et al., 1975); dicha exposición lleva a la pérdida de la ácido resistencia, y por tal motivo, al descenso de la cantidad de lípidos. Otros mecanismos que se han propuesto son la activación del sistema catalasa- peroxidasa (Arráiz et al., 2005) y la generación de especies reactivas de oxígeno (Taha Nazir, 2011).

2.6.2.3 Pirazinamida

La pirazinamida es un fármaco utilizado en la primera línea en los esquemas modernos contra tuberculosis; generalmente se administra junto con isoniazida o rifampicina. Fue sintetizada en el año 1952 por kushner y solotorovsky (Stoffels et al., 2012). Inicialmente se consideró como fármaco de segunda elección o como tratamiento de rescate debido a su toxicidad. En

1972 se reincorporo cuando se lograron realizar nuevos esquemas debido a asociaciones de medicamentos, diferentes duraciones y distintas formas de administración (Daniel, 2006). Este fármaco es absorbido en el epitelio intestinal, se absorbe de 1.25 horas hasta 3.6 horas, una vez absorbido alcanzara la circulación donde es distribuido en toda el agua corporal. Es activado con pH ligeramente acido (dentro de las micobacterias, pH: 5) donde se convierte en acido ácido pirazinoico por medio de la enzima pirazinamidasas. El ácido pirazinoico sale de la bacteria por difusión donde se protona y vuelve a entrar a la bacteria provocando una acidificación en la bacteria lo que provoca su muerte. Además, el ácido pirazinoico inhibe la proteína FAS1 la cual es la encargada de producir acido micólico, el cual forma parte de la pared microbiana, así mismo también se une a la proteína S1 ocasionando una inhibición en el proceso de trans-traducción (Ormerod, 2005).

La bacteria adquiere resistencia debido a mutaciones en el gen *pncA* el cual se encarga de producir pirazinamidasas, dichas mutaciones provocan baja cantidad de la enzima pirazinamidasas y por ende este fármaco no se puede activar (Kapur et al., 1994). Así mismo mutaciones en gen *S1* generan resistencia debido a que el fármaco no podría afectar en la trans-traducción. Es desechado por medio de la orina, puede tener efectos secundarios como vomito, náuseas, fiebre, gota aguda y lesión hepática con ictericia.

2.6.2.4 Etambutol

El etambutol es considerado un fármaco a implementar en casos de infecciones causadas por micobacterias como bien lo pudieran ser las infecciones atípicas por micobacterias o el caso de la tuberculosis (McIlleron et al., 2006). Es muy común que dentro de las prescripciones médicas, se combine este fármaco con alguno otro (administración múltiple) como lo pudieran ser la pirazinamida, isoniazida, rifampicina o estreptomycin ya que existen infecciones de tuberculosis que están generadas por micobacterias resistentes a la isoniazida y la combinación de distintos fármacos, logran potencializar el efecto en el paciente. El etambutol es de carácter bacteriostático, lo cual quiere decir que en su mecanismo de acción, se encarga de interrumpir la biosíntesis de arabinogalactano, afectando el ensamblaje de la pared celular de la micobacteria. Este actúa de manera específica sobre la bacteria que produce la tuberculosis y se encarga de inhibir la entrada en la bacteria de los ácidos micólicos, que son los constituyentes esenciales de la pared celular de las micobacterias (Nair

et al., 2023).

El mecanismo de acción de los fármacos de primera línea se encuentra descrita en la (Figura 7)

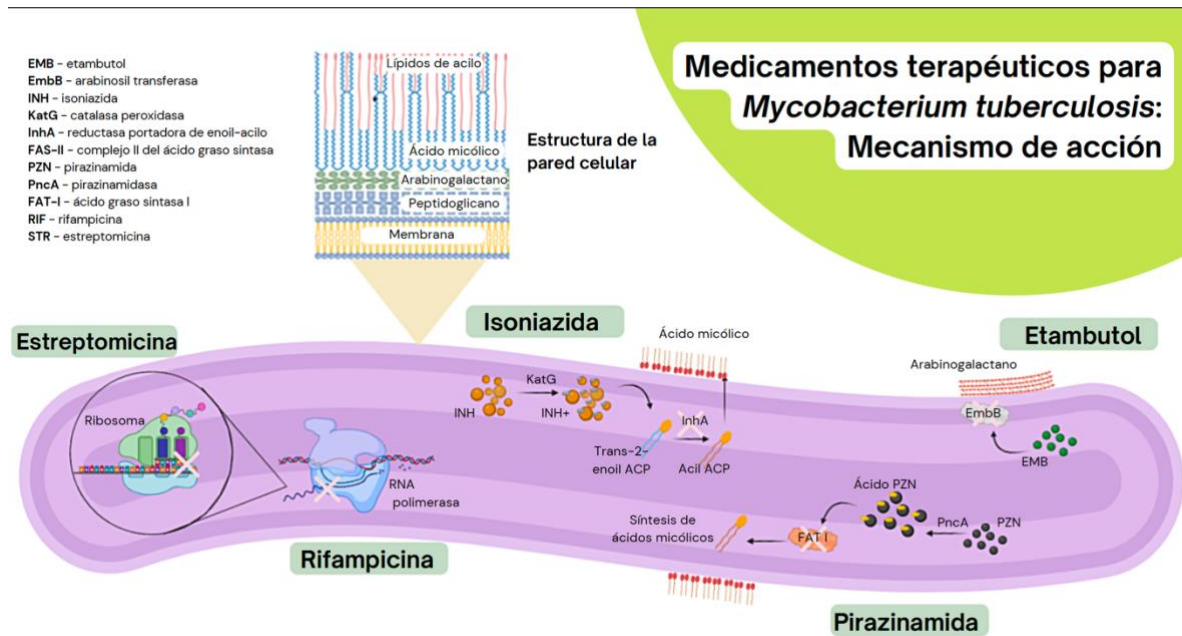


Figura 7. Mecanismo de acción de los fármacos de primera línea contra tuberculosis

2.7 Sistemas de Información Geográfica (GIS)

Los avances en la computación y programas de informática han implicado un desarrollo importante para la aplicación de esos softwares en las ciencias de la salud y su aplicación en la investigación; uno de los más utilizados actualmente para dicho propósito son los softwares o sistemas de información geoespacial (GIS por sus siglas en inglés). Estos softwares se han utilizado para capturar, almacenar, verificar y mostrar datos relacionados con las posiciones en la superficie de un determinado sitio-espacio. Al observar los datos aparentemente no relacionados, los GIS pueden ayudar a los investigadores a comprender mejor los patrones espaciales y sus relaciones con las variables específicas que se desean investigar (Moonan et al., 2004). Para ello, estos softwares utilizan cualquier información que incluya una ubicación; que se puede expresar de distintas maneras como la latitud y longitud, la dirección o el código postal. Distintos tipos de información se pueden comparar y contrastar utilizando

los GIS. Igualmente, estos sistemas pueden incluir datos sobre personas, tales como población, ingresos o nivel de educación. Puede incluir información sobre ubicaciones de distintas variables como la ubicación de ríos, diferentes tipos de vegetación y distintos tipos de suelo. Para la parte social, se pueden incluir variables para la detección de fábricas, granjas y escuelas; o desagües pluviales, carreteras y líneas de energía eléctrica. Con estos softwares, se puede comparar las ubicaciones de diferentes cosas con el fin de evaluar cómo se relaciona entre sí y determinar si tienen un valor estadístico. Algunos ejemplos es la creación de mapas que nos muestran los sitios donde se produce mayor contaminación, identificando las fábricas y sitios sensibles a la contaminación. Dicho mapa ayudó a los investigadores a determinar dónde está el mayor riesgo de abastecimiento de agua (Poojar et al., 2020). Desde principios del 2000, se comenzaron a utilizar los primeros estudios con la tecnología de los GIS aplicados en el área de la salud; donde se quería comprender como se comportaban diferentes enfermedades, su asociación epidemiológica y la evaluación de los programas para el control de la enfermedad. Entre todas ellas, una de gran interés para nosotros, fue la tuberculosis. Los primeros estudios se realizaron en Estados Unidos, donde se evaluó una estrategia bien elaborada para la implementación y gestión en la prestación de servicios de salud contra la tuberculosis evaluando la zonas y población afectadas. Casi al mismo tiempo, se realizaron observaciones en los patrones de contagio de la tuberculosis en una población de Baltimore, USA, (William. 1998) adaptando un GIS para la geolocalización y epidemiología de la enfermedad. Sus resultados sugerían, que más de un tercio de casos de personas infectadas en las zonas urbanas resultaban de una transmisión recientemente, obteniendo la información mediante el análisis geoespacial de las cepas. Más adelante, en un estudio en África, debido a la alta tasa de infección de tuberculosis y otros tipos de enfermedades, se determinó que la capacidad de modelización espacial que ofrece el GIS es directamente aplicable a la comprensión de la variación espacial de la enfermedad, y su relación con los factores ambientales y el sistema de salud. Concluyendo que el potencial de los GIS para contribuir a la investigación y planificación sanitaria en África debe ser aplicable a los problemas de salud más apremiantes en el continente (Tiwari et al., 2006). Los softwares para GIS evolucionan, y con ello el uso que tiene una aplicación; tal fue el caso del grupo de Tiwari, et al, que en el 2006 publicaron la identificación de zonas de riesgo (*hot spots*) en una región de la India, donde se forman “clúster” de cepas y pueden ser bien identificadas en el plano

geoespacial para poder tener una estrategia bien implementada evitando la diseminación de la enfermedad. Gracias a esto, la metodología estadística de escaneo espacial utilizada en este estudio tuvo un uso potencial en la vigilancia de la tuberculosis para detectar los verdaderos puntos de contagio de la enfermedad (Tiwari et al., 2006). En México, el primer estudio se efectuó en el año 2005 por el grupo encabezado por Jacobson, et al, en la cual, mediante el análisis de una población de Veracruz, se analizó la distribución geoespacial de cepas detectadas como MRD, obteniendo una distribución no significativa para concluir que la misma cepa era la causante de infección en kilómetros de distancia (Jacobson et al., 2005). Los GIS actualmente tienen potentes herramientas que pueden ayudar a considerar otras situaciones a las ya mencionadas, una de las cuales es predecir cómo se puede comportar la enfermedad; teniendo significancia en la transmisión y número de infectados, así como deducir el tipo de cepa que estará en esa infección. Es por ello la importancia de obtener un análisis actual, moderno y bien identificado para la vigilancia, acción y tratamiento de las personas que están infectadas (Poojar et al., 2020).

3 DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis (TB), causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, es un serio problema de salud pública mundial, debido a que causa la muerte de millones de personas cada año. Después de la pandemia por COVID-19, la Organización Mundial de la Salud (OMS) consideró una reemergencia por ser nuevamente la principal causa de muerte por un agente infeccioso. Además, el problema se agrava debido a la aparición de bacterias multi-resistentes a antibióticos (MRD). La importancia clínica epidemiológica es alta debido a la falta de protocolos efectivos para su identificación, vigilancia y control. Nuestro objetivo es generar protocolos con el desarrollo y la innovación de técnicas moleculares, para determinar: 1) la variedad genética de las cepas aisladas de una población; 2) la epidemiología y su correlación con MRD; y 3) el riesgo con otras enfermedades (diabetes y VIH/SIDA). Con la información recopilada podremos establecer la incidencia de la TB dentro de un espacio determinado, analizar la formación de zonas de riesgos (*hot spots*) y proporcionar modelos de predicción del contagio. Los datos darán información de la resistencia a fármacos de cepas, su georreferenciación en el estado y permitirá determinar la factibilidad de implementar protocolos similares a lo largo del país.

4 HIPÓTESIS

Existe una diversidad genética de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* presente en las poblaciones de Monterrey, San Nicolás de los Garza y Guadalupe, Nuevo León.

5 OBJETIVO GENERAL

Analizar y genotipificar, determinar la farmacorresistencia, la formación de “sitios de riesgo” y la variabilidad epidemiológica de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* del área urbana del estado de Nuevo León.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Genotipificar por espoligotipos los aislados clínicos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del área urbana de Nuevo León.
2. Determinar la susceptibilidad y resistencia a los antifímicos de primera línea.
3. Determinar por georreferenciación la distribución espacial de tuberculosis de la zona urbana de Nuevo León.
4. Determinar la correlación epidemiológica entre la Genotipificación y los factores de riesgo
5. Elaborar un mapa de geolocalización y georreferenciación para determinar sitios de riesgo de los casos de tuberculosis pulmonar mediante el uso de sistemas de información geoespacial.
- 6.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Población de estudio:

Se realizó un estudio transversal con la selección de 151 muestras obtenidas aleatoriamente. Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se aislaron de la población del área urbana de Nuevo León, de clínicas de primer nivel de la secretaria de Salud del estado de Nuevo León, provenientes de muestras de esputo de paciente diagnosticados con TB pulmonar por primera vez en el periodo de junio del 2019 a diciembre 2020. Estas muestras se procesaron en el Laboratorio estatal de salud pública del estado de Nuevo León para su cultivo y posteriormente se realizó la extracción de material genético en el laboratorio de Inmunología y virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL en colaboración con el laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica de la Facultad de Medicina de la UANL. El rango de edad para los pacientes incluidos fue de 18 a 96 años. En este estudio se excluyeron los pacientes con tuberculosis extrapulmonar, los menores de edad y los pacientes que se encuentren en condiciones de cárcel. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con número de registro: FAEN-E-1496. Así mismo, solamente se tuvo acceso a las muestras de esputo, nunca a los pacientes.

6.2 Procesamiento de muestras clínicas:

Las muestras clínicas se procesaron en un gabinete de bioseguridad nivel II en donde se llevó a cabo la descontaminación por medio del método de Petroff, la tinción de Ziehl-Neelsen para detectar BAAR y se cultivaron en medio Lowestein-Jensen.

- Descontaminación de Petroff:

Para llevar a cabo la descontaminación, se realizó de acuerdo al protocolo (Petroff, 1915) de las muestras se añadió 2 mL de la muestra y 2 mL de NaOH 4% en un tubo estéril de fondo cónico. Se homogenizó la muestra en vórtex por 30 s. Posterior a ello se centrifugó por 15 min a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante. Se utilizó HCl para neutralizar el pH.

- Tinción de Ziehl-Neelsen:

Para la identificación de BAAR, se realizó la tinción diferencial de Ziehl-Neelsen. Se

colocó una asada de la muestra en un portaobjetos y se fijó con calor en una plancha de calentamiento. Se cubrió totalmente la superficie de la preparación con fucsina básica fenicada recién filtrada y dejar actuar mediante la emisión de vapores con una torunda y alcohol hasta completar tres veces; se lavó con agua destilada, posterior a ello se cubrió la preparación con alcohol-ácido para decolorar, se enjuagó la preparación con abundante agua y se cubrió la superficie con la preparación con azul de metileno por 5 min, se enjuagó la preparación; se examinó al microscopio de luz visible con un objetivo de inmersión (100X). Los BAAR se tiñeron en rojo brillante sobre un fondo azulado como contraste (Pai et al., 2016).

- ***Cultivo en Löwenstein-Jensen:***

Las muestras procesadas se transfirieron a tubos con tapón que contienen medio Lowestein-Jensen incubándolos a 37°C en una atmósfera de 5-10% CO₂. El crecimiento promedio fue a partir de las cuatro semanas y no se descartaron los tubos hasta finalizar ocho semanas para considerarlos negativos.

- ***Identificación de M. tuberculosis:***

Para confirmar la especie de la micobacteria, las colonias se identificaron con pruebas bioquímicas, como la producción de niacina y reducción de nitratos, siendo un resultado positivo al observar un cambio de incoloro a color morado. Además de la prueba de catalasa, la cual se identifica por la liberación de O₂ y producción de agua, utilizando el peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente (25°C), dicha reacción es negativa cuando se realiza a 68°C ya que *M. tuberculosis* es sensible a esta temperatura a diferencia de otras micobacterias no tuberculosas (González-Martín et al., 2010).

6.3 Obtención de DNA:

La extracción de DNA genómico se realizó mediante el método de lisis enzimática con lisozima y proteinasa K. Se utilizaron cinco colonias de cultivo para inactivarlo en un tubo de 1.5 mL a 80°C por 1 h con agua estéril en baño seco, posteriormente se centrifugó por 10 min a 8,500 rpm, y se desechó el sobrenadante. Para el precipitado, se lavó con Tris-

HCl 100 mM y lisozima (1mg/mL) y se incubó toda la noche a 36°C en baño seco. Se agregó buffer TE 1X con SDS 1% /proteinasas K y se incubó por 2 h a 55°C. A esto se le agregó fenol saturado (cloroformo: alcohol isoamílico; 24:1) y TE 1X, se mezcló y se centrifugó 8 min a 14,000 rpm. Este último paso se repitió por triplicado. Se recuperó la fase acuosa, se añadió 2.33 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitando por 20 min a -20°C y se centrifugó por 5 min a 14,000 lavando el sedimento con etanol al 70% por dos veces. Posteriormente se dejó secando toda la noche, y se suspendió en TE 1X y se incubó a 65°C por 15 min. La cuantificación del DNA se realizó mediante el equipo de NanoDrop® por triplicado.

6.4 Genotipificación de *M. tuberculosis* mediante Spoligotyping:

Todos los aislamientos se genotipificaron con un kit comercial de *Spoligotyping* (Isogen Lifes sciences) de acuerdo a la técnica estandarizada (Driscoll, 2009). Se realizó la amplificación de las regiones espaciadoras del genoma de *M. tuberculosis* mediante los genes DRa y DRb, utilizando 200 ng de DNA y lo siguiente:

Buffer	(NH ₄ 1X pH 8.8), 2 mM de MgCl ₂ , 0.2 mM de cada dNTP, 200 nM
Iniciador DRa	5'-Biotina-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3'
Iniciador DRb	5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'
Taq DNA polimerasa	1U

Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

- Desnaturalización a 96°C por 3 min
- 40 ciclos de 96°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 30 s.
- Extensión final a 72°C por 5 min.

El DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG se usaron como controles.

La detección quimio luminiscente de la membrana se llevó a cabo mediante la incubación por 1 min en 20 mL de los reactivos de detección del kit (Gori et al., 2005).

6.5 Perfil de farmacorresistencia fenotípica por el método BACTEC MGIT 960:

Para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas genotipificadas, se utilizó el kit comercial BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit y se realizó el protocolo sugerido por el fabricante (Becton, Dickinson and Company). Este es un método cualitativo que tuvo una duración variada de entre cuatro a trece días. Estos resultados fueron interpretados por el equipo BD BACTEC MGIT de forma automática para la sensibilidad o resistencia fenotípica de estreptomina (STR), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y etambutol (EMB). Se consideraron concentraciones estándar (isoniazida $> 0,1 \mu\text{g/mL}$, rifampicina $1,0 \mu\text{g/mL}$, etambutol $5,0 \mu\text{g/mL}$ y estreptomina $1,0 \mu\text{g/mL}$). Las cepas resistentes a rifampicina se consideraron resistentes a rifampicina (TB-RR), las cepas resistentes a 2-4 fármacos se consideraron multirresistentes (TB-MDR); y las cepas resistentes a todos los medicamentos de primera línea fueron consideradas SIREP MDR-TB.

6.6 Correlación de genotipos de M. tuberculosis y su farmacorresistencia:

En este apartado se observó si existe alta o baja incidencia de agrupaciones. Asimismo, los perfiles de farmacorresistencia fenotípica obtenidos se conjuntan para ver la existencia de una correlación entre las cepas resistentes con base a la incidencia de las agrupaciones. La frecuencia de los espoligotipos encontrados se cuantificó y se determinaron los genotipos predominantes en la población de estudio, como su farmacorresistencia.

6.7 Correlación con pacientes con factores de riesgo:

Para establecer diferencias en la distribución de los espoligotipos entre los pacientes, se analizó el sexo, la edad y otras enfermedades como diabetes, VIH/SIDA.

6.8 Análisis de la georreferenciación:

Para el análisis de la correlación epidemiológica y de georreferenciación con la Genotipificación, se utilizó el software de información geoespacial ArcGIS® (versión 10.2), para identificar puntos críticos y formación de grupos, creamos mapas de los espoligotipos de tuberculosis. Estos mapas incorporaron la ubicación geográfica de cada paciente. Para mantener la confidencialidad no utilizamos la dirección exacta sino el domicilio entre calles de cada cuadra y el municipio de cada paciente. Construimos mapas que muestran la

distribución de todos los casos de tuberculosis en los municipios para identificar patrones de puntos espaciales. Para la estadística se agregaron pruebas de T-student y chi-cuadrada.

7. RESULTADOS

Se registraron durante todo el año 2019, un total de 1151 casos nuevos de tuberculosis pulmonar en el estado de Nuevo León, teniendo una proporción bien diferenciada en la población masculina con mayor prevalencia. En el año 2020, se registraron 140 casos nuevos (de enero a julio), teniendo un porcentaje del 58% en la prevalencia masculina contra un 42% en la población femenina (Figura 8); de las muestras obtenidas, se seleccionaron 151 cepas de forma aleatoria para hacer la genotipificación por espoligotipos, teniendo una proporción del 73% (110) para población masculina y del 27% (41) para la población femenina en personas infectadas por tuberculosis pulmonar (Figura 9).

Casos acumulativos de tuberculosis pulmonar en 2019

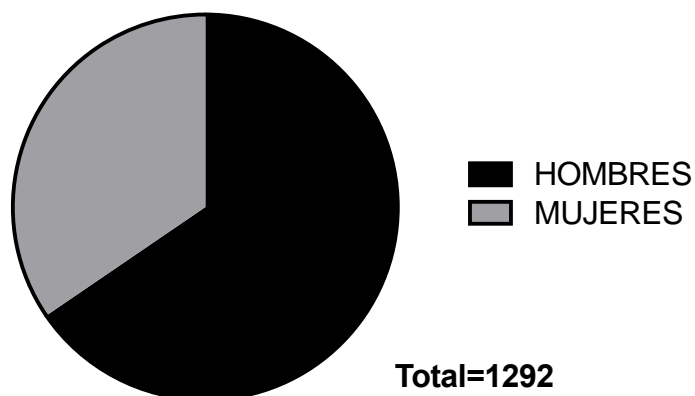
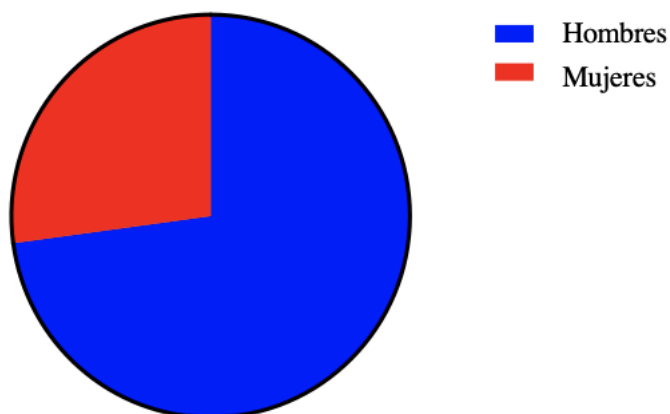


Figura 8. Casos acumulativos del año 2019- primer trimestre del 2020.



Total=151

Figura 9. Muestras de pacientes con tuberculosis genotificadas. De los cultivos obtenidos, se eligió un total de 151 muestras aleatoriamente para la realización de la genotipificación, donde 110 (73%) corresponden a varones y 41 (27%) muestras corresponden a mujeres.

La distribución de la población fue en hombres y mujeres mayores de dieciocho años, 110 casos fueron en hombres y 41 en mujeres, teniendo un promedio de casos en hombres y mujeres de los 40-44 años, como se muestra en la tabla 1A Pirámide poblacional y 1B de distribución por edad y género.

Tabla 1A. Pirámide poblacional

Pirámide poblacional. Casos de tuberculosis pulmonar por sexo y edad

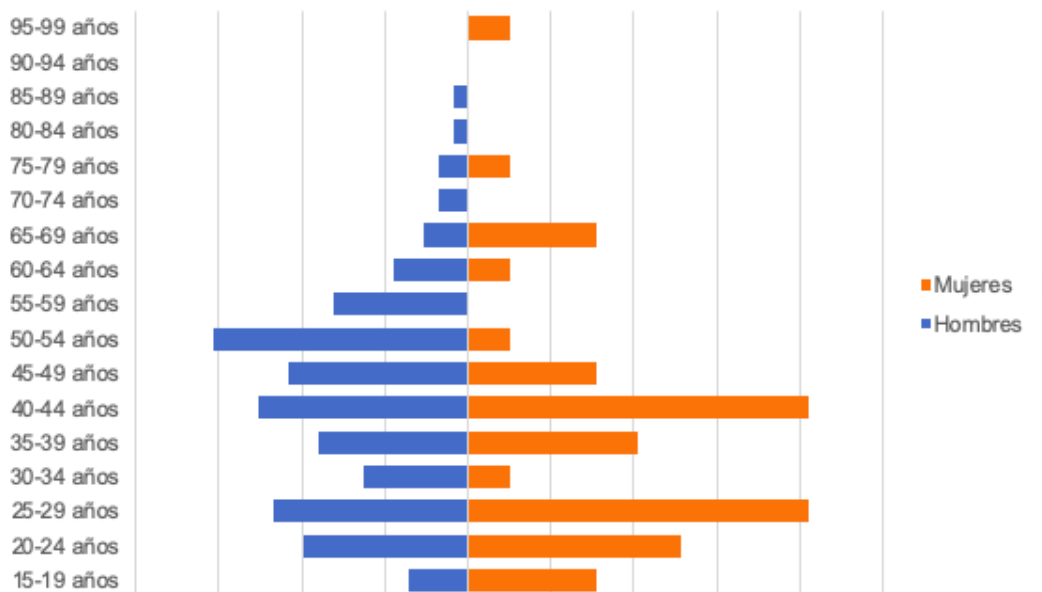


Tabla 1B. Distribución por edad y género

Población por edad	Ambos sexos	Hombres	Mujeres
	2019-2020	2019-2020	2019-2020
TOTAL	151	110	41
15-19 años	7	4	3
20-24 años	16	11	5
25-29 años	21	13	8
30-34 años	8	7	1
35-39 años	14	10	4
40-44 años	22	14	8
45-49 años	15	12	3
50-54 años	18	17	1
55-59 años	9	9	0
60-64 años	6	5	1
65-69 años	6	3	3
70-74 años	2	2	0
75-79 años	3	2	1
80-84 años	1	1	0
85-89 años	1	1	0
90-94 años	0	0	0
95-99 años	1	0	1

Un total de 151 (100%) aislados fueron recolectados, (Ver diagrama de flujo Figura 10) encontrando diecinueve sub-linajes, tomando como referencia la base de datos spolldb4 con número de tipo internacional *Spoligotyping* (SIT), ver patrones de espoligotipos (Figura 11) siendo los mas frecuentes T1 con 53 aislados, (35%) y X1 con 29 (19.2%) aislados respectivamente, seguido por el tipo LAM 1,2,4,5,9 con 15 (10.2%), H 1,3 con 5 (3.3%), MANILLA con 3 (2%), U con 4 (2.6%), X2 con 5 (3.3%), X3 con 4 (2.6%), S y T con 3 (2%) aislamientos. Además del sub-linaje BEIJING se encontraron 5 (3.3%) aislamientos y 15 (9.9%) cepas no se pudieron clasificar. Ver tabla 2 acerca de Identificación de espoligotipos con su número SIT (Figura 12) y la Tabla 3 acerca de la distribución de las familias de *Mycobacterium tuberculosis* por espoligotipos además de la figura 8, acerca de la diversidad genética de los 151 aislados clínicos obtenidos

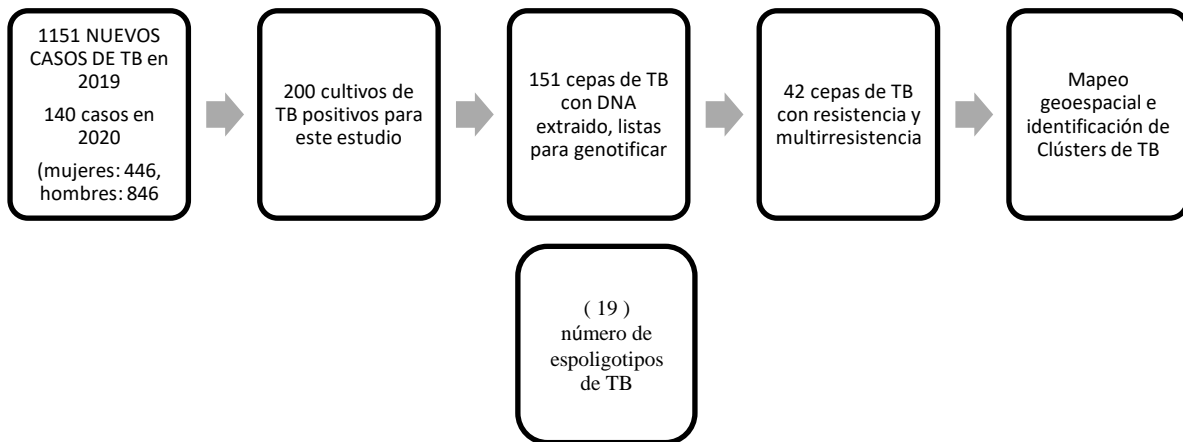


Figura 10. Diagrama de Flujo



Figura 11. Patrones de espoligotipos de las cepas aisladas. Los cuadros en negro representan la presencia de espaciadores y los puntos representan la ausencia de espaciadores. Los números a la izquierda de la figura son los números de grupo. Una vez identificados los espacios marcados, se hace el conteo mediante el código octal, donde el espacio marcado representa 1 y el espacio en blanco 0, leyendo de 3 en 3 y al final se toma la sumatoria para insertar los valores en la base de datos (SpolDB) y obtener la familia correspondiente a cada cepa. Si no se encuentra registrada se almacena como huérfana y se mantiene en ese estatus hasta acumular las suficientes para denotar una nueva variante o familia.

Diversidad genética de los espoligotipos de
Mycobacterium tuberculosis

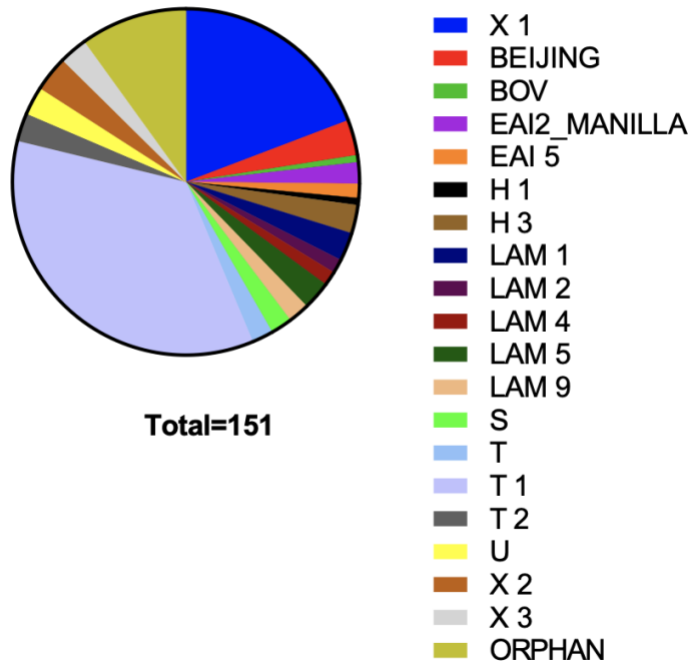


Figura 12. Diversidad genética de los aislados clínicos (151) obtenidos.

Para las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* genotipificadas, se les realizó la farmacorresistencia fenotípica por el método de Bactec 610 (Tabla 4); se estudió la resistencia a isoniacida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y pirazinamida. Los resultados arrojaron una resistencia de al menos a un antífmico del 17.2% (26 cepas), y una multifarmacorresistencia del 11.9% (18 cepas) donde al menos dos son resistentes. Se destaca la resistencia de 2 cepas a cinco antífmicos, siendo estas cepas agrupadas en una relación de SIREP-MDR-TB.

Tabla 4. Susceptibilidad a los antífmicos de primera línea

Susceptibilidad							
Aislado	STR	INH	RIF	EMB	PZA	Espoligotipo	Fármaco-resistencia
1	R	S	S	S	S	X1	DR
3	S	S	S	S	R	U	DR
11	R	R	S	S	S	T1	MDR
19	S	R	R	R	S	X1	MDR
24	R	S	S	S	S	T1	DR
25	S	R	S	S	S	H3	DR
26	R	R	R	S	S	T2	MDR
29	S	S	S	R	S	X2	DR
36	S	S	S	S	R	T1	DR
37	S	R	R	S	R	T1	MDR
38	R	R	R	S	R	X1	MDR
44	S	R	S	S	S	T1	DR
51	S	R	R	S	R	T1	MDR
54	R	S	S	S	R	LAM 5	MDR
55	S	S	S	R	S	X3	DR
71	R	S	S	S	S	T1	DR
73	S	S	S	S	R	EAI2_MANILLA	DR
75	R	S	S	S	S	T1	DR
80	S	R	R	S	R	S	MDR
86	S	R	S	S	S	T1	DR
92	R	R	S	S	R	X1	MDR
94	R	S	S	S	R	X1	MDR
95	R	S	S	S	S	T1	DR
100	R	R	R	S	R	X1	MDR
101	R	R	R	S	R	X1	MDR
102	R	S	S	S	S	X1	DR
103	R	S	S	S	S	X3	DR
112	R	S	S	S	S	EAI2_MANILLA	DR
113	R	R	R	R	S	T1	MDR
114	S	S	S	S	R	X1	DR
116	S	S	S	S	R	X2	DR
118	S	R	S	S	S	T1	DR
121	R	S	S	S	S	T1	DR
123	R	S	S	S	S	H3	DR
127	R	R	R	S	R	X1	MDR
128	R	S	S	S	S	X1	DR

131	R	S	S	S	S	H3	DR	
133	R	R	R	R	R	T1		MDR
135	R	R	R	R	R	T2-T3		MDR
136	S	R	R	R	R	LAM 5		MDR
140	S	R	S	S	S	ORPHAN	DR	
141	R	R	S	S	R	X1		MDR
146	R	S	S	S	S	X3	DR	
147	S	R	R	S	R	X1		MDR
148	S	R	S	S	S	T1	DR	
151	R	R	R	S	R	BEIJING		MDR
	27	24	15	7	21	46	26	20
						Cepas sensibles	105	
						Total	151	

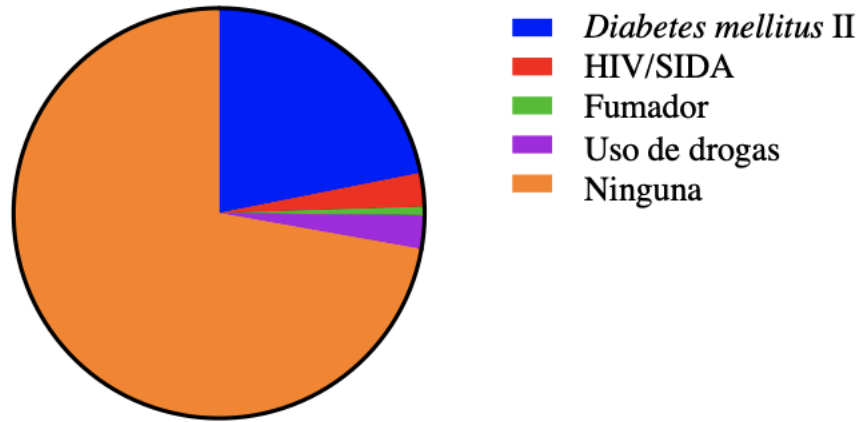
STR: estreptomina, INH: isoniacida, RIF: rifampicina, EMB: etambutol, PZA: pirazinamida

R: farmaco-resistencia; S: farmaco-sensible

DR: Farmaco-resistente; MDR: multifarmaco-resistente

Así mismo, dentro de los factores de riesgo asociados con la tuberculosis pulmonar (Figura 14); tenemos que, de las 151 personas, el 21.2% tiene *Diabetes mellitus* tipo II, un número importante en la asociación con el desarrollo de dicha enfermedad (32 pacientes). En cuanto al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tenemos una población del 2.6% (4 personas), un número bajo de acuerdo con distintos estudios sugeridos donde existe una alta correlación en el desarrollo de tuberculosis pulmonar activa y VIH (figura 13); sin embargo, no se tienen los reportes si el paciente ya presenta el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o bien que ya se encuentre en tratamiento con TARAA. El 75% restante de los pacientes, no cuentan con estos factores de riesgo, sin embargo, se consideran los factores como Enfermedad obstructiva crónica (EPOC), fumadores, desnutrición y el uso de drogas por vía parenteral o bien inhaladas mostrados en la tabla 5.

Factores de riesgo de los pacientes con TB



Total=151

Figura 13. Factores de riesgo de los pacientes con tuberculosis pulmonar.

Los principales factores de riesgo considerados son *Diabetes mellitus II* y coinfección con VIH. Se observa que 32 (22%) personas padecen *Diabetes mellitus II* y 4(2.6%) personas presentan VIH.

Tabla 5. Información epidemiológica y factores de riesgo

	H	(%)	M	(%)	Total (%)
DM	24	15.89	8	5.3	21.2
HIV	3	1.99	1	0.66	2.64
Drogas	4	2.63	0	0	2.64
cigarro	2	1.32	0	0	1.32
Ninguna	77	50.9	32	21.2	72.18
Total	110	72.84	41	27.15	100

7.1 Distribución de casos por geolocalización

La geolocalización, es una herramienta muy utilizada en distintas áreas de investigación, en ecología, en dinámicas de poblaciones, migraciones, entre otras; donde ayudan a poder inferir en comportamientos y modelos biológicos para toma de decisiones. En los últimos años, el uso de estos sistemas en epidemiología y salud, han servido para poder obtener información

en la dinámica de enfermedades; principalmente infecto- contagiosas y poder tener respuestas o realizar métodos de prevención o corrección.

En la identificación geoespacial de las personas diagnosticadas por tuberculosis en el área metropolitana, observamos que existe una distribución aleatoria de los distintos municipios que la componen, teniendo principalmente un número importante de casos en el municipio de Monterrey con 36, seguido de Apodaca con 30, el municipio de Juárez con 28, Guadalupe con 24, Escobedo con 6, San Nicolás con 4, Cadereyta 5, Pesquería con 3 y García con 2 (Figura 15). Dentro de la distribución se tiene el apartado de otros, donde se obtuvieron cepas de municipios concordantes pero que no entran en la definición de área metropolitana como Abasolo, Sabinas, Santiago, Montemorelos; sin embargo, es importante su identificación genotípica para observar si las cepas corresponden a algunas de las que se encuentran circulantes en el área metropolitana de Nuevo León.

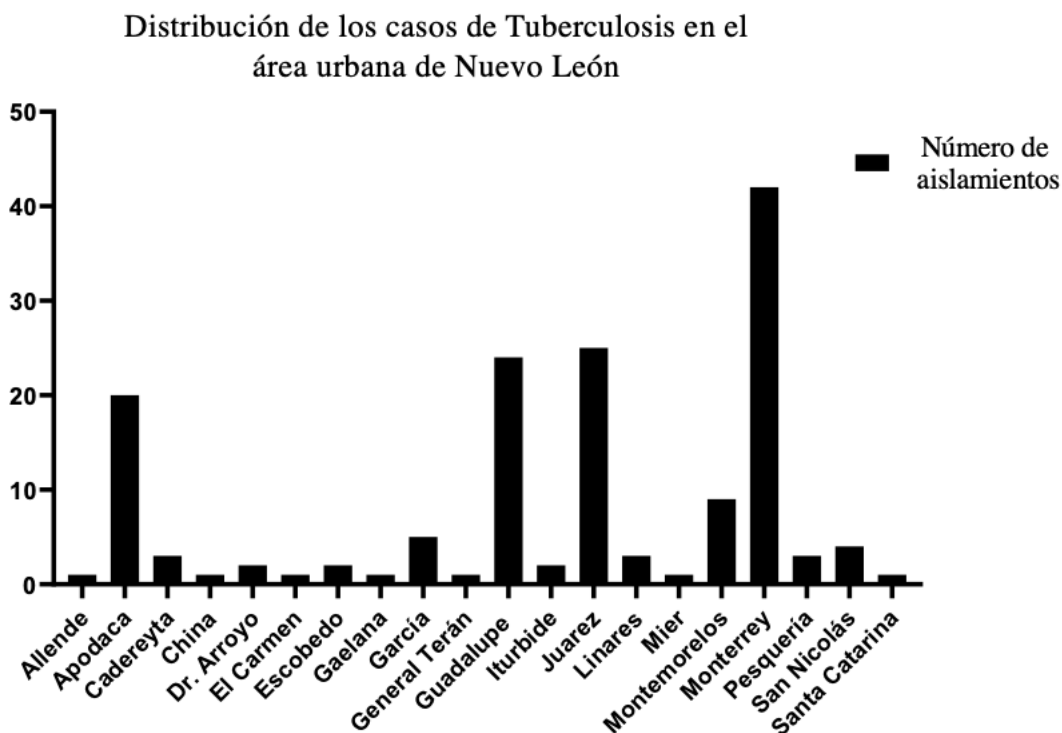


Figura 14. Distribución de casos de tuberculosis en el área urbana de Nuevo León. Las muestras que se seleccionaron para su genotipificación se distribuyen aleatoriamente en el área metropolitana, donde el municipio de Monterrey es el que presenta una mayor incidencia (24%), seguido del municipio de Apodaca (20%) y Juárez (19%), Guadalupe con (16%), Escobedo con (4%), San Nicolás con (2.7%), Cadereyta (3.34%), Pesquería con (2%) y García con (1.33%). Se consideró el apartado de otros (8%), municipios que se encuentran fuera del área metropolitana.

Utilizando el software de información geoespacial ArcGIS, podemos ubicar los casos y crear un mapa de información (Figura 16, 17 y 18) identificando cuales familias son las circulantes en el área urbana, observando la formación de 19 clústeres debido al tipo de número SIT de cada cepa identificada. Se observó una alta incidencia en el municipio de Monterrey, siendo el área con mayor densidad poblacional del estado; siendo el principal municipio con el mayor número de aislamientos, seguidos por el municipio de Apodaca y Juárez. Ver (Figura 19) la distribución por espigotipos de acuerdo al área metropolitana de Monterrey

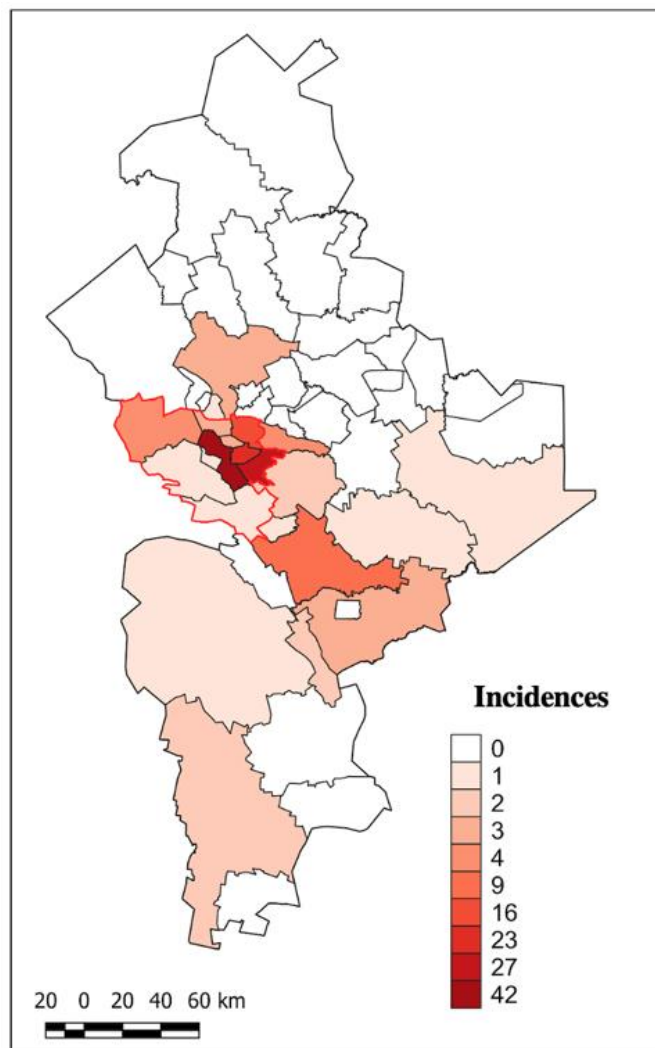


Figura 15. Incidencias de casos en los municipios del área urbana de Nuevo León.

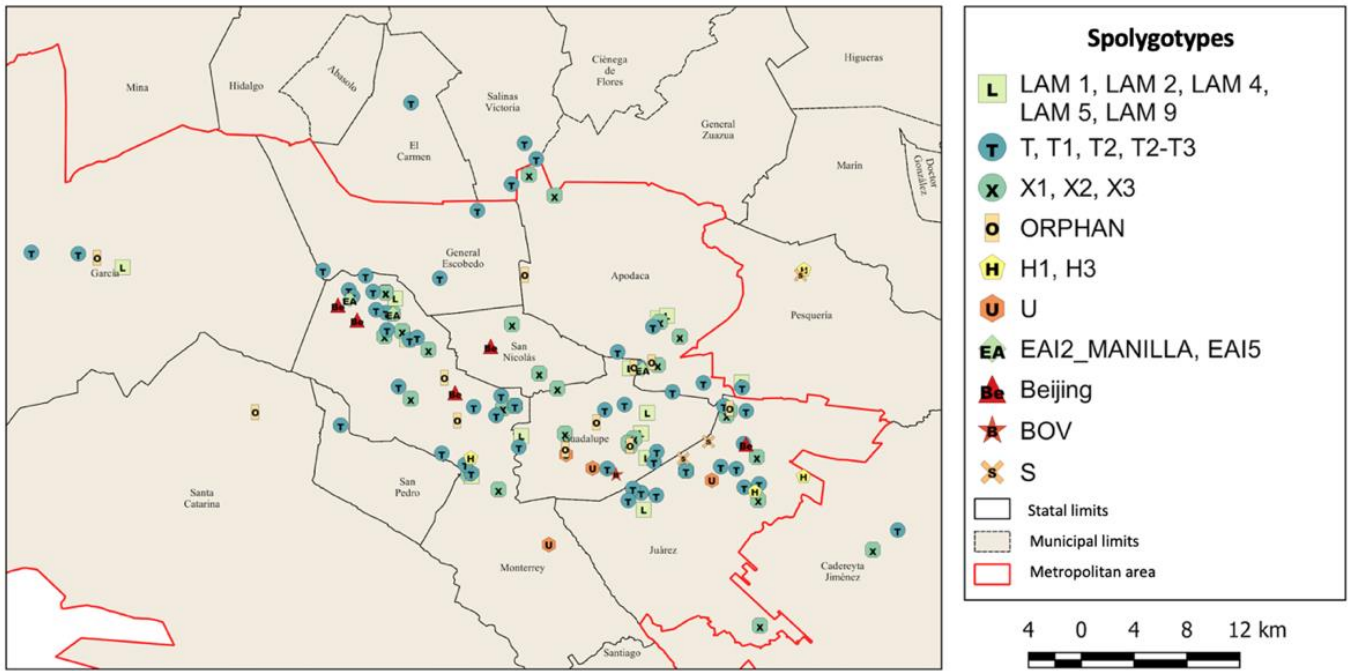


Figura 16. Espoliotipos identificados en el área Metropolitana de Monterrey.

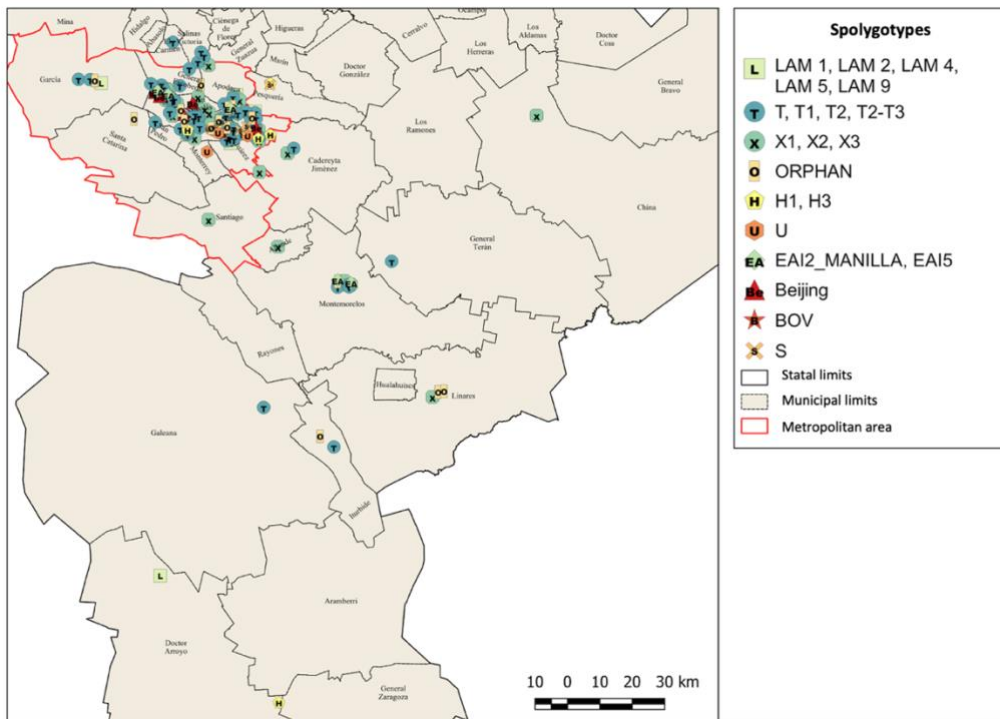


Figura 17. Espoliotipos identificados en el área urbana del estado de Nuevo León

7.2 Presencia de sitios de riesgo o *hot spots*

El espigotipo T1 tuvo el mayor número de incidencias en el área metropolitana, con 54 aislamientos. La mayoría de ellos se ubicaron cerca de los límites fronterizos de los municipios de Guadalupe y Juárez. Estos datos sugieren un punto crítico de transmisión de tuberculosis dentro del área metropolitana (figura 19).

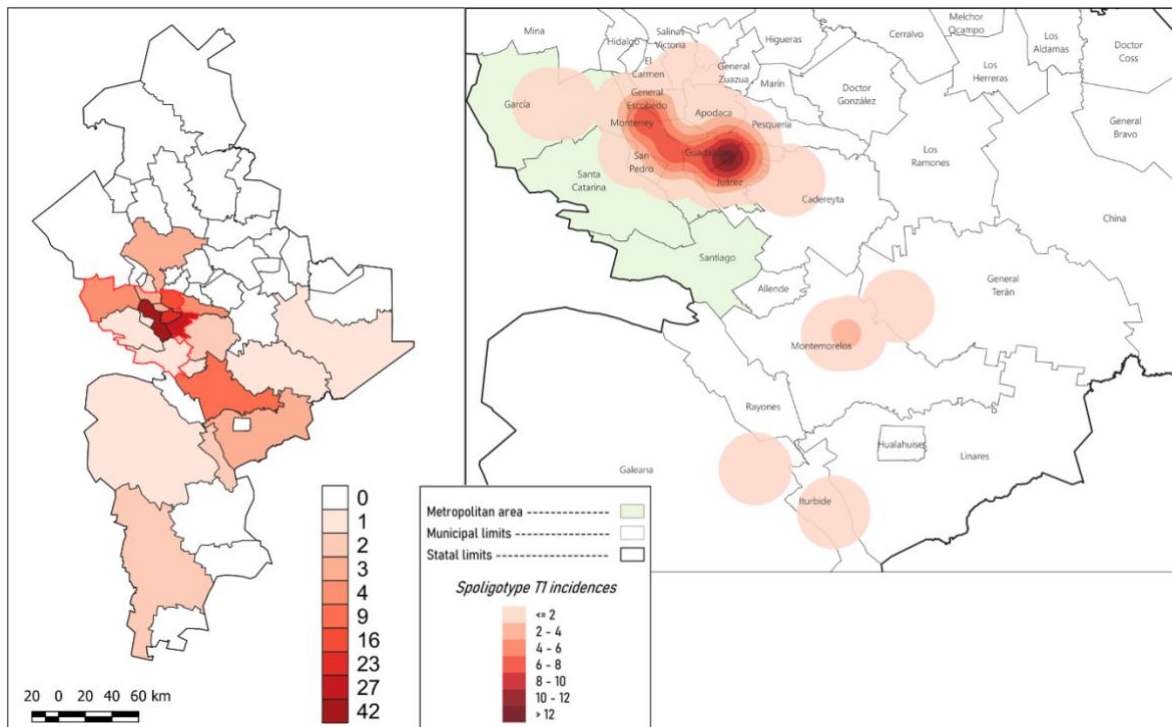


Figura 18. Incidencia del espigotipo T1 identificados en el área urbana del estado de Nuevo León

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio abordamos la situación actual de Tuberculosis en el área urbana del Estado de Nuevo León haciendo hincapié en la zona metropolitana de Monterrey debido a la alta densidad poblacional. Cada año la Secretaria de Salud estatal reporta más de 1000 casos nuevos (Salud, s. f.), una estadística muy importante para un estado con alta actividad económica y de población. El área metropolitana de Monterrey se considera como la tercera más importante del país por su alta población, gran movilidad y su aporte económico (*Censo de Población y Vivienda 2020*, s. f.), por otro lado, es una de las principales zonas con personas infectadas con tuberculosis con números superiores a la media nacional. Dentro del contexto social y cultural, es importante mencionar que el estado de Nuevo León debido a su ubicación geográfica es un punto estratégico para el tránsito de migrantes que buscan llegar a Estados Unidos o a estados fronterizos cercanos con el fin de cruzar la frontera, lo que representa una parte importante de la migración en tránsito. Asimismo, de acuerdo con datos oficiales, se destaca que en el estado hay una alta presencia de extranjeros con intenciones de establecerse de manera temporal o permanente. A nivel nacional, ocupa una de las diez primeras posiciones en cuanto a la concentración de población nacida en otros países, cifra que ha mostrado un aumento significativo a lo largo de los años. En el Censo de Población y Vivienda del año 2000 realizado por el INEGI, se reportaron cerca de 19,000 personas extranjeras, cifra que ascendió a 49,500 en el Censo del año 2020 (*Censo de Población y Vivienda 2020*, s. f.). Según datos de este último censo, casi la mitad de la población extranjera proviene de Estados Unidos (46.9%), con menores proporciones de residentes originarios de Sudamérica, como Venezuela (12.1%) y Honduras (9.0%); donde los principales municipios de residencia de la población extranjera en el estado son Monterrey

(que alberga al 28.4% de los extranjeros), Apodaca (9.5%), Guadalupe (8.6%), San Pedro Garza García (6.9%) y García (6.5%). Por otro lado, la información de la Unidad de Política Migratoria, Registro e Identidad de Personas (UPMRIP, 2021) indica que, de las 2,674 Tarjetas de Residente Temporal (TRT) emitidas en 2021, la mayor proporción se otorgó a ciudadanos de Corea del Sur (16%), Colombia (11%), Venezuela (9%), Honduras (6%) y Brasil (5%). Con lo anterior, podemos destacar la presencia de distintos linajes y de cada uno, sus distintos clados de *Mycobacterium tuberculosis*, encontrados en nuestro estudio. Por ejemplo, en el Linaje 4 (Euro-American), encontramos los clados LAM, incluyendo las familias LAM1, LAM2, LAM4, LAM5 Y LAM9, el clado Haarlem, con las familias H1, H3; el clado T, que incluyó las familias T1 y T2; el clado X, que incluye las familias X1, X2 y X3; el clado S y el clado Uganda. La presencia de este clado está bien distribuida en el continente americano, figurando países como Brasil (Salvato et al., 2019), Venezuela (Vinueza & Arias, 2021), Honduras (Vinueza & Arias, 2021) y mencionando que dicha presencia se asocia con los movimientos migratorios entre países de latinoamérica (Cabezas-Vinueza, 2019). El encontrar clados de esta familia en ciudades fronterizas, donde los fenómenos migratorios son mucho más frecuentes y tienen un papel importante en la epidemiología de la tuberculosis en la región (Flores-López et al., 2017) sugiere que hay coincidencia con el tipo de población extranjera llegada al estado de Nuevo León proveniente de Sudamérica. Encontramos también el clado del linaje 1 (Indo-Oceanic) EAI, siendo las familias EAI2_Manila y EAI5. Asimismo, identificamos cepas de la familia Beijing que corresponde con el Linaje 2. La presencia de estos sublinajes se correlaciona con el movimiento de personas de la región asiática (Vinueza & Arias, 2021), considerando que se identificó un nuevo flujo que antes no había estado presente de personas originarias de Corea del Sur, quienes arribaron al estado de Nuevo León como parte de la migración laboral a la

industria (Hernández, 2018), sugiere que estos movimientos migratorios expliquen la presencia de estos clados. El tener el número más alto de aislados de linaje 4 y la presencia del linaje 2, se explica debido a que los linajes 2 y 4 son más transmisibles que otros linajes y sus sublinajes están predispuestos a la adaptabilidad a poblaciones huésped específicas; así, su evolución les ha permitido distribuirse a nivel mundial (Zhang et al., 2019). Estos linajes están ampliamente dispersos tanto en áreas rurales como urbanas, donde factores como la contaminación del aire, el tabaquismo, la desnutrición, la densidad de población, las condiciones de vida hacinadas, la incidencia del VIH y la movilidad entre los migrantes aumentan la transmisión y distribución de la tuberculosis (Esteves et al., 2018). Por último, no tuvimos presencia de cepas que pertenezcan a los linajes 3 (India and East Africa), linaje 5 (West African-1) y linaje 6 (West African-2), donde su circulación predomina en el continente africano. No se encontraron datos de migrantes provenientes de aquel continente al estado De Nuevo León, pero se ha observado que los sublinajes de los linajes 1, 3, 5 y 6 tienen una baja tasa de mutación, lo que se correlaciona con su baja transmisibilidad y adaptabilidad en la población; así mismo, al tener una baja prevalencia en el continente americano, no es posible determinar su nivel específico de influencia en un área poblacional, sólo si existieran brotes complejos y nuevas rutas de infección (Curry et al., 2022), (Garzón-Chávez et al., 2020). El último estudio realizado en el estado (Molina-Torres et al., 2010), menciona la presencia de 4 distintos sublinajes y una sola cepa de tipo Beijing, observando que existe una amplia diferencia en el número de familias presentes (66% más variabilidad), así como el número de grupos obtenidos; inclusive con un número menor de cepas utilizadas (151 en comparación con 180 cepas). Estos resultados reflejan la gran movilidad que se ha obtenido de la población en estos últimos diez años.

SIT53 fue el espoligotipo más frecuente en nuestro estudio de los aislados en pacientes diagnosticados por primera vez; donde se encontró ser más frecuente en el noreste de México. (Vera-Cabrera et al., 2014). Se ha encontrado SIT 53 también en otros estados del país, en cepas con alto grado de variabilidad genética y de MDR (Martinez-Guarneros et al., 2013), (López-Rocha et al., 2013). SIT 53 y ST50 (Haarlem 3) también fue el más encontrado en Madrid España (Gagneux, 2013). Por otro lado; se lograron aislar 5 cepas del linaje Beijing (SIT1), este tipo es más común en el este de Asia, así como también se encuentra de forma endémica en China y Mongolia, ha causado brotes en New York y otros países del mundo, esta familia está relacionada con una mayor hipervirulencia, alta capacidad de replicación, resistencia a los antibióticos, presencia de brotes a nivel mundial así como en modelos murinos presentar una elevada mortalidad (Cerezo-Cortés et al., 2019). Las cepas Beijing pueden caracterizarse por técnicas moleculares como espoligotipificación, y fácilmente la podemos distinguir ya que en el film de los espoligotipos obtenido después de realizar esta metodología, se reconoce porque carece de los espaciadores 1 a 34 (la delección llamada RD 207). Así mismo, contienen un gen intacto *pks15/1*, que codifica para una poliketido sintasa asociada a la virulencia, y una delección de la región genómica RD105; en conjunto, estas características definen a la familia Beijing y las distingue de otras *M. tuberculosis* (Catana-Botello et al., s. f.). El genotipo Beijing se ha distribuido a todo el mundo y en México también ha sido reportado, en estados donde hay una alta transmisibilidad de la enfermedad, como Veracruz (Blanco-Guillot et al., 2018), Tamaulipas (Curry et al., 2022), y Baja California (Flores-López et al., 2017). Así mismo, en Nuevo León (Becerril-Montes et al., 2013). La aparición de cepas farmacorresistentes, multifarmacorresistente y extremadamente resistentes, ha sido un enorme problema en la salud pública, pues eso merma las esperanzas de erradicar pronto a esta enfermedad. Nuestros resultados mostraron que el sub linaje X1 es

el linaje más fuertemente asociado con el fenotipo de resistencia a los antibióticos. De manera similar, el sub linaje X3 está fuertemente asociado con la TB-MDR (Munro-Rojas et al., 2018). Es importante destacar que el 62.06 % de las cepas X1 identificadas son resistentes a los antifímicos y constituyen el segundo grupo más grande de los aislados, por lo que la presencia en el estado está relacionada con una alta capacidad de propagación y esto pueda ocasionar un aumento en los casos de TB en la población. Es necesario tomar medidas adecuadas para controlarlo. Además, se debe analizar un mayor número de muestras para determinar la importancia de estas cepas en la región. Sin embargo, encontramos que 46 de 151 cepas eran resistentes a uno o más fármacos. Becerril et al., informaron una alta prevalencia de TB-MDR entre los casos previamente tratados en Monterrey (Catana-Botello et al., s. f.). Encontramos cepas de TB-MDR en pacientes diagnosticados por primera vez, lo que puede indicar la transmisión de cepas resistentes a la población sin previo tratamiento contra la tuberculosis. La detección de cepas resistentes a los medicamentos y la localización de esos casos mediante los sistemas de información geoespacial (GIS) puede explicar la propagación de esas cepas con la posible formación de focos locales o zonas de riesgo; lo que aumenta el riesgo de transmisión (Tiwari et al., 2006), (Manjourides et al., 2012), (Theron et al., 2015), (Poojar et al., 2020). Comparado con los estudios anteriores, solamente Poojar, et al (2020), pudo determinar esa agregación espacio temporal, ya que su estudio tuvo ventajas en comparación con los otros reportados, pudiendo realizar una geolocalización exhaustiva para todos los casos notificados durante el período del estudio, todas las direcciones fueron tomadas y rastreadas, eliminando así cualquier sesgo de selección debido a la falta de información en los registros de rutina; además, la geolocalización de los pacientes con DR-TB redujo el sesgo de agregación en la construcción de los mapas de calor permitiendo su creación basándose en la ocurrencia de eventos específicos (lugar y tiempo

determinado). Por último, el tamaño de la muestra fue adecuado para llevar a cabo su análisis de heterogeneidad espacial y análisis espaciotemporal. Una heterogeneidad espacial similar fue observada; la distribución geoespacial de las familias de cepas de Tuberculosis, así como la presencia de cepas fármaco y multifarmacorresistentes se distribuyen aleatoriamente en la población estudiada, observando distintos tipos de familias en cada municipio del área metropolitana. Los GIS son herramientas muy útiles para crear mapas que visualicen la distribución geográfica de los casos de tuberculosis con el fin de analizar la distribución y transmisión de *M. tuberculosis* en una región específica (Moonan et al., 2004). La asociación de información de los espoligotipos complementado con los GIS nos permite rastrear la propagación de cepas específicas en la comunidad y comprender su dinámica de transmisión (Tulu & Ameni, 2018). Mediante el uso de GIS geolocalizamos los índices más altos de casos de TB dentro del municipio de Monterrey (la ciudad más poblada del estado). Se informaron resultados similares en otras ciudades de México con grandes poblaciones, mencionados anteriormente. Por otro lado, es importante mencionar que el espoligotipo T1 presenta el mayor número de incidencias en el área metropolitana, específicamente en los municipios de Guadalupe, Juárez y Monterrey, lo que sugiere una zona de formación de puntos calientes (*hot spots*). Esto sugiere un área para la formación de estos puntos de alta transmisión en los límites de Guadalupe y Juárez. Los “*hot spots*” de tuberculosis sirven como “nodos” de transmisión de tuberculosis tanto internamente como entre otros municipios (Brooks et al., 2022). Debido al número de muestras y tiempo en el desarrollo de nuestro estudio, una de las limitantes para confirmar la formación de estos hot spots son: la interpretación para poder detectar la formación de clusters con bajas tasas de notificaciones de casos de tuberculosis, el número de cepas y el tiempo en un corto plazo (menos de un año) analizado, así como el método de análisis espacial elegido (en este caso fue con el software arcGis); lo anterior,

complica la obtención de datos precisos y representativos. En otros estudios, se han empleado algunos métodos para la identificación espacial y la formación de hot spots como el método Kernel de análisis de densidad basado en la ubicación de los casos diagnósticos de tuberculosis que puede diferenciar entre regiones con un gran número de casos de tuberculosis identificados y aquellas con alta densidad de enfermedad; este método se ha empleado en estudios con más de 2000-5000 pacientes y con una distribución plana (distribución normal) (Manjourides et al., 2012). Un número de muestras más alto nos hubiese permitido poder emplear ese método para tener resultados estadísticamente significativos. Alternativamente, en otro estudio, Zelner utilizó un enfoque de mapeo no paramétrico basado en distancias (DBM) para construir mapas de hot spots. La DBM es menos sensible a los patrones espaciales asimétricos de casos y controles que la estimación de la densidad de Kernel, lo que proporciona una alternativa atractiva para detectar áreas de alto riesgo en comunidades reales (Zelner et al., 2016), ellos lo emplearon debido a la alta tasa de enfermedad en la ubicación estudiada. El método DBM puede ser una alternativa para la detección de *hot spots* cuando se tiene una vigilancia de mayor tiempo con resultados distintivos como cepas resistentes y no resistentes y observar el aumento o descenso de los casos en un lugar determinado. En nuestro estudio, el tiempo llevado para el análisis complica su aplicación, pues Zelner lo empleó en un estudio de cohortes de 3 años con una n de más de mil cepas identificadas. Finalmente, aunque encontramos un posible punto crítico, puede que no refleje la transmisión real de tuberculosis, ya que es importante mencionar que utilizamos coordenadas cercanas a las direcciones residenciales reales, que proporcionan las colonias aproximadas; además, se debe considerar que la transmisión podría haber ocurrido en otras áreas donde los pacientes trabajan, se desplazan o socializan. Las técnicas geoespaciales pueden aplicarse para identificar la variabilidad espacial de las tasas de casos

reportados de TB, lo que puede proporcionar información crítica para la planificación de programas. Se desconoce si la heterogeneidad observada en las tasas de casos reportados de TB se debe a diferencias subyacentes en la carga de la enfermedad o a barreras para acceder a los servicios de diagnóstico de TB. En futuros análisis, combinar información geográfica y genética con modelos dinámicos que puedan resaltar la heterogeneidad a nivel individual en la transmisión de la tuberculosis será esencial (Ypma et al., 2013). Además, son necesarios estudios adicionales de análisis geográficos y modelado matemático para evaluar el potencial de tales estrategias para reducir la transmisión, tanto dentro como fuera de estas áreas de puntos calientes. Con respecto a la comorbilidad de los aislados de pacientes con TB-VIH en el estudio fue de 5% (n=8), esto representa un porcentaje menor con respecto a la comorbilidad reportada por la OMS durante el año 2020 de 7.6% (n=760,000). En el grupo de aislados de TB de la investigación, el porcentaje de comorbilidad de diabetes y TB fue de 20% (n=30), casi 7 veces el valor reportado por la OMS. La población del estado de Nuevo León, de acuerdo con la secretaria de Salud y estudios sobre obesidad y diabetes, ocupa los primeros lugares con esta comorbilidad (secretaria de Salud, 2023), esto es un claro indicativo de porque las medias nacionales reportadas se encuentran por debajo de lo encontrado con este estudio.

A pesar de los esfuerzos que se realiza en el área de la salud la tuberculosis es y sigue siendo considerada como un serio problema de salud pública, agravada por la pandemia de la COVID-19, ya que se han acaparado los recursos económicos y de investigación en atender a los problemas de la infección por SARS-CoV-2, por al menos los últimos tres años causado un retraso en los planes para atender a la tuberculosis en cuanto a la obtención de diagnóstico, a la interrupción del tratamiento y la no supervisión estricta del tratamiento. Sabemos que

ambas enfermedades tienen en común de que son entidades clínicas que se transmiten por aerosoles, los síntomas son muy semejantes y coexisten en estos tiempos, pero se debe de garantizar la prestación de servicios de la salud, prevención, diagnóstico, tratamiento y atención de la tuberculosis junto con la respuesta a la COVID-19. La Estrategia para poner el fin a esta enfermedad, tiene como principal objetivo poner fin a la epidemia mundial de tuberculosis, reduciendo el número de muertes en un 95%, reducir la tasa de incidencia en un 90% entre los años 2015 al 2035, y tratar de conseguir que ninguna familia enfrente costos elevados debidos a esta enfermedad. Por último, quizás las principales limitaciones de este estudio fueron el número limitado de aislamientos y la falta de uso de otros métodos genotípicos, como el “número variable-repetitivo en tándem variable para Mycobacterium (MIRU-VNTR), la falta de conocimiento de la residencia natural de los pacientes y datos de seguimiento. Esto último sería complicado ya que estos pacientes fueron diagnosticados recientemente. En general, los GIS pueden proporcionar información valiosa sobre la distribución y transmisión de la tuberculosis, así como guiar el desarrollo y la implementación de programas eficaces de control de la tuberculosis. Se requieren más estudios para comprender mejor la dinámica de la circulación de la tuberculosis en México. La implementación de métodos de vigilancia molecular más robustos es clave para el adecuado seguimiento de los linajes, su introducción en el área y el desarrollo de farmacorresistencia. Este estudio reveló la diversidad de genotipos y cepas resistentes a medicamentos que circulan actualmente en el Estado de Nuevo León, México y representa una actualización de más de diez años de datos sobre la vigilancia de esta enfermedad.

9. CONCLUSIONES

1. Existe una alta diversidad genética de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulando en el área urbana de Nuevo León; siendo el sublinaje T1 (SIT53) el más predominante, seguido por el sublinaje X1.
2. Se identificaron 5 cepas del sublinaje Beijing (3.3%), todas siendo sensibles a los antifímicos de primera línea, excepto una cepa que presentó multirresistencia.
3. Se tiene una prevalencia de casos positivos de tuberculosis pulmonar en hombres cercana a 3-1 con respecto a mujeres y una media de 40-44 años para ambos sexos.
4. El porcentaje de personas con tuberculosis y comorbilidad con *Diabetes mellitus* fue de 20%(n=30) es superior a la media nacional; así mismo, es mayor que los coinfectados con VIH con un 2% (n=4).
5. La resistencia fenotípica contra la primer línea de antifímicos se observe en 42 aislamientos (41%); así como la resistencia al menos a un antibiotico fue detectada en 36 aislamientos (27%); la resistencia a estreptomycin fue la de mayor prevalencia con 41 aislamientos (27%), seguido por isoniazina con 27 (17.8%), pirazinamida 23 (15.2%), rifampicina 16 (10.6%) y etambutol con 14 (9.7%) aislamientos.
6. El municipio de Monterrey fue el que presentó el mayor número de casos con 42, seguido por Juárez con 25, Guadalupe con 24 y Apodaca con 20. Se contempló el municipio de Montemorelos por presentar 10 casos.
7. No hay una correlación significativa entre el tipo de cepa y la asociación a un municipio o comorbilidad.

10. PERSPECTIVAS

El siguiente trabajo tiene como prespectivas:

- **Es posible el uso de métodos estadísticos más robustos para observar la formación de cluster en un lugar y tiempo determinado para ver la dinámica de contagio en una población en tiempo real.**
- **Modelos matemáticos para predecir el comportamiento de los tipos de cepa y su capacidad de contagio.**
- **Análizar de las cepas obtenidas su virulencia in vitro**
- **Observar como responde la respuesta inmune innata ante los estímulos de las distintas cepas encontradas en experimentos in vitro.**

11. LITERATURA CONSULTADA

- Altare, F., Jouanguy, E., Lamhamedi, S., Döffinger, R., Fischer, A., & Casanova, J.-L. (1998). Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Current Opinion in Immunology*, 10(4), 413-417. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80114-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80114-3)
- Angus, D. C., Yang, L., Kong, L., Kellum, J. A., Delude, R. L., Tracey, K. J., Weissfeld, L., & Investigators, for the G. (2007). Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis*. *Critical Care Medicine*, 35(4), 1061. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000259534.68873.2A>
- Arráiz, N., Bermúdez, V., & Urdaneta, B. (2005). Resistencia a drogas en M. Tuberculosis: Bases moleculares. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 24(1), 23-31. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0798-02642005000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Asselineau, C., Asselineau, J., Lanéelle, G., & Lanéelle, M.-A. (2002). The biosynthesis of mycolic acids by Mycobacteria: Current and alternative hypotheses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 501-523. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00008-5](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00008-5)
- Becerril-Montes, P., Said-Fernández, S., Luna-Herrera, J., Caballero-Olín, G., Enciso-Moreno, J. A., Martínez-Rodríguez, H. G., Padilla-Rivas, G., Nancy-Garza-Treviño, E., & Molina-Salinas, G. M. (2013). A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 160-166. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013006>
- Blanco-Guillot, F., Castañeda-Cediel, M. L., Cruz-Hervert, P., Ferreyra-Reyes, L., Delgado-

- Sánchez, G., Ferreira-Guerrero, E., Montero-Campos, R., Bobadilla-del-Valle, M., Martínez-Gamboa, R. A., Torres-González, P., Téllez-Vazquez, N., Canizales-Quintero, S., Yanes-Lane, M., Mongua-Rodríguez, N., Ponce-de-León, A., Sifuentes-Osornio, J., & García-García, L. (2018). Genotyping and spatial analysis of pulmonary tuberculosis and diabetes cases in the state of Veracruz, Mexico. *PLOS ONE*, *13*(3), e0193911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193911>
- Brooks, M. B., Millones, A. K., Puma, D., Contreras, C., Jimenez, J., Tzelios, C., Jenkins, H. E., Yuen, C. M., Keshavjee, S., Lecca, L., & Becerra, M. C. (2022). Mapping local hot spots with routine tuberculosis data: A pragmatic approach to identify spatial variability. *PLOS ONE*, *17*(3), e0265826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265826>
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3684-3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>
- Bustamante-Montes, L. P., Escobar-Mesa, A., Borja-Aburto, V. H., Gómez-Muñoz, A., & Becerra-Posada, F. (2000). Predictors of death from pulmonary tuberculosis: The case of Veracruz, Mexico. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, *4*(3), 208-215.
- Cáceres, G., Calderon, R., & Ugarte-Gil, C. (2022). Tuberculosis and comorbidities: Treatment challenges in patients with comorbid diabetes mellitus and depression. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, *9*, 20499361221095831.

<https://doi.org/10.1177/20499361221095831>

Catana-Botello, N., Becerril-Montes, P., Castro-Garza, J., González-Salazar, F., Almanza-Reyes, H., Del Bosque-Moncayo, M. D. L. Á., Morales-Vargas, A., & Velázquez-Moreno, V. M. (s. f.). Mycobacterium tuberculosis Beijing in the State of Nuevo Leon, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.12.007>

Censo de Población y Vivienda 2020. (s. f.). Recuperado 15 de agosto de 2024, de <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/>

Cerezo-Cortés, M. I., Rodríguez-Castillo, J. G., Hernández-Pando, R., & Murcia, M. I. (2019). Circulation of M. tuberculosis Beijing genotype in Latin America and the Caribbean. *Pathogens and Global Health*, 113(8), 336-351.
<https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1710066>

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., ... Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537-544. <https://doi.org/10.1038/31159>

Corbett, E. L., Watt, C. J., Walker, N., Maher, D., Williams, B. G., Raviglione, M. C., & Dye, C. (2003). The Growing Burden of Tuberculosis: Global Trends and Interactions With the HIV Epidemic. *Archives of Internal Medicine*, 163(9), 1009-1021.
<https://doi.org/10.1001/archinte.163.9.1009>

Curry, J. S., Abdelbary, B., García-Viveros, M., Garcia, J. I., Yotebieng, M., Rendon, A., Torrelles, J. B., & Restrepo, B. I. (2022). South to North Migration Patterns of Tuberculosis Patients Diagnosed in the Mexican Border with Texas. *Journal of*

- Immigrant and Minority Health*, 24(5), 1113-1121. <https://doi.org/10.1007/s10903-021-01294-5>
- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11), 1862-1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>
- Driscoll, J. R. (2009). Spoligotyping for molecular epidemiology of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 551, 117-128. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_10
- Escombe, A. R., Oeser, C. C., Gilman, R. H., Navincopa, M., Ticona, E., Pan, W., Martínez, C., Chacaltana, J., Rodríguez, R., Moore, D. A. J., Friedland, J. S., & Evans, C. A. (2007). Natural ventilation for the prevention of airborne contagion. *PLoS Medicine*, 4(2), e68. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040068>
- Esteves, L. S., Dalla Costa, E. R., Vasconcellos, S. E. G., Vargas, A., Ferreira Junior, S. L. M., Halon, M. L., Ribeiro, M. O., Rodenbusch, R., Gomes, H. M., Suffys, P. N., & Rossetti, M. L. R. (2018). Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid monoresistant and multidrug-resistant in Rio Grande do Sul, a tuberculosis high-burden state in Brazil. *Tuberculosis*, 110, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.02.009>
- Fieschi, C., Dupuis, S., Catherinot, E., Feinberg, J., Bustamante, J., Breiman, A., Altare, F., Baretto, R., Le Deist, F., Kayal, S., Koch, H., Richter, D., Brezina, M., Aksu, G., Wood, P., Al-Jumaah, S., Raspall, M., da Silva Duarte, A. J., Tuerlinckx, D., ... Casanova, J.-L. (2003). Low Penetrance, Broad Resistance, and Favorable Outcome of Interleukin 12 Receptor β 1 Deficiency: Medical and Immunological Implications. *Journal of Experimental Medicine*, 197(4), 527-535. <https://doi.org/10.1084/jem.20021769>

- Flores-López, C. A., Zenteno-Cuevas, R., Laniado-Laborín, R., Reynaud, Y., García-Ortiz, R. A., González-Y-Merchand, J. A., Rivera, S., Vázquez-Chacón, C. A., Vaughan, G., Martínez-Guarneros, J. A., Victoria-Cota, N. L., Cruz-Rivera, M., Rastogi, N., & Muñiz-Salazar, R. (2017). Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Baja California, Mexico: A result of human migration? *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 55, 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.001>
- Gagneux, S. (2013). Genetic Diversity in Mycobacterium tuberculosis. En J. Pieters & J. D. McKinney (Eds.), *Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism* (pp. 1-25). Springer. https://doi.org/10.1007/82_2013_329
- Global Tuberculosis Report 2023*. (s. f.). Recuperado 3 de julio de 2024, de <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>
- Glynn, J. R., Whiteley, J., Bifani, P. J., Kremer, K., & van Soolingen, D. (2002). Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of Mycobacterium tuberculosis: A Systematic Review. *Emerging Infectious Diseases*, 8(8), 843-849. <https://doi.org/10.3201/eid0808.020002>
- González-Martín, J., García-García, J. M., Anibarro, L., Vidal, R., Esteban, J., Blanquer, R., Moreno, S., & Ruiz-Manzano, J. (2010). Consensus Document on the Diagnosis, Treatment and Prevention of Tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología ((English Edition))*, 46(5), 255-274. [https://doi.org/10.1016/S1579-2129\(10\)70061-6](https://doi.org/10.1016/S1579-2129(10)70061-6)
- Gori, A., Bandera, A., Marchetti, G., Esposti, A. D., Catozzi, L., Nardi, G. P., Gazzola, L., Ferrario, G., van Embden, J. D. A., van Soolingen, D., Moroni, M., & Franzetti, F. (2005). Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Infectious*

Diseases, 11(8), 1242-1248. <https://doi.org/10.3201/1108.040982>

Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Soolingen, D., & van Embden, J. D. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*, 10(5), 1057-1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>

Grover, A., Troudt, J., Foster, C., Basaraba, R., & Izzo, A. (2014). High mobility group box 1 acts as an adjuvant for tuberculosis subunit vaccines. *Immunology*, 142(1), 111-123. <https://doi.org/10.1111/imm.12236>

Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., & Vincent, V. (2005). Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathogens*, 1(1), e5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005>

Hayman, J. (1984). *Mycobacterium ulcerans*: An infection from Jurassic time? *Lancet (London, England)*, 2(8410), 1015-1016. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91110-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91110-3)

Jacobson, L. M., de Lourdes Garcia-Garcia, Ma., Hernandez-Avila, J. E., Cano-Arellano, B., Small, P. M., Sifuentes-Osornio, J., & Ponce-de-Leon, A. (2005). Changes in the geographical distribution of tuberculosis patients in Veracruz, Mexico, after reinforcement of a tuberculosis control programme. *Tropical Medicine & International Health*, 10(4), 305-311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01392.x>

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. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 907-914. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>

Kapur, V., Li, L. L., Iordanescu, S., Hamrick, M. R., Wanger, A., Kreiswirth, B. N., & Musser, J. M. (1994). Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4), 1095-1098. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.4.1095-1098.1994>

Lamkanfi, M., Sarkar, A., Vande Walle, L., Vitari, A. C., Amer, A. O., Wewers, M. D., Tracey, K. J., Kanneganti, T.-D., & Dixit, V. M. (2010). Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(7), 4385-4392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000803>

López-Rocha, E., Juárez-Álvarez, J., Riego-Ruiz, L., Enciso-Moreno, L., Ortega-Aguilar, F., Hernández-Nieto, J., Enciso-Moreno, J. A., & López-Revilla, R. (2013). Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México. *BMC Research Notes*, 6, 172. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-172>

Lotze, M. T., & Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews. Immunology*, 5(4), 331-342. <https://doi.org/10.1038/nri1594>

Magryś, A., Paluch-Oleś, J., Koziół-Montewka, M., Zaborowski, T., Milanowski, J., & Maciejewska, B. (2013). Evaluation of high-mobility group box 1 protein concentration in serum of patients with *M. tuberculosis* infection. *Immunological Investigations*, 42(1), 49-60. <https://doi.org/10.3109/08820139.2012.723769>

- Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L. T., Vollmer, W., Keep, N. H., & Bhakta, S. (2019). Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(5), 548-575. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz016>
- Manjourides, J., Lin, H.-H., Shin, S., Jeffery, C., Contreras, C., Cruz, J. S., Jave, O., Yagui, M., Asencios, L., Pagano, M., & Cohen, T. (2012). Identifying multidrug resistant tuberculosis transmission hotspots using routinely collected data. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *92*(3), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.02.003>
- Martinez-Guarneros, A., Rastogi, N., Couvin, D., Escobar-Gutierrez, A., Rossi, L. M. G., Vazquez-Chacon, C. A., Rivera-Gutierrez, S., Lozano, D., Vergara-Castañeda, A., Gonzalez-Y-Merchand, J. A., & Vaughan, G. (2013). Genetic diversity among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, *14*, 434-443. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.024>
- McIlleron, H., Wash, P., Burger, A., Norman, J., Folb, P. I., & Smith, P. (2006). Determinants of Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide, and Ethambutol Pharmacokinetics in a Cohort of Tuberculosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(4), 1170-1177. <https://doi.org/10.1128/aac.50.4.1170-1177.2006>
- Molina-Torres, C. A., Moreno-Torres, E., Ocampo-Candiani, J., Rendon, A., Blackwood, K., Kremer, K., Rastogi, N., Welsh, O., & Vera-Cabrera, L. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(2), 448-455. <https://doi.org/10.1128/JCM.01894-09>
- Moonan, P. K., Bayona, M., Quitugua, T. N., Oppong, J., Dunbar, D., Jost, K. C., Burgess, G., Singh, K. P., & Weis, S. E. (2004). Using GIS technology to identify areas of tuberculosis transmission and incidence. *International Journal of Health*

Geographics, 3, 23. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-3-23>

- Munro-Rojas, D., Fernandez-Morales, E., Zarrabal-Meza, J., Martínez-Cazares, M. T., Parissi-Crivelli, A., Fuentes-Domínguez, J., Séraphin, M. N., Lauzardo, M., González-y-Merchand, J. A., Rivera-Gutierrez, S., & Zenteno-Cuevas, R. (2018). Genetic diversity of drug and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Veracruz, Mexico. *PLOS ONE*, 13(3), e0193626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193626>
- Nair, A., Greeny, A., Nandan, A., Sah, R. K., Jose, A., Dyawanapelly, S., Junnuthula, V., K. V., A., & Sadanandan, P. (2023). Advanced drug delivery and therapeutic strategies for tuberculosis treatment. *Journal of Nanobiotechnology*, 21, 414. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02156-y>
- Ormerod, L. P. (2005). Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): Epidemiology, prevention and treatment. *British Medical Bulletin*, 73-74(1), 17-24. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh047>
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1-23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Petroff, S. A. (1915). A NEW AND RAPID METHOD FOR THE ISOLATION AND CULTIVATION OF TUBERCLE BACILLI DIRECTLY FROM THE SPUTUM AND FECES. *The Journal of Experimental Medicine*, 21(1), 38-42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2125265/>
- Philip, S. R. (2019). Robert Koch's Discovery of the Tubercle Bacillus¹. *American Review of Tuberculosis*.

<https://www.atsjournals.org/doi/epdf/10.1164/art.1932.26.6.637?role=tab>

- Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual Review of Pathology*, 7, 353-384. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458>
- Poojar, B., Shenoy, K. A., Naik, P. R., Kamath, A., Tripathy, J. P., Mithra, P. P., Chowta, M. N., Badarudeen, M. N., Nagalakshmi, N., Sharma, V., Shamanewadi, A. N., & Thekkur, P. (2020). Spatiotemporal analysis of drug-resistant TB patients registered in selected districts of Karnataka, South India: A cross-sectional study. *Tropical Medicine and Health*, 48, 15. <https://doi.org/10.1186/s41182-020-00199-7>
- Rook, G. a. W., & Hernandez-Pando, R. (1996). THE PATHOGENESIS OF TUBERCULOSIS. *Annual Review of Microbiology*, 50(Volume 50, 1996), 259-284. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.259>
- Salud, S. de. (s. f.). 079. *En 2022 se registran más de 28 mil casos de tuberculosis en México*. gob.mx. Recuperado 10 de agosto de 2024, de <http://www.gob.mx/salud/prensa/079-en-2022-se-registran-mas-de-28-mil-casos-de-tuberculosis-en-mexico>
- Salvato, R. S., Schiefelbein, S., Barcellos, R. B., Praetzel, B. M., Anusca, I. S., Esteves, L. S., Halon, M. L., Unis, G., Dias, C. F., Miranda, S. S., De Almeida, I. N., De Assis Figueredo, L. J., Silva, E. C., Kritski, A. L., Dalla Costa, E. R., & Rossetti, M. L. R. (2019). Molecular characterisation of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a high-burden tuberculosis state in Brazil. *Epidemiology and Infection*, 147, e216. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001006>
- Sia, J. K., Georgieva, M., & Rengarajan, J. (2015). Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. *Journal of Immunology Research*, 2015, 747543. <https://doi.org/10.1155/2015/747543>

- Stoffels, K., Mathys, V., Fauville-Dufaux, M., Wintjens, R., & Bifani, P. (2012). Systematic Analysis of Pyrazinamide-Resistant Spontaneous Mutants and Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(10), 5186-5193. <https://doi.org/10.1128/AAC.05385-11>
- Sylvain, G., Tazi, L., & Bañuls, A.-L. (2010). *Pulmonary Tuberculosis and Mycobacterium Tuberculosis: Modern Molecular Epidemiology and Perspectives*.
- Taha Nazir. (2011). Isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human patients. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(25). <https://doi.org/10.5897/AJMR11.037>
- Takayama, K., Schnoes, H. K., Armstrong, E. L., & Boyle, R. W. (1975). Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Lipid Research*, *16*(4), 308-317.
- The Story of Clinical Pulmonary Tuberculosis. (1941). *American Journal of Diseases of Children*, *62*(3), 690-691. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1941.02000150214026>
- Theron, G., Jenkins, H. E., Cobelens, F., Abubakar, I., Khan, A. J., Cohen, T., & Dowdy, D. W. (2015). Data for action: Collection and use of local data to end tuberculosis. *Lancet (London, England)*, *386*(10010), 2324-2333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00321-9)
- Tiwari, N., Adhikari, C., Tewari, A., & Kandpal, V. (2006). Investigation of geo-spatial hotspots for the occurrence of tuberculosis in Almora district, India, using GIS and spatial scan statistic. *International Journal of Health Geographics*, *5*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-5-33>
- Tulu, B., & Ameni, G. (2018). Spoligotyping based genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia: A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, *18*(1), 140.

<https://doi.org/10.1186/s12879-018-3046-4>

- Vera-Cabrera, L., Ramos-Alvarez, J., Molina-Torres, C. A., Rivera-Morales, L. G., Rendón, A., Quiñones-Falconi, F., & Ocampo-Candiani, J. (2014). Comparative Mycobacterium tuberculosis Spoligotype Distribution in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 3049-3052. <https://doi.org/10.1128/JCM.01043-14>
- Vinueza, L. C., & Arias, P. J. (2021). Distribution of Mycobacterium tuberculosis lineages in South America. *Anatomía Digital*, 4(3), Article 3. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v4i3.1755>
- Vynnycky, E., & Fine, P. E. (2000). Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *American Journal of Epidemiology*, 152(3), 247-263. <https://doi.org/10.1093/aje/152.3.247>
- Wells, C. (1968). D. R. Brothwell and A. T. Sandison (eds.): Diseases in Antiquity: A Survey of the Diseases, Injuries and Surgery of Early Populations. Springfield, Ill.: C. C. Thomas, 1967. 766 pp. \$39.75. *Antiquity*, 42(166), 156-157. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00034189>
- Ypma, R. J. F., Altes, H. K., van Soolingen, D., Wallinga, J., & van Ballegooijen, W. M. (2013). A sign of superspreading in tuberculosis: Highly skewed distribution of genotypic cluster sizes. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 24(3), 395-400. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182878e19>
- Zelner, J. L., Murray, M. B., Becerra, M. C., Galea, J., Lecca, L., Calderon, R., Yataco, R., Contreras, C., Zhang, Z., Manjourides, J., Grenfell, B. T., & Cohen, T. (2016). Identifying Hotspots of Multidrug-Resistant Tuberculosis Transmission Using Spatial and Molecular Genetic Data. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(2), 287-294. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv387>

Zhang, Y., Liu, M., Wu, S. S., Jiang, H., Zhang, J., Wang, S., Ma, W., Li, Q., Ma, Y., Liu, Y., Feng, W., Amsalu, E., Li, X., Wang, W., Li, W., & Guo, X. (2019). Spatial distribution of tuberculosis and its association with meteorological factors in mainland China. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 379. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4008-1>

Zimmerman, M. R. (1979). Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, *55*(6), 604-608.