

MAESTRÍA EN BIOINFORMÁTICA Y BIOLOGÍA COMPUTACIONAL



EFICACIA DIAGNÓSTICA *in silico* DE TÉCNICAS
MOLECULARES DE USO CLÍNICO EN *Mycobacterium*
tuberculosis PARA LATINOAMÉRICA

MARCELA ORJUELA RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD DE CALDAS
MAESTRÍA EN BIOINFORMÁTICA Y BIOLOGÍA
COMPUTACIONAL
MANIZALES

2023

EFICACIA DIAGNÓSTICA *in silico* DE TÉCNICAS MOLECULARES DE USO
CLÍNICO EN *Mycobacterium tuberculosis* PARA LATINOAMÉRICA

Marcela Orjuela Rodríguez
Bióloga

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Bioinformática y Biología Computacional

Dirigido por:
Ing. MSc. Ph. D. Gustavo Adolfo Isaza Echeverri
M. D. MSc. Johan Sebastián Hernández

Línea de Investigación:
Biomedicina y Genómica computacional

Grupos de investigación:
Grupo de investigación en tecnologías de la información y redes - GITIR
Grupo de investigación médica - Universidad de Manizales

Universidad de Caldas
Maestría en Bioinformática y Biología Computacional
Manizales, Colombia

2023

Tabla de contenido

Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	V
Lista de Tablas	VII
Lista de Figuras	IX
1 Introducción	1
1.1 Campo temático	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Justificación	4
1.4 Objetivos	6
1.4.1 Objetivo general	6
1.4.2 Objetivos específicos	6
Referencias	7
2 Referente teórico y antecedentes	9
2.1 Generalidades de la Tuberculosis	9
2.1.1 Clasificación de la Tuberculosis	9
2.1.1.1 Tuberculosis latente y activa	9
2.1.1.2 Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar	11
2.1.1.3 Tuberculosis sensible, resistente, TB-MDR y TB-XDR	11
2.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis complex y spoligotyping</i>	13
2.1.3 Caracterización genómica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.1.4 Epidemiología de la tuberculosis	21
2.1.4.1 Tuberculosis en América Latina y el Caribe	22
2.1.5 Tratamientos antituberculosos y farmacorresistencia	26
2.1.5.1 Antituberculosos de primera línea	27
2.1.5.2 Antituberculosos de segunda línea	31

2.1.6	Diagnóstico de la Tuberculosis	34
2.1.6.1	Prueba de tuberculina de Matoux	35
2.1.6.2	Radiografía de tórax	36
2.1.6.3	Microbiología diagnóstica	36
2.1.6.4	Pruebas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis	37
2.2	Herramientas bioinformáticas para el estudio de la tuberculosis	41
	Referencias	46
3	Artículo	57
	Genómica de en América Latina y el Caribe: Análisis exploratorio de polimorfismos de un solo nucleótido, farmacorresistencia e identificación de linajes de aislamientos clínicos	57
	Referencias	78
4	Conclusiones generales	83
4.1	Contribuciones del trabajo de grado	83
4.2	Recomendaciones y trabajos futuros	84
5	Anexos	85
5.1	Listado de códigos de acceso de NCBI para las muestras analizadas	86
5.2	Genotipos asociados a resistencia antibiótica.	88
5.3	Identificación y clasificación de variantes asociadas a resistencia en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a partir de datos de WGS.	90
5.4	Listado de Espoligotipos y linajes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para latinoamérica	92
6	Modificaciones realizadas al documento a partir de la evaluación de tesis.	94
6.1	Evaluador 1.	94
6.2	Evaluador 2.	95

Agradecimientos

- A la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas por la financiación recibida para la ejecución de este proyecto.
- A la Fundación Luker por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría y para la realización de una pasantía internacional.
- Al programa de Maestría en Bioinformática y Biología Computacional por la excelente formación recibida. Al comité coordinador del programa y a todos los excelentes profesores que hicieron parte de mi formación, especialmente, al profesor Narmer Fernando Galeano por su acompañamiento en mi camino por la bioinformática.
- Al Grupo de Investigación en Tecnologías de la Información y Redes GITIR por acogerme para la ejecución de este proyecto.
- Especialmente agradezco a la Universidad de Caldas, mi *alma mater*, por estos años de excelente formación académica y personal.

Doctores e Investigadores:

- A mis directores, el Dr. Gustavo Adolfo Isaza y el Dr. Sebastian Hernández Bote-ro por su acompañamiento, formación, apoyo y paciencia a lo largo de este proceso.

Agradecimientos personales:

Agradezco a mis padres Sandra Liliana Rodríguez Cardozo y Leonel Enrique Orjuela Rivera por su apoyo y acompañamiento cada día de mi vida, cada uno de mis logros es y será siempre gracias a ellos y para ellos. A mi hermano Sebastián Orjuela Rodríguez por su apoyo incondicional. A Mayra Vannesa Herrera Ramos por su apoyo a lo largo de mi formación y por tantos años de amistad. A mis compañeros de la Maestría por su apoyo y sus consejos que enriquecieron mi formación académica y personal, especialmente a Juan Manuel y Alejandra.

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad de etiología bacteriana causada por micobacterias pertenecientes al *Mycobacterium tuberculosis complex* siendo *M. tuberculosis sensu stricto* la principal causante de esta enfermedad en seres humanos. La tuberculosis presenta un espectro dinámico de infección asintomática que puede migrar a una enfermedad potencialmente mortal. Al día de hoy, la tuberculosis es la principal causa de muerte asociada a un agente infeccioso y produjo entre 1.1 y 1.7 millones de muertes durante la presente década. En Colombia, se estima que 16,000 personas adquirieron tuberculosis en el año 2017 y 1,200 perdieron la vida. Se calcula que a nivel global el 3,3 % de los casos de tuberculosis nuevos y un 20 % de los casos previamente tratados exhiben un patrón de multiresistencia antibiótica, lo que junto a largos tratamientos antibióticos dificulta el control de la diseminación del bacilo tuberculoso.

El presente estudio explora las mutaciones presentes en genes asociados a resistencia antibiótica en 310 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* de países de América Latina y el Caribe mediante análisis *In silico* de susceptibilidad antibiótica basada en SNPs. Presentamos un flujo de trabajo bioinformático que permite el análisis de datos de secuenciación genómica, la identificación de linajes microbianos mediante espoligotipado *In silico*, la caracterización de la resistencia antibiótica mediante identificación de mutaciones asociadas a resistencia y predicciones computacionales de las pruebas moleculares de uso clínico GenoType MDRTB plusv 2.0, Genoscholar NTM + MDRTB; Xpert MTB/RIF Classic, Xpert MTB/RIF Ultra y Xpert MTB/XDR. Se aplicaron técnicas de aprendizaje automático con el fin evaluar la capacidad de predicción de los fenotipos resistentes para determinar la resistencia a los medicamentos basados en las mutaciones encontradas. Este flujo de trabajo permitió clasificar el 53 % de los aislamientos como sensibles a los antibióticos, 19 % como TB-MDR, 17 % tuberculosis monoresistente a seis diferentes fármacos, 7 % tuberculosis polidrogoresistente y 3 % TB Pre-XDR. La tipificación de espoligotipos de los aislamientos produjo un total de 86 patrones diferentes de los cuales 20 se consideraron espoligotipos huérfanos. Se identificaron 45 mutaciones de resistencia a los antibióticos y la presencia de la mutación

de significado incierto L49P, presuntamente asociada a resistencia antibiótica cruzada a antituberculosos de segunda línea.

Palabras clave: Farmacorresistencia; GenoType MDRTB; Genoscholar; Spoligotyping; Tuberculosis; Xpert MTB probes.

Abstract

Tuberculosis is a bacterial disease caused by mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis complex*. This disease presents a dynamic spectrum of asymptomatic infection that can progress to a potentially fatal illness. Today, tuberculosis is the leading cause of death from a specific pathogen and has caused between 1.1 and 1.7 million deaths in the current decade. In Colombia, it is estimated that 16,000 people acquired tuberculosis in 2017 and 1,200 lost their lives. Globally, it is estimated that 3.3% of new tuberculosis cases and 20% of previously treated cases exhibit a pattern of antibiotic resistance, which, along with long antibiotic treatments, makes it difficult to control the spread of the tuberculosis bacillus.

This study explores mutations present in genes associated with antibiotic resistance in 310 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Latin American and Caribbean countries, using *In silico* analysis of antibiotic susceptibility based on SNPs. The study presents a bioinformatics workflow that allows for the analysis of genomic sequencing data, identification of microbial lineages through *In-silico* spoligotyping, characterization of antibiotic resistance through identification of resistance-associated mutations, and computational predictions of molecular tests for clinical use including GenoType MDRTB plusv 2.0, Genoscholar NTM + MDRTB, Xpert MTB/RIF Classic, Xpert MTB/RIF Ultra, and Xpert MTB/XDR. Machine learning techniques were applied in order to evaluate the predictive capacity of resistant phenotypes to determine drug resistance based on the mutations found.

This workflow allowed for the classification of 53% of the isolates as sensitive to antibiotics, 19% as TB-MDR, 17% as monoresistant tuberculosis to six different drugs, 7% as polydrug-resistant tuberculosis, and 3% as TB Pre-XDR. Spoligotyping of the isolates produced a total of 86 different patterns, of which 20 were considered orphan spoligotypes. 45 antibiotic resistance mutations were identified, including the presence of the L49P mutation of uncertain significance, presumably associated with cross-resistance to second-line antituberculosis drugs.

Keywords: Drug resistance; GenoType MDRTB; Genoscholar; Spoligotyping; Tuberculosis; Xpert MTB probes..

Lista de Tablas

2.1	Características moleculares MBTC, genes <i>oxyR</i> , <i>pcnA</i> , <i>katG</i> , <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i> . Tomada de Rodriguez-Campos et al., 2014.	19
2.2	Incidencia de los diferentes genotipos de <i>M. tuberculosis</i> en países de Latinoamérica. Tomado de (Woodman et al., 2019).	26
2.3	Clasificación de los fármacos antituberculosos según su acción por la OMS, 2016	27
2.4	Genes asociados a resistencia antibiótica en <i>M. tuberculosis</i>	35
2.5	Mutaciones asociadas a la región RRDR en estudios de diferentes regiones geográficas.	40
2.6	Herramientas bioinformáticas para el estudio de la tuberculosis	46
3.1	Frecuencia de espoligotipos de <i>M. tuberculosis</i> encontrados para genomas de Latinoamérica	65
3.2	Mutaciones asociadas a resistencia para aislados de tuberculosis de América Latina y el Caribe	69
5.1	Anexo 1. Listado de códigos de acceso de NCBI para las muestras analizadas	86
5.2	Anexo 1. Listado de códigos de acceso de NCBI para las muestras analizadas	87
5.3	Anexo 2. Genotipos asociados a resistencia antibiótica.	88
5.4	Anexo 2. Genotipos asociados a resistencia antibiótica	89
5.5	Anexo 4: Espoligotipos y linajes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para Latinoamérica Parte 1	92
5.6	Anexo 4: Espoligotipos y linajes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para Latinoamérica Parte 2	93
6.1	Modificaciones realizadas de acuerdo a la evaluación de la Evaluadora Ghennie Rodríguez	94

6.2	Modificaciones realizadas de acuerdo a la evaluación del evaluador Narmer Galeano	95
-----	---	----

Lista de Figuras

2.1	Relaciones evolutivas del <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	15
2.2	Relación filogenética de las especies del MBTC basado en spoligotyping.	18
2.3	Anotación funcional de genes para <i>M. tuberculosis</i>	21
2.4	Casos estimados de infección por cada 100 mil habitantes	23
2.5	Incidencia de tuberculosis en América Latina	23
3.1	Flujo de trabajo bioinformático para el análisis genómico de aislados de <i>M. tuberculosis</i>	64
3.2	Linajes y familias de espiligotipos encontrados en genomas de <i>M. tuberculosis</i> latinoamericanos	66
3.3	Linajes de <i>M. tuberculosis</i> identificados para latinoamérica	67
3.4	Nivel de exactitud de métodos de aprendizaje automático para la predicción de resistencia	72
3.5	Curva ROC de métodos de aprendizaje automático Random Forest y Support vector machine para la predicción de resistencia a antituberculosos	72
3.6	Curva ROC de métodos de aprendizaje automático k vecinos más cercanos y Naive Bayes para la predicción de resistencia a antituberculosos	72
3.7	Clasificación de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> analizados	74
5.1	Anexo 3. Registro de mutaciones generado en el proceso de clasificación de variantes	90
5.2	Anexo 3. Reporte de mutaciones encontradas y su interpretación	90
5.3	Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica GenoType MDRTB plus v2.0	91
5.4	Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica Genoscholar NTM+MDRTB II	91
5.5	Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica Xpert MTB/RIF Classic	91

5.6	Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica Xpert MTB/RIF Ultra	91
-----	--	----

Introducción

1.1. Campo temático

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más letales del mundo. Según lo establece la Organización Panamericana de Salud, a 2021, cada día mueren al rededor de 4000 personas y cerca de 28000 resultan infectadas con el bacilo tuberculoso. Esta infección se encuentra diseminada por todo el mundo y en 2019 afectó aproximadamente a 10 millones de personas (World Health Organization, 2019). Se calcula que a nivel global el 3,3% de los casos de tuberculosis nuevos y un 20% de los casos previamente tratados exhiben un patrón de multiresistencia antibiótica. Sin embargo, 2 de cada de cada 3 pacientes infectados con tuberculosis farmacorresistente no reciben el tratamiento adecuado (PAHO, 2020). Ante esta realidad la OMS a través de su plan “End TB Strategy” propone que el diagnóstico de sensibilidad antibiótica sea de uso rutinario, realidad que no se cumple debido a los altos requerimientos técnicos para llevar a cabo estos análisis (Organization et al., 2015).

La tuberculosis está a su vez íntimamente relacionada con la pobreza. Esta patología se concentra en países y estratos socioeconómicos vulnerables, poblaciones que presentan altas tasas de hacinamiento, barreras para el acceso a los servicios de salud y un sistema inmune debilitado debido a la preexistencia de otras enfermedades de base o la prevalencia de la desnutrición (PAHO, 2020). Dada la alta incidencia de esta enfermedad y los impactos socioeconómicos que la acompañan, la tuberculosis es quizá una de las enfermedades más estudiadas que existen. Sin embargo, con un microorganismo que exhibe patrones de resistencia antibiótica cambiantes, un diagnóstico lento y la dificultad para la identificación de patrones de multiresistencia, es necesario seguir innovando para el entendimiento de esta enfermedad a través de estudios que se concentren en áreas geográficas donde existe una alta prevalencia.

Este proyecto pertenece a la línea de formación en Biomedicina y Genómica computacional de la Maestría en Bioinformática y Biología Computacional ofertada por la Universidad de Caldas y el Convenio SUMA Manizales. Esta propuesta presenta un

análisis exploratorio de los patrones de resistencia antibiótica encontrados en América latina y el Caribe, mediante la recopilación de análisis genómicos de aislados de tuberculosis de todo el continente. Este trabajo se enmarca dentro de las políticas públicas colombianas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis, como los son el Plan Estratégico Colombia Hacia el Fin de la Tuberculosis, Conpes Social N° 91 de 2005, Decreto 3039 de 2007 y el Programa Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud e impacta la primera prioridad del programa “Generación de conocimiento, desarrollo de capacidades endógenas, impacto a las principales problemáticas de salud de la población”.

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas en la Convocatoria General: Financiación de Proyectos de Investigación, Investigación-Creación e Innovación 2019. Se encuentra vinculado al Grupo de Investigación en Tecnologías de la Información y Redes-GITIR de la Universidad de Caldas y el Grupo de Investigación Médica de la Universidad de Manizales.

1.2. Planteamiento del problema

La tuberculosis es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y la principal causa de muerte asociada a un único agente infeccioso, con 1.4 muertes asociadas en 2019 (World Health Organization, 2019). Esta infección se encuentra diseminada por todo el mundo y en 2019 afectó aproximadamente a 10 millones de personas. Se calcula que a nivel global el 3,3% de los casos de tuberculosis nuevos y un 20% de los casos previamente tratados exhiben un patrón de multiresistencia antibiótica (Kyu et al., 2018). Ante esta realidad la OMS a través de su plan “End TB Strategy” propone que el diagnóstico de sensibilidad antibiótica sea de uso rutinario (World Health Organization, 2015). Sin embargo, datos recientes muestran que sólo el 33% de los pacientes con la enfermedad confirmada por laboratorio tratados por primera vez tienen acceso a análisis de sensibilidad a antituberculosos, y solo el 66% de los pacientes con alto riesgo de resistencia tendrán acceso a un antibiograma (PAHO, 2020). En Colombia se estima que cerca de 11390 personas contrajeron la enfermedad en 2020 de los cuales 1200 perdieron la vida (INS, 2020).

Dentro de las estrategias para la identificación de la tuberculosis se encuentran técnicas de imagen como la radiografía torácica, técnicas de microscopía como la baciloscopía y la microscopía de fluorescencia, cultivo del microorganismo y técnicas de biología molecular basadas en PCR. Sin embargo, sólo las dos últimas permiten iden-

tificar la enfermedad y la resistencia antibiótica al tiempo (Pai, 2020). Las técnicas de cultivo son demandantes técnicamente, peligrosas en términos de bioseguridad, analizan un número limitado de fármacos y no ofrecen información alguna sobre el origen del aislamiento o su virulencia. Adicionalmente, presentan limitaciones en cuanto al tiempo de diagnóstico dada la biología propia del microorganismo, cuyo crecimiento efectivo varía entre dos y cuatro meses (Lee y Behr, 2016).

Las pruebas de diagnóstico molecular para la identificación de la tuberculosis se basan en la hibridación de cebadores moleculares específicos sobre el gen *rpoB*, causante de hasta el 95 % de los casos de tuberculosis resistente a la rifampicina y que a su vez codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa del microorganismo, permitiendo la identificación clínica del bacilo y casos de resistencia en menos de 24 horas (World Health Organization, 2015). Existen numerosos estudios que comparan la efectividad de las técnicas de detección por amplificación con respecto a técnicas de cultivo directo, como las realizadas por Piersimoni y colaboradores en 2019, quienes reportan tasas de sensibilidad entre el 87 % y el 95 % para Xpert MTB/RIF Ultra y alrededor del 75 % para Xpert MTB/RIF (Piersimoni et al., 2019). Las pruebas de diagnóstico molecular, pese a lograr un diagnóstico rápido, presentan una sensibilidad intermedia, mejor que la microscopía de frotis, pero menor que el cultivo directo del microorganismo, con el riesgo de resultados falsos negativos (Allahyartorkaman et al., 2019). Adicionalmente, pueden presentar disminución en su sensibilidad en pacientes co-infectados con VIH (Vergara Gómez, González-Martin y Garcia-Basteiro, 2017; Bahr et al., 2018).

En 2018 Dorman y colaboradores concluyen que la sensibilidad de Xpert en el diagnóstico rápido de la enfermedad hace que sea una opción mucho mejor en comparación con la microscopía de frotis. Sin embargo, su capacidad para descartar la enfermedad sigue siendo subóptima (Dorman et al., 2018). Afectaciones en la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico molecular por amplificación han sido asociadas a interferencias de la matriz biológica de la muestra (esputo, Líquido cefalorraquídeo, pleura, etc) (Piersimoni et al., 2019). Sin embargo, existen vacíos de información que relacionen si dichos fallos pueden corresponder a errores de hibridación de los primers o sondas empleados para la detección molecular dada la variabilidad intra-específica del microorganismo.

Investigaciones recientes demuestran que el gen *rpoB* es altamente polimórfico y las mutaciones pueden variar significativamente en función del linaje microbiano y su localización geográfica (Htike et al., 2014; Thirumurugan et al., 2015; Vergara Gómez, González-Martin y Garcia-Basteiro, 2017; Kigozi et al., 2018; Zaw, Emran y Lin, 2018; Wanzala et al., 2019). Estas variaciones podrían disminuir la sensibilidad y especificidad

de las pruebas de diagnóstico molecular en diferentes regiones del mundo. En 2015 Sánchez y colaboradores, identificaron que la mutación *rpoB* I491F se expresaba en el 30% de las cepas aisladas de *M. tuberculosis* en Swazilandia, dicha mutación no se detecta mediante el uso de Xpert MTB/RIF y había sido catalogada como una mutación de baja frecuencia en aislamientos clínicos de otras regiones del mundo, como Hong Kong y Australia (Sanchez-Padilla et al., 2015), lo que implica una reducción en la sensibilidad del diagnóstico por Xpert MTB/RIF en Swazilandia y presumiblemente da como resultado un diagnóstico insuficiente y un tratamiento potencialmente inadecuado. La transmisión adicional de la cepa *rpoB* I491F en esta población es otra consecuencia probable (Sanchez-Padilla et al., 2015).

El uso extendido de los diagnósticos moleculares existentes podría imponer un proceso de selección artificial, en el que se detectan y erradican patógenos con mutaciones específicas pero aquellos con variantes novedosas no se detectan y continúan extendiéndose bajo el riesgo de propagación y desarrollo de nuevos tipos de resistencia (Sanchez-Padilla et al., 2015). Sobre la base de estos hallazgos se necesitan más estudios para evaluar la prevalencia de mutaciones similares en diferentes países con alta incidencia de tuberculosis, como es el caso de los países de América latina y el Caribe, en los cuales, según la organización panamericana de la salud se reportaron 290.000 casos nuevos de tuberculosis en 2019, 30.000 en personas co-infectadas con VIH y 22.900 muertes por tuberculosis. Según estimaciones de OPS/OMS los servicios de salud dejaron de diagnosticar anualmente cerca de 54.000 pacientes infectados. El 2,4% de los casos nuevos y el 11% de los previamente tratados tienen tuberculosis multidrogoresistente (PAHO, 2020).

1.3. Justificación

Según estimaciones de OPS/OMS en América latina se reportaron 290.000 casos nuevos de tuberculosis en 2019; 16800 casos en niños, 28.000 personas co-infectadas con VIH y 23.000 muertes por tuberculosis (World Health Organization, 2019). Se estima que los servicios de salud dejan de diagnosticar anualmente cerca de 54.000 pacientes infectados. El 2,4% de los casos nuevos y el 11% de los previamente tratados tienen tuberculosis multidrogoresistente (PAHO, 2020). La organización mundial de salud en 2013 recomienda el uso de las pruebas moleculares Xpert MTB/RIF para disminuir los tiempos de diagnóstico de tuberculosis y tuberculosis multidrogoresistente (TB-MDR) así como aumentar la sensibilidad del diagnóstico clínico (World Health Organization, 2013). Sin embargo, los genes de *M. tuberculosis* empleados en técnicas

de diagnóstico molecular por amplificación, poseen una amplia diversidad de mutaciones cuya dominancia varía a lo largo de la población mundial, afectando la sensibilidad y especificidad de las pruebas moleculares en diferentes regiones (Sanchez-Padilla et al., 2015).

Con la realización del presente proyecto se busca evaluar mediante investigación aplicada la eficacia de las pruebas moleculares diagnósticas para tuberculosis en América latina y el Caribe, mediante un análisis de polimorfismos de genes asociados a resistencia antibiótica y genes empleados para el diagnóstico molecular basado en un enfoque de secuenciación de genoma completo. Esta propuesta permite identificar las diferentes mutaciones que circulan en la región y que podrían afectar negativamente la capacidad diagnóstica de las pruebas basadas en PCR para el diagnóstico de la tuberculosis. Así mismo, el desarrollo de este proyecto brinda una descripción de las mutaciones, linajes, sublinajes y espoligotipos de tuberculosis que circulan en América Latina y el Caribe, contribuyendo al conocimiento actual del bacilo causante de la tuberculosis humana.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Caracterizar *in silico* la eficacia diagnóstica de pruebas moleculares de uso clínico para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en América Latina y el Caribe.

1.4.2. Objetivos específicos

Identificar por métodos bioinformáticos polimorfismos asociados a genes empleados en pruebas moleculares diagnósticas para la detección de la tuberculosis.

Analizar computacionalmente la sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares diagnósticas GenoType MDRTB plusv 2.0, Genoscholar NTM + MDRTB; Xpert MTB/RIF Classic, Xpert MTB/RIF Ultra y Xpert MTB/XDR a partir de genomas de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes de países de América Latina y el Caribe.

Formular una estrategia para el abordaje de casos de tuberculosis no detectados mediante pruebas de diagnóstico molecular rutinario empleando técnicas computacionales de descubrimiento de información biológica.

Referencias

- Allahyartorkaman, Mohammadreza et al. (2019). «Low diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: A multicenter surveillance». En: *Scientific reports* 9.1, pp. 1-6.
- Bahr, Nathan C et al. (2018). «Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculous meningitis in HIV-infected adults: a prospective cohort study». En: *The Lancet Infectious Diseases* 18.1, pp. 68-75.
- Dorman, Susan E et al. (2018). «Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study». En: *The Lancet Infectious Diseases* 18.1, pp. 76-84.
- Htike, Kyi Pyar Min et al. (2014). «Novel mutation detection IN rpoB OF rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis using pyrosequencing». En: *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 45.4, p. 843.
- INS (2020). *Comportamiento de la Vigilancia de Tuberculosis, Colombia, 2020*. URL: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2021_Boletin_epidemiologico_semana_11.pdf (visitado 08-11-2021).
- Kigozi, Edgar et al. (2018). «Prevalence and patterns of rifampicin and isoniazid resistance conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis isolates from Uganda». En: *PLoS One* 13.5, e0198091.
- Kyu, Hmwe H et al. (2018). «The global burden of tuberculosis: results from the Global Burden of Disease Study 2015». En: *The Lancet Infectious Diseases* 18.3, pp. 261-284.
- Lee, Robyn S y Marcel A Behr (2016). «The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis». En: *Therapeutic advances in infectious disease* 3.2, pp. 47-62.
- Organization, World Health et al. (2015). *The end TB strategy*. Inf. téc. World Health Organization.
- PAHO (2020). *Tuberculosis en las Américas - Informe Regional 2019*. URL: <https://www.paho.org/es/documentos/tuberculosis-americas-informe-regional-2019> (visitado 08-11-2021).
- Pai, Madhukar (2020). «Tuberculosis: the story after the Primer». En: *Nature Reviews Disease Primers* 6.1, pp. 1-2.
- Piersimoni, Claudio et al. (2019). «Comparative evaluation of Xpert MTB/RIF and the new Xpert MTB/RIF ultra with respiratory and extra-pulmonary specimens

- for tuberculosis case detection in a low incidence setting». En: *Journal of clinical tuberculosis and other mycobacterial diseases* 15, p. 100094.
- Sanchez-Padilla, Elisabeth et al. (2015). «Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland». En: *New England Journal of Medicine* 372.12, pp. 1181-1182.
- Thirumurugan, Ravibalan et al. (2015). «Molecular analysis of rpoB gene mutations in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India». En: *Journal of Infection and Public Health* 8.6, pp. 619-625.
- Vergara Gómez, A, J González-Martin y AL Garcia-Basteiro (2017). «Xpert® MTB/RIF: utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis y de la resistencia a la rifampicina». En: *Medicina Clínica* 149.9, pp. 399-405.
- Wanzala, Sylvia I et al. (2019). «Retrospective Analysis of Archived Pyrazinamide Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates from Uganda—Evidence of Interspecies Transmission». En: *Microorganisms* 7.8, p. 221.
- World Health Organization (2013). *Xpert MTB/RIF implementation manual*. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112469/9789241506700_eng.pdf (visitado 30-09-2021).
- (2015). *Implementing the end TB strategy: the essentials* (No. WHO/HTM/TB/2015.31). URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206499/9789241509930_eng.pdf (visitado 30-08-2021).
- (2019). *Colombia: country profiles*. URL: https://www.who.int/gho/countries/col/country_profiles/en/ (visitado 08-08-2021).
- Zaw, Myo T, Nor A Emran y Zaw Lin (2018). «Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis». En: *Journal of infection and public health* 11.5, pp. 605-610.

Referente teórico y antecedentes

2.1. Generalidades de la Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa de etiología bacteriana causada por micobacterias del *Mycobacterium tuberculosis Complex*, las cuales generalmente afectan los pulmones, pero también pueden afectar otras partes del cuerpo, como el cerebro, los riñones, los ganglios o el sistema osteoarticular (Vasquez Michel y Chipana Cortez, 2016). Esta patología se transmite esencialmente por el aire, cuando una persona con la enfermedad activa tose, estornuda, habla o escupe. Las gotas de saliva que contienen bacilos tuberculosos se proyectan en el aire y pueden ser inhaladas por una persona cercana (Banuls et al., 2015). La tuberculosis es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y la principal causa de muerte asociada a un único agente infeccioso, con entre 1.1 y 1.7 muertes asociadas en la última década (World Health Organization, 2019). Esta infección se encuentra diseminada por todo el mundo y en 2019 afectó aproximadamente a 10 millones de personas (World Health Organization, 2019).

2.1.1. Clasificación de la Tuberculosis

2.1.1.1. Tuberculosis latente y activa

La tuberculosis se caracteriza por presentar un espectro dinámico de infección asintomática que puede migrar a una enfermedad potencialmente mortal. Desde una perspectiva clínica y de salud pública, los pacientes con tuberculosis se clasifican en aquellos que presentan la infección latente (LTBI) y la enfermedad activa. Los pacientes con LTBI no manifiestan síntomas, ni transmiten la enfermedad. Se estima que aproximadamente la mitad de las personas que contraen tuberculosis presentarán la enfermedad en los dos años siguientes al momento de la infección y aquellos pacientes con sistemas inmunitarios debilitados, especialmente co-infectados con VIH presentan un riesgo considerablemente mayor de desarrollar tuberculosis activa (Sosa et al., 2019).

El ciclo infeccioso de la tuberculosis inicia con la inhalación del bacilo, lo que conlleva al desarrollo de una respuesta inmune que involucra a los macrófagos alveolares y los granulocitos. Sin embargo, existen ocasiones en que la infección no es eliminada por el sistema inmune. La replicación de los bacilos en los macrófagos y los nodos linfáticos regionales lleva a una diseminación linfática y en sangre, que se establece en múltiples órganos y posteriormente lleva a una enfermedad extrapulmonar. Sin embargo, puede darse una contención de los bacilos por parte de los macrófagos y los granulomas extracelulares, lo que lleva a un equilibrio dinámico entre el patógeno y el hospedero. Estas interacciones dan lugar a una latencia característica que se rompe cuando la replicación de *M. tuberculosis* sobrepasa el umbral requerido para causar síntomas (Getahun et al., 2015).

El éxito de la infección depende principalmente de cuatro pasos sucesivos: la fagocitosis de los bacilos, su multiplicación intracelular, la fase de infección latente y finalmente la infección pulmonar activa. Estos pasos pueden progresar hacia diferentes escenarios clínicos: cura espontánea, enfermedad, infección latente y reactivación, o reinfección (Gagneux, 2018).

Una vez desarrollada la enfermedad activa los pacientes experimentan síntomas como fiebre, fatiga, falta de apetito y pérdida de peso. Algunos pacientes con tuberculosis activa confirmada por cultivo pueden ser asintomáticos (Andrews et al., 2012).

La infección activa por tuberculosis abarca un rango heterogéneo de presentaciones de la enfermedad. Posterior a la infección inicial por el patógeno algunos pacientes desarrollan rápidamente la forma activa de la infección, lo que se conoce como tuberculosis primaria o primaria progresiva, generalmente más común en niños (O'Garra et al., 2013). En otros casos la infección activa puede desarrollarse después de un periodo de infección latente que puede durar años, esto se conoce como infección post-primaria. Estadísticamente, el 5 al 10 % de los pacientes con LTBI tienen el riesgo de desarrollar infección activa durante el transcurso de su vida (Pai, M. P. Nicol y C. C. Boehme, 2016). Tanto la infección por tuberculosis primaria y postprimaria pueden tener cuadros clínicos diferentes atribuibles a la susceptibilidad genética del paciente (O'Garra et al., 2013). La combinación de síntomas puede abarcar respuestas sistémicas como fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna y otros síntomas como tos, hemoptisis (enfermedad pulmonar) y anormalidades radiológicas (linfadenopatía o cavidades pulmonares). El tratamiento de la infección activa es complejo, requiriéndose de la administración simultánea de múltiples fármacos para prevenir la selección de mutantes resistentes, además, el tratamiento suele ser largo con periodos de mínimo 6 meses, divididos en una fase inicial intensiva y una fase continua que pretende eliminar la infección persis-

tente (O'Garra et al., 2013).

2.1.1.2. Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar

La tuberculosis pulmonar es la forma de tuberculosis más frecuente y representa aproximadamente el 80 % de los casos en personas inmunocompetentes (Luna, 2016). Se caracteriza por ser una infección de difícil diagnóstico debido a la baja especificidad de sus síntomas, similares a los de muchas enfermedades respiratorias, los cuales incluyen tos, expectoración, dolor torácico y hemoptisis. Cuando los síntomas persisten más allá de 15 días se considera la tuberculosis como posible diagnóstico, por lo cual se recomienda realizar una radiografía de tórax y pruebas microbiológicas (Thangavelu et al., 2021). La radiografía puede llegar a mostrar infiltraciones y/o cavitaciones de predominio en los lóbulos superiores y el segmento apical de los lóbulos inferiores. Sin embargo, en pacientes VIH positivos o con inmunodepresión grave se pueden llegar a mostrar radiografías normales (Luna, 2016).

La tuberculosis extrapulmonar (TBE) es una enfermedad que puede comprometer cualquier órgano del cuerpo humano, secundario a una diseminación de un foco pulmonar y la cual se facilita por estados de inmunosupresión, en especial en pacientes portadores de VIH. Entre los sistemas más afectados por TBE se encuentra el músculo-esquelético, el sistema nervioso central y el aparato génito-urinario. Adicionalmente, otras formas poco frecuentes de TBE corresponden a tuberculosis adrenal, mamaria, laríngea, oftálmica, cutánea y pancreática (Sánchez et al., 2016).

2.1.1.3. Tuberculosis sensible, resistente, TB-MDR y TB-XDR

Tuberculosis sensible: Se define como tuberculosis sensible a aquella infección por bacterias del *M. tuberculosis complex* que no presentan resistencia a fármacos anti-tuberculosos convencionales. El tratamiento estándar de la tuberculosis comprende el uso de cuatro medicamentos antituberculosos como lo son la isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol (Natarajan et al., 2020).

Tuberculosis resistente: Se denomina tuberculosis resistente o mono-resistente a la infección con micobacterias que presentan resistencia a un único fármaco, usualmente isoniacida o rifampicina. Los primeros casos de tuberculosis resistente ocurrieron en la década de 1980, cuando la duración del tratamiento para tuberculosis se acortó de 24 a 6 meses debido al inicio del régimen de ciclo corto. Sin embargo, la adherencia a los regímenes de tratamiento no se logró por completo debido a la terapia relativamente prolongada, generando los casos de tuberculosis resistente a un único fármaco (Zaw,

Emran y Z. Lin, 2018).

Tuberculosis TB-MDR: A principios de la década de 1990 se reportaron cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la Isoniazida y Rifampicina que son las líneas más efectivas de medicamentos antituberculosos. Entre 2002 y 2006 la TB-MDR prevaleció hasta un 22 % entre los casos recién diagnosticados y hasta un 60 % entre los casos tratados previamente. Se denomina tuberculosis multirresistente a aquella infección que presenta resistencia a múltiples fármacos comunes en su tratamiento, específicamente a isoniacida y rifampicina (Zaw, Emran y Z. Lin, 2018). Los esquemas de tratamiento para la TB-MDR se organizan seleccionando fármacos según una agrupación propuesta por la OMS basada en orden de potencia y eficacia. Los más importantes son los del grupo A, las fluorouinolonas (Moxifloxacina), luego B, los inyectables (Amikacina, Kanamicina), luego C (Etionamida, Cicloserina, Linezolid, Clofazimina), grupo D, fármacos como Pirazinamida, Etambutol, Isoniacida a altas dosis, Bedaquilina y Delamanid quedan en las últimas posiciones de selección.

Tuberculosis TB-XDR: En 2002 se notificó en 45 países una tuberculosis ampliamente resistente a los antibióticos capaz de resistir a la isoniacida, rifampicina, fluoroquinolona y a cualquier antibiótico inyectable de segunda línea como la kanamicina, amikacina o capreomicina (Sandgren et al., 2009; World Health Organization, 2019). A 2017 han sido reportados 8014 casos de XDR –TB distribuidos en 72 países (Tiberi et al., 2018). El término TB-XDR fue propuesto en el año 2006 y define la resistencia a rifampicina e isoniacida y adicionalmente a cualquier otra fluoroquinolona junto con por lo menos uno de los siguientes fármacos inyectables: amikacina, kanamicina y capreomicina. Estudios posteriores retrospectivos mostraron que por lo menos el 50 % de las infecciones multirresistentes en Portugal eran en realidad de tipo extremadamente resistente. Datos de la India revelan que 10 % de los casos multirresistentes era en realidad extremadamente resistentes, caso similar a Europa durante el periodo de 2003 a 2006.

Clasificación de la resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* según la OMS:

- ***M. tuberculosis* monorresistente:** Resistencia a un solo fármaco antituberculoso de primera línea.
- ***M. tuberculosis* polirresistente:** Resistencia a más de un fármaco antituberculoso de primera línea, aparte de la isoniazida y la rifampicina.

- ***M. tuberculosis* Resistente a múltiples fármacos (MDR):** Resistencia al menos tanto a la isoniazida como a la rifampicina.
- ***M. tuberculosis* con resistencia extensiva a los medicamentos (XDR):** Resistencia a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina), además de resistencia a múltiples medicamentos.
- ***M. tuberculosis* Resistente a la rifampicina (RR):** Resistencia a la rifampicina detectada mediante métodos fenotípicos o genotípicos, con o sin resistencia a otros fármacos antituberculosos. Incluye cualquier resistencia a la rifampicina, en forma de monorresistencia, polirresistencia, MDR o XDR.

2.1.2. *Mycobacterium tuberculosis complex y spoligotyping*

La tuberculosis es una enfermedad causada por un complejo de micobacterias denominado el *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) o *Complejo tuberculoso*. Específicamente el complejo de microorganismos involucra las especies *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis var Calmette-Guérin (BCG)*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium caprae*.

El miembro más conocido del MTBC es *M. tuberculosis sensu stricto*, el agente etiológico de la tuberculosis en humanos que causó la muerte a 1,4 millones de personas en 2019 (World Health Organization, 2021). El MTBC es esencialmente clonal con poca evidencia de intercambio genético horizontal y probablemente derivado de un grupo de bacilos tuberculosos ancestrales, denominados colectivamente “*M. prototuberculosis*”. Sin embargo, a pesar de la exitosa propagación mundial del MTBC, el momento evolutivo de esta propagación sigue siendo en gran parte desconocido (Meehan et al., 2021). La figura 2.1 presenta un análisis filogenético de las especies del MBTC, incluyendo los linajes derivados de *M. tuberculosis sensu stricto*.

La división de estos microorganismos se ha basado principalmente en la preferencia de hospedero, apoyada por análisis filogenéticos. Sin embargo, se ha propuesto que el complejo se ha generado por una serie de clados conformados por adaptaciones específicas a hospederos, hipótesis que se ve apoyada por distinciones culturales (geodistribución) y rasgos bioquímicos (Parija, 2023).

La diferenciación entre microorganismos del MBTC a nivel genético es compleja puesto que comparten una similitud de hasta el 99.9% en su genoma, resultando prácticamente idénticos en sus secuencias ARN 16S, siendo estas secuencias las más

utilizadas para la distinción entre especies bacterianas. Adicionalmente, las cepas del complejo no presentan evidencias de recombinación cromosomal o transferencia horizontal, a excepción de fragmentos extremadamente cortos (Parija, 2023).

Para la discriminación entre bacterias del MBTC se emplea la técnica de tipificación de oligonucleótidos espaciadores, o spoligotyping, el cual es un método rápido basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que determina la presencia o ausencia de 43 secuencias espaciadoras de ADN específicas en la región de repetición directa (RD por sus siglas en inglés) como una firma para la presunta identificación de especies (Driscoll, 2009). Por ejemplo, los aislamientos de *M. bovis* no se hibridan con los espaciadores 39-43, pero generalmente se hibridan con los espaciadores 33-36. Los aislados de *M. africanum* no se hibridan con los espaciadores 8, 9 y 39, pero generalmente se hibridan con los espaciadores 33-36. *M. microti*, *M. canettii* y *M. pinnipedii* tienen patrones de espoligotipo muy diferentes de los miembros del MBTC, que están más asociados con infecciones humanas. Estas tres especies típicamente se hibridan con pocas o ninguna (Driscoll, 2009).

La región RD consiste en una secuencia repetida de 36 pb intercalada con segmentos de ADN no repetitivos de 31 a 41 pb de longitud llamados secuencias espaciadoras (Driscoll, 2009). Los espoligotipos evolucionan a través de la pérdida de secuencias espaciadoras, presumiblemente a través de la recombinación homóloga de las RD y la escisión del material recombinado durante la replicación del ADN. Las secuencias espaciadoras también pueden parecer perdidas a través de reordenamientos por secuencias de inserción (IS) como es el caso del IS 6110, esta secuencia es específica del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y puede utilizarse tanto para el diagnóstico como para la discriminación entre cepas (Antoine, Gaudin y Hartkoorn, 2021). Dado que estos elementos son móviles y están ubicados en diferentes sitios, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) basado en IS 6110 se ha convertido en una herramienta popular para la tipificación de cepas (Driscoll, 2009). Una vez que se pierden los espaciadores, no se recuperan, por lo que la evolución es unidireccional. Esta evolución unidireccional a través de la pérdida de espaciadores ofrece un modelo claro de evolución, pero también presenta un desafío, ya que el espoligotipo de una cepa puede evolucionar de tal manera que se asemeja a la firma asociada con una familia de espoligotipos diferente. Este desarrollo permitió a los investigadores estudiar la diversidad de cepas y descubrir familias de cepas globales, como las familias de Beijing y el Mediterráneo de América Latina (Driscoll, 2009). En la actualidad existe una hipótesis sólida de la coevolución de estos patógenos con el ser humano, en la cual el ancestro de complejo aparece hace 40 mil años. Posteriormente, la cepa ancestral se diversifica

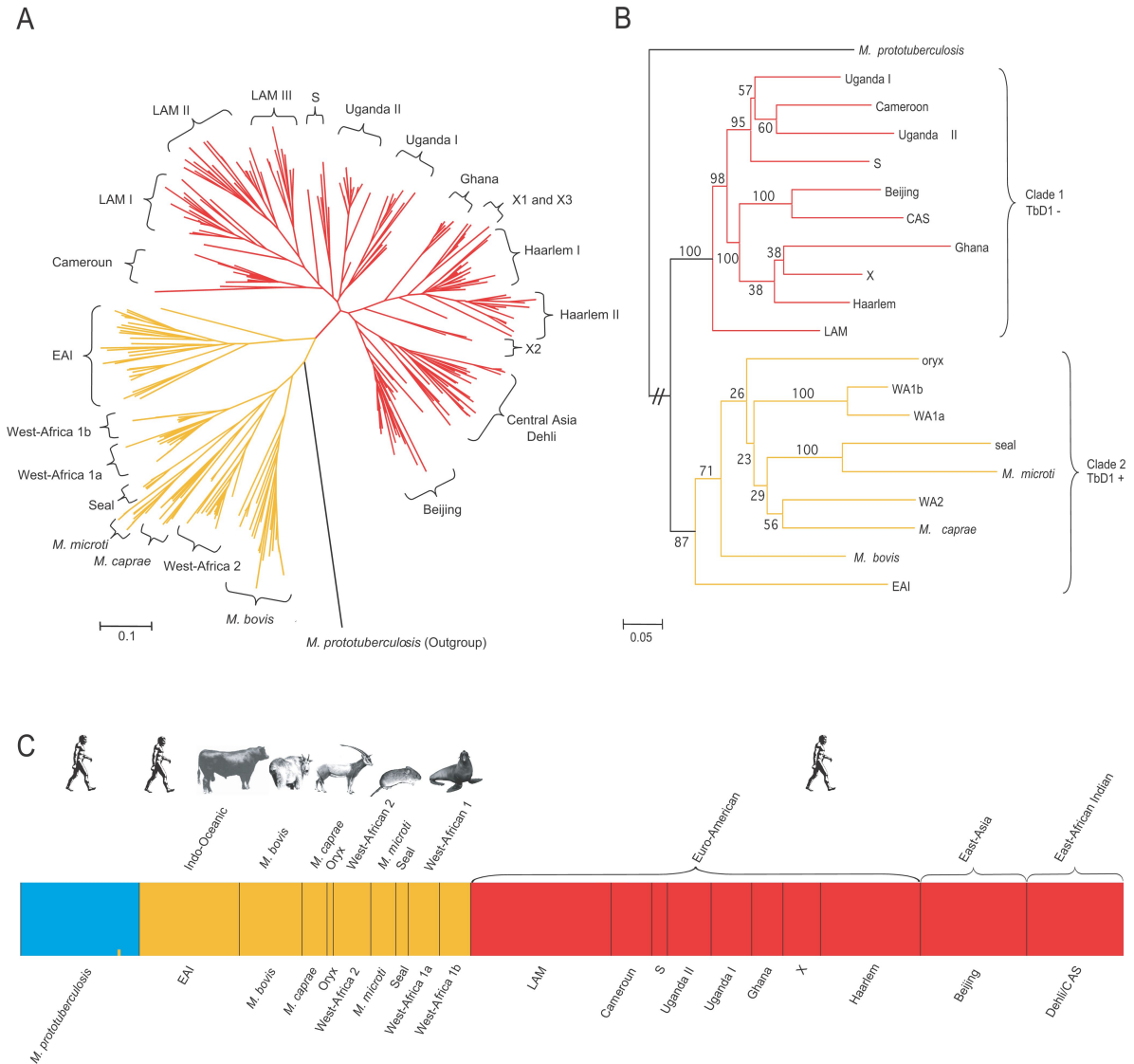


Figura 2.1: Relaciones evolutivas del *Mycobacterium tuberculosis* complex. Tomado de Wirth et al., 2008.

durante y después de la domesticación animal realizada por los seres humanos hace 10 mil años. En este periodo, el MBTC se dispersó fuera de Mesopotamia a través de diferentes migraciones antrópicas en Asia, África y Europa donde hubo adaptaciones específicas. Finalmente, se dio una expansión demográfica durante los últimos 200 años, que se relaciona con la industrialización (Wirth et al., 2008). La figura 2.2 presenta un análisis filogenético basado en la técnica de spoligotyping. A continuación, se describen algunas generalidades de las micobacterias del MBTC.

Micobacterias causantes de tuberculosis humana:

***Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*:** Esta bacteria es la causante de la tuberculosis en seres humanos, con un estimado de 10 millones de casos en 2019 (World Health Organization, 2021). Sin embargo, también puede afectar a bovinos, cabras, cerdos domésticos, gatos, perros y vida salvaje como animales de zoológico (Rodríguez-Campos et al., 2014).

***Mycobacterium africanum*:** Esta especie fue inicialmente descrita como un bacilo tuberculoso del tipo africano en 1968. Las cepas fueron entonces descritas como un intermedio entre *M. tuberculosis sensu stricto* y *M. bovis*. Este patógeno causa la mitad de los casos de tuberculosis humana en África Occidental y se ha sugerido que presenta una adaptación específica patógeno-hospedero (Silva et al., 2022). *M. africanum* fue dividida inicialmente en dos tipos basados en diferencias culturales, bioquímicas y moleculares. Sin embargo, en 2004 el tipo dos fue reclasificado como *M. tuberculosis sensu stricto*, mientras que el tipo uno fue subdividido en tipo del África Occidental uno prevaeciente en el Golfo de Guinea y el tipo dos prevaeciente en el occidente de África Occidental (Garnier et al., 2003). Esta cepa fue reportada esporádicamente en otros lugares como Alemania, Reino Unido, Francia, Estados Unidos, Kazajistán y España (Silva et al., 2022).

***Mycobacterium bovis*:** Es la causa más común de tuberculosis en ganado bovino. En 1898, se demostró que los bacilos aislados de humanos y ganado eran diferentes a nivel de transmisibilidad con otras especies animales, pero solo hasta el año 1970 *M. bovis* fue oficialmente reconocido como una especie (Lange et al., 2022). Los principales hospederos de esta bacteria corresponden a miembro de la familia Bovidae. Sin embargo, ha sido reportando en una vasta cantidad de especies que abarcan caballos, perros y gatos domésticos, camélidos, venados, alces, jabalíes, zorros, lince, coyotes, mapaches, conejos, liebres, erizos, zarigüeyas, coatis, capibaras, leones y primates. En el año 2003 fue secuenciado el genoma completo de *M. bovis*, siendo mucho más pequeño en comparación con el genoma de *M. tuberculosis sensu stricto*, lo que sugiere que evolucionó a partir de este último (Mostowy, Cousins et al., 2002).

***Mycobacterium canettii*:** Es el organismo más divergente dentro del complejo, el cual exhibe una morfología colonial suave y brillante, con rápido crecimiento *in vitro*. La infección causada por esta cepa corresponde a una enfermedad emergente en el norte de África. Sin embargo, su reservorio natural y su rango de hospederos es desconocido. *M. canettii* se considera un caso especial dentro del complejo por su divergencia genética y

evidencia de recombinación (Rodríguez-Campos et al., 2014). Recientemente, un análisis de genoma completo de cinco aislados de esta cepa indica que se encuentra en camino a especiación al ser altamente recombinante y generar una rama evolutiva temprana, con la característica de mayores tamaños de genoma y elevadas tasas de variación genética (Supply et al., 2013). En este mismo estudio se determinó que a pesar de la conservación del genoma principal en el MBTC, *M. canettii* es menos virulento que *M. tuberculosis sensu stricto*.

***Mycobacterium microti*:** Esta especie fue originalmente identificada como un patógeno de roedores pequeños en Gran Bretaña, donde involucraba los topillos negros, ratones de madera y musarañas. Este patógeno ha sido también aislado de otros mamíferos como gatos, cerdos, camélidos sudamericanos, tejones, suricatas y jabalíes salvajes (Ghielmetti et al., 2021). En la década de 1950, *M. microti* fue usada como vacuna viviente en la antigua Checoslovaquia, el Reino Unido y Zimbawe. Tanto la versión atenuada como no atenuada de la vacuna parecieron ser efectivas, sin embargo, no más que la vacunación común con *M. bovis*. Se han reportado casos de infecciones por *M. microti* a seres humanos inmunocomprometidos e inmunocompetentes en Holanda, Alemania, Suiza, Inglaterra y Escocia (Mostowy, Cousins et al., 2002).

Micobacterias causantes de tuberculosis animal:

***Mycobacterium pinnipedii*:** Sus hospederos naturales corresponden a mamíferos marinos, por ejemplo leones marinos australianos, tanto salvajes como en cautiverio, focas australianas y focas de Nueva Zelanda. También, ha sido aislado en otros mamíferos en Sur América, específicamente, en Uruguay, Argentina y Brasil, y se ha encontrado que puede saltar de mamíferos marinos a terrestres como el tapi malayo, camello bactriano y puercoespín crestado (Moser et al., 2008).

***Mycobacterium mungi*:** Esta especie del MBTC fue aislada en el Sur de África y en Oriente Medio, con reportes que se remontan hasta la década de 1950. Sin embargo, solo hasta el año 2004 fue descrito un marcador genético específico para su identificación. Filogenéticamente, *M. mungi* se encuentra en el clado de *M. africanum* de África Occidental tipo dos y presenta características de crecimiento similares a *M. microti*. En la actualidad se ha demostrado una disminución en la virulencia de este patógeno en conejos y conejillos de indias (Mostowy, Onipede et al., 2004).

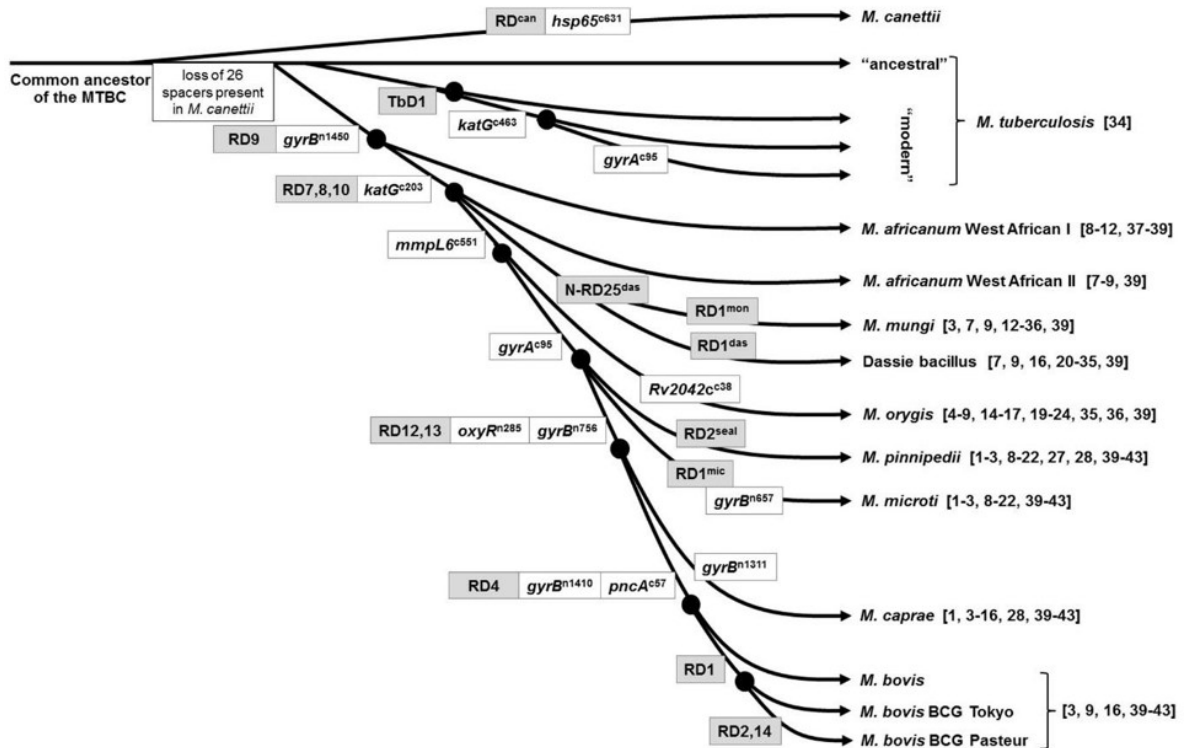


Figura 2.2: Relación filogenética de las especies del MBTC basado en spoligotyping. Tomado de Rodriguez-Campos et al., 2014.

***Mycobacterium caprae*:** Esta especie se distingue por una combinación especial de polimorfismos en el pseudo gen *oxyR* y los genes de pirazinamidasasa (*pncA*), catalasa (*katG*) y girasa (*gyrA* y *gyrB*). Este patógeno se ha reconocido en aislados animales de muchos países de Europa Central y Occidental, y se ha identificado un patrón de transmisión de ganado a ganado. La Tabla 2.1 muestra las mutaciones específicas en los genes *oxyR*, *pncA*, *katG*, *gyrA* y *gyrB* para las especies del MBTC (Rodríguez-Campos et al., 2014).

El MBTC comprende 7 linajes de los cuales 4 son predominantes en humanos:

Linaje 1: Indo-Oceánico, incluye a los espoligotipos Africa oriental e India (EAI).

Linaje 2: Asia oriental, incluye al espoligotipo Beijing.

Linaje 3: Asia central, incluye al linaje de Asia central y el este de África (CAS-DELHI).

Linaje 4: Euroamericano, incluye a los linajes Latinoamericano-Mediterráneo (LAM), Haarlem y las familias de espilgotipos T.

2.1.3. Caracterización genómica de *Mycobacterium tuberculosis*

Las bacterias del género *Mycobacterium* comparten una historia evolutiva huésped-patógeno con el ser humano. Reportes antiguos de textos médicos chinos de la dinastía Xia y los Vedas Hindúes revelan que la tuberculosis ha estado presente desde hace más de 5700 años (Prasad, 2002). Entre los siglos XVIII y XIX, los microorganismos pertenecientes al MBTC fueron especialmente relevantes, cuando se alcanzó un pico de infecciones de tisis, nombre como también se conoce esta enfermedad (Wirth et al., 2008). Esta larga historia coevolutiva es fundamental para la comprensión de la dinámica huésped-patógeno, incluidos los componentes demográficos pasados y en curso, los antecedentes genéticos de las cepas, así como la arquitectura genética del sistema inmunológico del huésped (Barbier y Wirth, 2016).

Tabla 2.1: Características moleculares MBTC, genes *oxyR*, *pcnA*, *katG*, *gyrA* y *gyrB*. Tomada de Rodriguez-Campos et al., 2014.

Especie	<i>oxyR</i> ⁿ²⁸⁵ (G a A)	<i>pcnA</i> ^{c57} (CAC a GAC)	<i>katG</i> ^{c203} (ACC a ACT)	<i>gyrA</i> ^{c95} (AGC a ACC)	<i>gyrB</i> ⁿ⁶⁷⁵ (C a T)
<i>M. tuberculosis</i>	G	CAC	ACC	ND	C
<i>M. africanum</i>	G	CAC	ND	ACC	C
<i>M. mungi</i>	ND	ND	ND	ND	C
<i>M. orygis</i>	G	CAC	ACT	AGC	C
<i>M. pinnipedii</i>	G	CAC	ACT	ACC	C
<i>M. microti</i>	G	CAC	ACT	ACC	T
<i>M. caprae</i>	A	CAC	ACT	ACC	C
<i>M. bovis</i>	A	GAC	ACT	ACC	C
<i>M. bovis</i> CG	A	GAC	ACT	ACC	C

* c: codón, n: nucleótido. ND: No descrito

A nivel pregenómico, *M. tuberculosis* ha sido estudiado a través de diferentes técnicas moleculares como polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) con la secuencia IS6100. Este método demostró capacidad de discriminación entre diferentes cepas (Yeh et al., 1998). Un avance con respecto al método RFLP fueron las técnicas basadas en PCR, que permitieron un avance importante en la velocidad, reproducibilidad y eficiencia en la discriminación de cepas de *M. tuberculosis*. Una de estas técnicas corresponde a “spoligotyping”, que se basa en la búsqueda del locus de repeticiones directas compuesto por una secuencia de 36 pb y secuencias espaciadoras no repetitivas de 34 a 41 pb (Groenen et al., 1993). No obstante, una

desventaja de esta técnica molecular se encuentra en el hecho de que estas secuencias sufren de homoplásia (Reyes et al., 2012). Otra técnica de PCR se cimenta en el número variable de repeticiones en tándem (VNTRs) de unidades repetitivas intercaladas micobacterianas (MIRUs). Este marcador molecular consiste en patrones repetitivos de 51 a 77 pb (Reyes, C. H. Chan y Tanaka, 2012). Una aproximación diferente a los anteriores métodos de PCR utiliza polimorfismos de secuencia o SNPs (Lipworth et al., 2019). A partir de este punto se llega a las comparaciones de genoma completo de *M. tuberculosis*.

La primera secuencia genómica completa del bacilo causante de la tuberculosis corresponde a la cepa H37Rv, cuyo genoma fue publicado por primera vez en 1998 (S. Cole y Barrell, 1998). *M. tuberculosis* H37Rv se aisló por primera vez en 1905, sigue siendo patógena y es la cepa más utilizada en la investigación de la tuberculosis. La anotación original de este genoma dio lugar a la identificación de 3924 genes codificantes a proteínas (CDS) y 50 que codifican para RNA estable (S. Cole y Barrell, 1998). En 2002 Camus y colaboradores, realizaron una reanotación de este genoma incluyendo 82 nuevos CDS (Camus et al., 2002). El genoma de *M. tuberculosis* presenta una extensión de 4.411.529 pb y posee un contenido medio de G+C del 65 %, aunque algunas regiones del genoma pueden alcanzar un contenido superior 80 % (S. Cole y Barrell, 1998). Este alto porcentaje se refleja en una sobrerrepresentación de aminoácidos codificados por codones ricos en G+C como lo son Gly, Ala, Pro. Se estima que aproximadamente el 51 % de los CDS han surgido de eventos de duplicación (Coll, J. Phelan et al., 2018). Las principales fuentes de ADN repetitivo en el genoma son la duplicación, los elementos de inserción (IS) y secuencias no codificantes dispersas (Coll, J. Phelan et al., 2018).

La anotación funcional de este genoma indica que al menos 225 genes están asociados al metabolismo de lípidos, lo que equivale a una extensión de 372 kb correspondientes al 9.3 % del DNA codificante, esto puede explicarse dada la alta diversidad lipídica presente en la envoltura celular micobacteriana, la cual es rica en glicolípidos y ácidos micólicos inusuales (S. Cole y Barrell, 1998). El 22.1 % del DNA codificante está asociado al metabolismo intermedio y la respiración (Figura. 2.3).

La resistencia antibiótica en *M. tuberculosis* se confiere principalmente por variaciones de nucleótidos simples y mutaciones tipo inserción - delección (indels) en genes que codifican para dianas en fármacos o enzimas convertidoras de fármacos, así como bombas de flujo (Coll, J. Phelan et al., 2018). En este contexto, la secuenciación de genoma completo se ha convertido en una gran herramienta que provee información extremadamente precisa en comparación con otros métodos (Walker et al., 2015). Se han reportado de forma consistente un total de 22 genes que confieren resistencia a

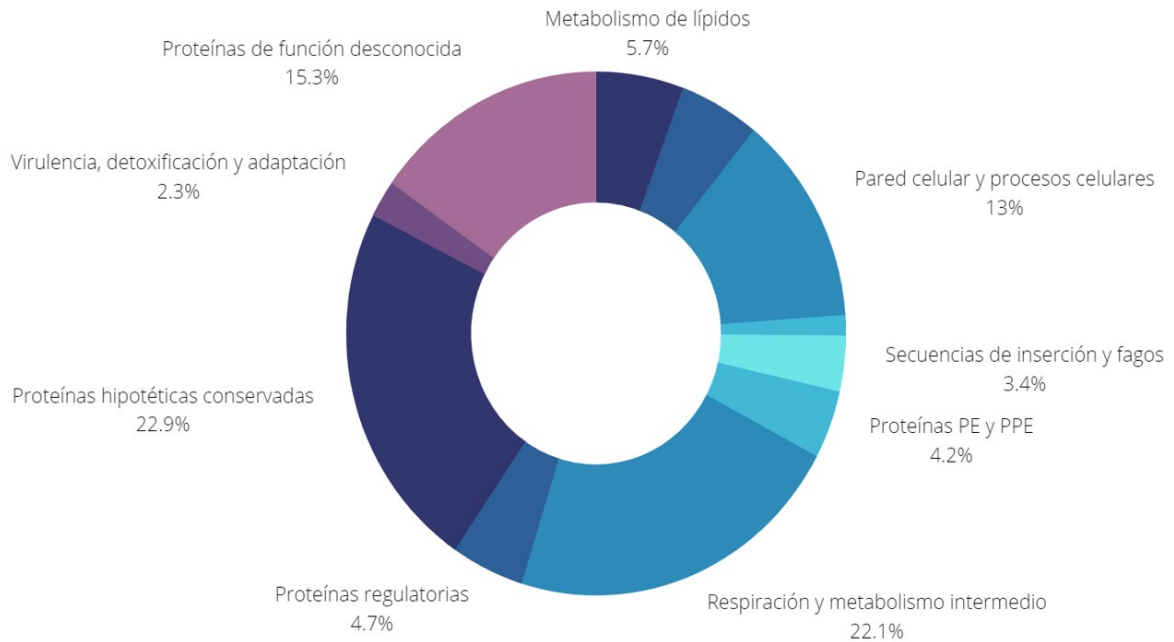


Figura 2.3: Anotación funcional de genes para *M. tuberculosis*.
Adaptado de Cole y Barrell, 1998.

medicamentos, polimorfismos asociados a esta resistencia en 53 genes e inclusive en las regiones regulatorias de los genes *inhA*, *pncA* y *ethA* (Papaventsis et al., 2017). Así mismo, pueden existir hasta 19 genes que codifican para mecanismos de resistencia a un mismo fármaco, como lo es el caso de la Isoniazida (Li et al., 2015).

Otro aspecto a considerar que puede contribuir a la resistencia de *M. tuberculosis* corresponde a los sistemas de reparación de ADN. Se ha encontrado evidencia de que estos sistemas juegan un papel relevante en la diversificación de genomas, y por tanto, en la resistencia a antibióticos (Perron et al., 2012). Dado que la infección por este patógeno puede ser latente y posteriormente activa, y que muchos medicamentos son inefectivos en la fase latente, el estudio de los circuitos de regulación génica que genere este cambio se hace relevante. Se ha descubierto que proteínas de reparación de ADN tienen un papel esencial en la transición entre las fases latente y activa de la infección (Gopinath et al., 2015).

2.1.4. Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y la principal causa de muerte asociada a un único agente infeccioso, con entre 1.1 y 1.7 muertes asociadas en la última década (World Health Organization, 2021). Esta infección se encuentra diseminada por todo el mundo y en 2019 afectó aproximadamente

a 10 millones de personas.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se marcó una disminución abrupta en los casos de tuberculosis a nivel mundial en el año 2020, con una diferencia del 18% con respecto al año 2019 (7.1 millones a 5.8 millones de casos), siendo India el país con mayor contribución a este fenómeno (World Health Organization, 2021). Lo anterior va en contraposición con la tendencia general de los años 2016 a 2020 exhibida en distintas regiones del mundo. Sin embargo, la mortalidad asociada a la infección por tuberculosis aumentó en 2020, con un estimado de más de 1.3 millones de muertes entre personas VIH-negativas y 214 mil en personas VIH-positivas (World Health Organization, 2021). Estas cifras son preocupantes si se considera que las muertes por VIH alcanzaron los 0.68 millones. La tuberculosis se posiciona como la 13va causa general de muerte a nivel global y la tercera considerando enfermedades infecciosas. Según lo reportado en el Informe Regional de Tuberculosis en las Américas de 2019, se estima que en el 2018 hubo 10 millones (9,0-11,1) de casos incidentes de tuberculosis a escala mundial. De ellos, 5,7 millones eran hombres y 3,2 millones mujeres de 15 años o más, y 1,1 millones eran menores de 15 años. Las personas con VIH representaron 9% del total de nuevas infecciones de tuberculosis.

2.1.4.1. Tuberculosis en América Latina y el Caribe

En América Latina se presentaron aproximadamente 290.000 casos de tuberculosis con cerca de 22.900 muertes asociadas (PAHO, 2020). Se estima que aproximadamente 54.000 pacientes no recibieron atención oportuna o no fueron diagnosticados correctamente (PAHO, 2020). La mayor parte de los países latinoamericanos reportan entre 10 a 49 casos por cada 100 mil habitantes, con excepción de Perú y Bolivia, que reportan 100 a 299 casos por cada 100 mil habitantes (Figura 2.4). La incidencia de casos para países de América Latina y el Caribe se observa en la Figura 2.5. *M. tuberculosis* es el patógeno responsable por la mayoría de las infecciones reportadas, sin embargo, también se han reportado casos de tuberculosis asociada a *M. bovis*, bacteria que afecta principalmente a bovinos (World Health Organization, 2013).

En cuanto a la farmacorresistencia en América latina, se estima que de cada 11000 pacientes con tuberculosis resistente, solo 5000 son diagnosticados correctamente, de los cuales solo el 89% reciben tratamiento y de estos, solo el 59% de los casos, concluye con la erradicación del patógeno (PAHO, 2020). La multi-resistencia de *M. tuberculosis* en Latinoamérica es un problema que cobra cada vez más relevancia. En particular, un 9% del total de casos de tuberculosis en Perú presenta resistencia a fármacos, comparado con un 3% tanto en Brasil como México. En el año 2017 solo el 33% de estos pacientes

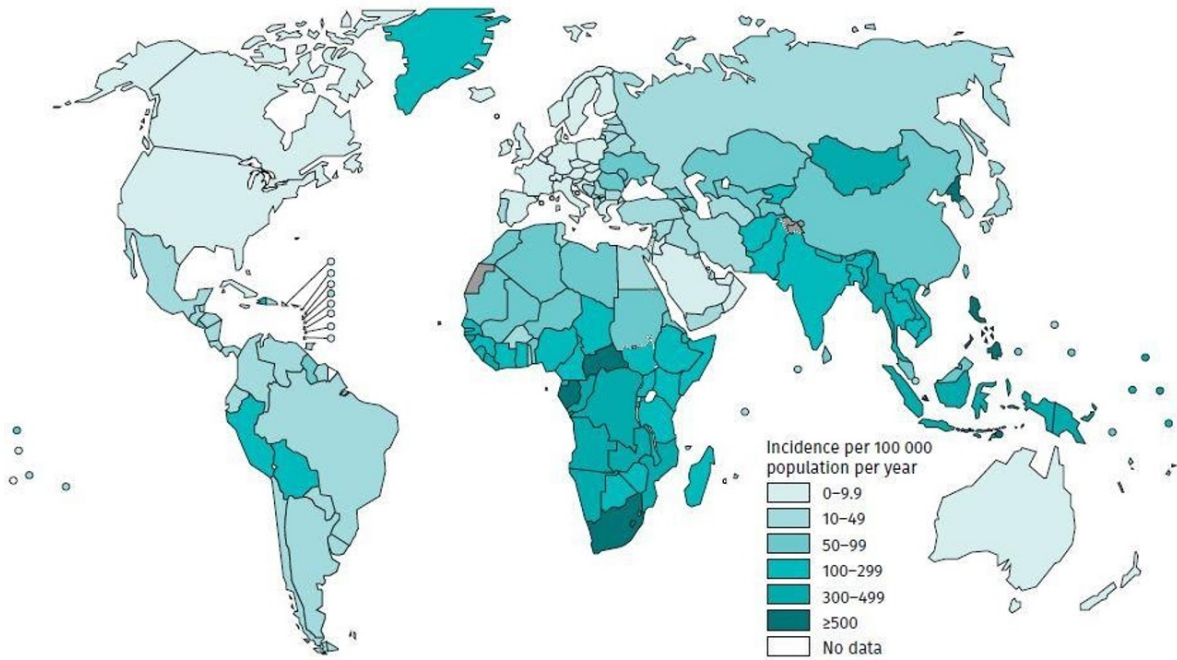


Figura 2.4: Casos estimados de infección por cada 100 mil habitantes . Tomado de World Health Organization, 2020.

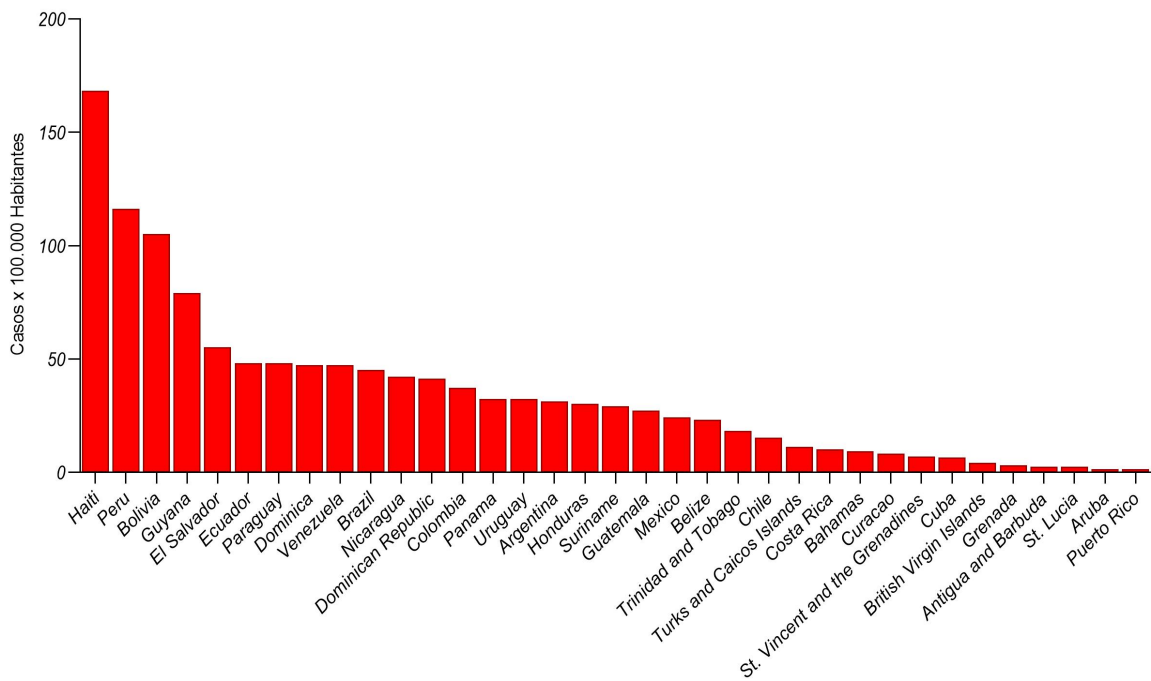


Figura 2.5: Incidencia de tuberculosis en América Latina . Adaptado de World Health Organization, 2021.

recibieron pruebas de resistencia a fármacos, lo que deja un preocupante estimado de 7 mil pacientes con tuberculosis resistente no diagnosticados o tratados. Además, la fracción de tratamiento exitoso de tuberculosis en el continente americano solo alcanzó un 56 % (PAHO, 2020).

La tuberculosis ha estado presente en América latina de forma histórica, en donde piezas cerámicas precolombinas sugieren que esta enfermedad fue la causa de la deformidad característica de gibbus torácico, que se ocasiona por la enfermedad de Pott de la espina dorsal (Mackowiak et al., 2005). A pesar de que los indígenas precolombinos provienen de ancestros que atravesaron el Estrecho de Bering, se tiene una alta diversidad de variantes de tuberculosis en Perú, la cual está compuesta por linajes Euro-Américanos pero no Siberianos, como se esperaría. Lo anterior es consistente con la teoría de que la tuberculosis fue traída hasta Latinoamérica por conquistadores europeos (Bos et al., 2014).

Un aspecto importante en el estudio epidemiológico de la tuberculosis ha sido la capacidad de distinguir entre genotipos de *M. tuberculosis*. Diferentes genotipos pueden tener diferentes velocidades de transmisión, siendo mas propensos a diseminarse en una población, presentar diferentes grados de resistencia a antibióticos o generar infecciones con mayor o menor gravedad (Gagneux et al., 2006; Pareek et al., 2013). En la actualidad, los fenotipos predominantes alrededor del mundo corresponden a los genotipos Haarlem, Latinoamérica-Mediterráneo, T, Este de África-India, Central-Asia, X y Beijing. La tabla 2.2 presenta la incidencia de los diferentes genotipos de *M. tuberculosis* en países de América Latina y el Caribe según lo reportado por (Woodman, Haeusler y Grandjean, 2019).

El genotipo Beijing es especialmente relevante dentro del MBTC al exhibir características de multi-resistencia y mayor virulencia. Este genotipo pertenece al linaje de Asia Oriental y es responsable de al menos un cuarto de los casos totales a nivel global (T. Luo et al., 2015). En Latinoamérica existen reportes de infecciones por el genotipo Beijing en la Región Metropolitana de Chile en el año 2014. Específicamente, se estudiaron 47 cepas de las cuales 43 fueron positivas para el gen *gyrB*, que confirma su pertenencia al *M. tuberculosis complex*. El 86 % de las 43 cepas estudiadas fueron asignadas a un genotipo previamente descrito en literatura, siendo el más frecuente LAM (39.5 %), seguido del genotipo T (32.5 %), H (7.0 %), Beijing (4.7 %) y X (2.3 %) (Meza et al., 2014). En el año 2015 se realizó un estudio de aislados de muestras clínicas en México, con 351 muestras de pacientes con tuberculosis pulmonar. De estas, se obtuvieron 68 aislados de *M. tuberculosis*. Durante este estudio realizado con marcadores moleculares (spoligotyping) se detectaron 31 patrones, con patrones únicos en 3 cepas,

los cuales no corresponden a ningún patrón preexistente en la base de datos SITVIT-WEB. La distribución de genotipos hallada por los investigadores fue T (33.8%), H (14.6%), LAM (13.3%), X (4.4%), S (2.9%) y genotipo desconocido (2.9%). Adicionalmente, se detectó multi-resistencia en 33 (48.5%) de los 68 aislados (Flores-Treviño et al., 2015).

Tuberculosis en Colombia: Según el Informe de evento tuberculosis Año 2021 emitido por el Ministerio de Salud y de la protección social, en Colombia, durante el año 2020 se presentaron 12588 casos de tuberculosis, con un comportamiento inusual a razón de la pandemia de COVID-19 por la baja captación de sintomáticos respiratorios en los prestadores de servicios de salud (Ministerio de Salud y de la Protección Social, 2021). Para el año 2021 según el protocolo de vigilancia de la tuberculosis emitido por el INS, se presentaron 14060 casos, siendo Colombia el cuarto país de Latinoamérica con más casos reportados (Instituto Nacional de Salud, 2022).

Al analizar el comportamiento de la tasa de incidencia por departamento de residencia, se evidencia que 23 entidades territoriales presentaron una tasa de incidencia superior a la tasa nacional (25,9 x 100 000 habitantes). Las tasas más altas se presentaron en orden descendente en: Amazonas, Risaralda, Meta, Barranquilla, Cali, Guaviare y Arauca. Por el contrario, las tasas más bajas se presentaron en orden ascendente en: San Andrés, Nariño, Boyacá, Sucre, Bolívar y Cundinamarca. Es necesario aclarar que en los departamentos que presentan menos del 25% de carga total de MTB, son zonas de territorios rurales o rurales disperso con bajo acceso a tecnologías de diagnóstico molecular en Colombia y de acceso a los servicios de salud, por cuanto son entidades objeto de mejora en el diagnóstico. El 84,3% de los casos reportados en el país corresponden a tuberculosis pulmonar (Ministerio de Salud y de la Protección Social, 2021).

En Colombia para el año 2020 se diagnosticaron 2309 casos de tuberculosis por pruebas de detección molecular equivalente a un 18.1%. De acuerdo a la Resolución 227 de 2020, todas las personas en quienes se sospeche la enfermedad deben realizarse diagnóstico mediante prueba molecular, cultivo líquido y radiografía de tórax (Ministerio de Salud y de la Protección Social, 2021).

Tabla 2.2: Incidencia de los diferentes genotipos de *M. tuberculosis* en países de Latinoamérica. Tomado de (Woodman et al., 2019).

País/región	LAM (%)	S (%)	H (%)	Beijing (%)	EAI (%)	T (%)	X (%)	No definido (%)
Acapulco/México	-	1.9	3.0	-	44.6	11.2	1.1	4.9
Baja California, México	19.3	13.6	14.3	4.3	2.1	-	-	35.0
Bogotá, Colombia	49.3	3.3	25.0	0.7	-	13.8	1.3	6.6
Rio Grande, Brasil	54.0	-	16.0	-	-	22.0	-	-
Rio Grande, Brasil	34.0	4.2	12.8	-	-	-	14.9	2.1
Rio de Janeiro, Brasil	43.6	-	18.3	0.5	2.3	34.9	0.5	-
Rio de Janeiro, Porte Alegre, y Belem, Brasil	66.2	2.5	9.7	0.5	3.0	2.0	5.2	10.1
Paraná, Brasil	26.9	-	12.7	-	-	11.8	-	-
Estado Minas Gerais, Brasil	66.3	1.9	5.8	-	-	14.4	1.9	8.7
Sao Paulo, Brasil	2.8	-	5.7	-	-	35.4	2.8	7.1
Sureste de Brasil (Presidarios)	50.0	-	11.5	-	-	8.7	5.7	9.2
Región Metropolitana, Chile	39.5	-	7.0	4.7	-	32.5	2.3	-
Perú	23.8	-	23.8	9.3	-	22.3	1.4	-
Perú	16.2	-	43.7	9.1	-	27.5	6.7	-
Santiago, Chile	23.9	-	22.1	-	7.1	29.9	-	-
Medellín, Colombia	39.6	-	48.7	-	-	-	-	6.4
Cali, Colombia	39.1	-	39.0	-	-	-	-	11.0
Departamento del Cauca, Colombia	24.0	-	-	-	-	-	-	40.0
Guyana Francesa	23.3	-	22.6	-	-	32.6	-	-
Bolivia	26.3	2.0	39.4	-	-	22.2	1.0	9.1
Paraguay	52.3	9.5	18.2	0.5	-	8.6	0.9	-
Venezuela	53.0	1.9	5.0	0.4	0.2	10.0	1.2	-

* Los porcentajes pueden no sumar el 100 % debido a reportes incompletos.

2.1.5. Tratamientos antituberculosos y farmacorresistencia

Los fármacos antituberculosos son moléculas con propiedades bioquímicas que actúan sobre dianas moleculares que afectan el ciclo de vida de las bacterias que hacen parte del MBTC. Estas sustancias químicas se aprovechan de distintos mecanismos que, en conjunto, buscan eliminar la infección por tuberculosis. Los medicamentos antituberculosos actúan sobre *M. tuberculosis* a través de tres mecanismos principales: (i) bloqueando las

enzimas involucradas en la síntesis de componentes de la pared celular (p. Ej., EMB), (ii) interrumpiendo la síntesis de proteínas a nivel de los ribosomas [p. Ej., estreptomina (STM)] y (iii) obstaculizando varios procesos a nivel de ADN, como la síntesis de ARN / ADN (p. ej., RIF, FQ) (Nasiri et al., 2017). Una mutación de resistencia puede alterar directamente la acción del fármaco o ser compensadora mediante la activación de una vía alternativa. Las mutaciones pueden causar resistencia a múltiples fármacos y contribuir a complejas interacciones gen-gen. La tabla 2.3 presenta los antibióticos más usados para el tratamiento de la tuberculosis y su clasificación según la OMS. A continuación, se presenta una breve descripción de estos fármacos y su mecanismo de acción.

Tabla 2.3: Clasificación de los fármacos antituberculosos según su acción por la OMS, 2016

Clasificación de antituberculosos (WHO, 2011)		Clasificación de antituberculosos (WHO, 2016)	
Grupo 1	Isoniacida	Grupo A	Levofloxacino
Primera línea:	Rifampicina	Fluoroquinolonas	Moxifloxacino
antituberculosos orales	Etambutol		Gatifloxacino
	Pirazinamida		
Grupo 2	Estreptomina	Grupo B	Estreptomina
Antituberculosos inyectables	Kanamicina	Segunda línea:	Kanamicina
	Amikacina	Antituberculosos inyectables	Amikacina
	Capreomicina		Capreomicina
Grupo 3	Levofloxacino	Grupo C	Etionamida/Protionamida
Fluoroquinolonas	Moxifloxacino		Cicloserina / Terizidona
	Gatifloxacino	Otros antituberculosos de segunda línea.	Linezolid
			Clofazimina
Grupo 4	Etionamida/Protionamida	Grupo D	D1: Pirazinamida
Segunda línea:	Cicloserina / Terizidona	Agentes complementarios	Etambutol
Bacteriostáticos orales	Ácido p-aminosalicílico	que no son componentes	Isoniacida en altas dosis*
Grupo 5	Linezolid	básicos del régimen de	D2: Bedaquilina
Antituberculosos con datos	Clofazimina	TB-MDR	Delamanida
limitados	Amoxicilina / Clavulanato		D3: Ácido p-aminosalicílico
	Imipenem / Cilastatina		Imipenem / Cilastatina
	Meropenem		Meropenem
	Isoniacida en altas dosis*		Amoxicilina / Clavulanato
	Tioacetazona		Tioacetazona
	Clarithromicina		

2.1.5.1. Antituberculosos de primera línea

Isoniacida: Esta molécula fue descubierta en 1952 luego de un proceso sucesivo de propuesta y descarte de fármacos antituberculosos potenciales, que inicio en 1940 con la estreptomina, el ácido p-aminosalicílico y los tiosemicarbazonas, los cuales fueron descartados por su alta toxicidad y rápido desarrollo de resistencia por parte de *M. tuberculosis*. En 1945 se descubrió la actividad antituberculosa de las moléculas basadas

en nicotinamida, que llevaron a otro hallazgo, las pirazinamidas. Posteriormente, en un intento de mejorar la actividad antituberculosa de la nicotinamida se descubrió un intermediario en el proceso de creación de γ -piridilaldeido, el ácido hidrazido isonicótico (abreviado isoniacida), el cual presentó una extraordinaria actividad antituberculosa, superior a todas las moléculas conocidas hasta el momento y convirtiéndose hasta la fecha en uno de los antibióticos contra tuberculosis más utilizados en los últimos 50 años (Vilchèze y Jacobs, 2007).

El mecanismo de acción de esta molécula es altamente selectivo hacia las micobacterias, especialmente a aquellas de lento crecimiento (Pansy, Stander y Donovan, 1952). La isoniacida se difunde pasivamente a la célula micobacteriana, matando a las células en división activa, siendo su acción bacteriostática durante las primeras 24 horas de tratamiento, tras las cuales es bacteriocida. A nivel molecular, la isoniacida inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos (α -alquil β -hidroxi ácidos grasos de 70 a 90 carbonos de longitud), los cuales son esenciales en la formación de la pared celular de las micobacterias (Vilchèze y Jacobs, 2007). La resistencia a este fármaco se presenta en cepas catalasa-negativas, cuyo análisis genético reveló que el gen responsable es *katG*. Variantes de este gen con mutaciones deletéreas o puntuales generan una catalasa-peroxidasa inactiva que no puede modificar químicamente a la prodroga isoniacida en un conjunto de especies altamente reactivas. Otro gen asociado a resistencia de este fármaco es *inhA* el cual puede conferir resistencia cruzada con etionamida, debido a una mutación puntual que causa la sustitución de aminoácido S94A. El gen *inhA* codifica para una proteína enoil-transportadora de acil (ACP por sus siglas en ingles) reductasa dependiente de NADH, perteneciente al sistema FASII o sistema de sintasa de ácidos grasos tipo II, involucrado en la biosíntesis de ácidos micólicos. En este sentido, la isoniacida genera la acción antituberculosa al formar un complejo covalente con NAD, inhibiendo la acción de la una proteína enoil-transportadora de acil (ACP por sus siglas en ingles) reductasa dependiente de NADH (Vilchèze y Jacobs, 2007).

Rifampicina: Este antibiótico de amplio espectro es un miembro semisintético de la clase de las rifamicinas, producidas por la bacteria *Nocardia mediterranei*. La rifampicina ejerce su acción antibiótica a través de la inhibición de la síntesis de ARN. Como consecuencia, la síntesis de proteínas decrece significativamente, llevando a la terminación de la replicación bacteriana. Específicamente, este fármaco inhibe la polimerasa de ARN dependiente de ADN, en un sitio de acción altamente específico que solo está presente en las enzimas de origen bacteriano y no en sus homólogos eucariotas (Hartmann et al., 1985). La rifampicina ejerce su acción antibiótica a través de la interferencia en

la elongación de la nueva cadena de ARN sintetizada por la polimerasa, específicamente en su subunidad β . La resistencia a este fármaco se presenta por mutaciones puntuales en el gen *rpoB* (15 mutaciones) (Telenti, Imboden et al., 1993). Específicamente, mutaciones en los residuos 516, 526 y 531 de la secuencia codificante para la subunidad β predominan en las muestras resistentes aisladas. Una mutación puntual altamente predominante corresponde a Ser531Leu, no obstante, se ha recopilado mutaciones puntuales en 12 codones diferentes, 2 inserciones en uno a dos codones y 7 deleciones en uno a tres codones (Goldstein, 2014).

Pirazinamida: La pirazinamida es un análogo de la nicotidamida sintetizado químicamente en 1936. Sin embargo, su actividad antituberculosa solo fue descubierta hasta 1952. A partir de 1970, esta droga fue utilizada como una segunda línea de defensa ante la infección por tuberculosis, especialmente en el caso de infecciones resistentes o tratamientos por recaídas. Posteriormente, el British Medical Research Council realizó pruebas clínicas que finalmente llevaron hasta el tratamiento actual de tuberculosis, basado en una mezcla de isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (Y. Zhang et al., 2014).

El mecanismo de acción de este fármaco es altamente inusual, puesto que no presenta actividad primaria en bacterias en fase de división activa, por el contrario, su actividad se ve incrementada en presencia de actividad metabólica disminuida. Una de sus características es que solo es activa en pH ácido (5.5), lo cual le permite una alta eficiencia durante procesos inflamatorios. Esta molécula es una prodroga que llega a su forma activa cuando es asimilada por la enzima pirazinamidasa/nicotinamida codificada por el gen *pncaA*. El mecanismo de acción propuesto para esta sustancia inicia con su ingreso a la célula a través de difusión pasiva en donde se convierte en ácido pirazinóico ($pK_a = 2.9$), el cual sale de la célula por difusión pasiva y un mecanismo de flujo deficiente. Si el exterior de la célula es ácido, el ácido pirazinóico se protonará sin carga reingresando a la célula. El flujo neto de la forma protonada del ácido puede eventualmente volverse mayor que el flujo de salida, llevando a una acumulación de esta sustancia dentro de la célula, disminuyendo el pH intracelular e inhibiendo el funcionamiento de múltiples enzimas. Adicionalmente, el ácido pirazinóico puede colapsar la fuerza motriz de protones de la membrana celular bacteriana, afectando el transporte de la membrana que inhibe la síntesis de ARN y proteínas (Y. Zhang et al., 2014).

La pirazinamida afecta a la proteína ribosomal S1 (gen *rpsA*) inhibiendo la remoción de productos tóxicos de la traducción de proteínas. También puede afectar la proteína aspartato descarboxilasa (gen *panD*) de la cual depende la síntesis de β -alanina (pre-

cursor de pantotenato y coenzima A). Lo anterior explica el funcionamiento de este fármaco en condiciones desfavorables para la bacteria como estrés, hipoxia, entre otras (Y. Zhang et al., 2014).

La resistencia a pirazinamida puede darse por mutaciones deletéreas en el gen *pncA*, que ocasionan pérdida de actividad pirazinamidasa. Específicamente, mutaciones de sentido erróneo que ocasionan sustituciones de aminoácidos por inserción o delección de nucleótidos, mutaciones en el gen estructural o en su región promotora. A pesar de que se presenta una elevada diversidad de mutaciones en este gen, las mismas se concentran en tres clusters: 3-17, 61-85 y 132-142. Estas regiones contienen sitios catalíticos de la enzima pirazinamidasa (unión a metales). Por otra parte, se han encontrado mutaciones en el gen *rpsA* que confieren resistencia. Entre las mutaciones encontradas se tienen Thr5Ala, Pro9Pro, Thr10Ala y Glu457Glu. Adicionalmente, una minoría de los casos de resistencia se dan por mutaciones en el gen *panD* (Y. Zhang et al., 2014).

Etambutol: El etambutol es uno de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis junto con la isoniacida, rifampicina y pirazinamida. Esta molécula ejerce una acción bacteriostática que interfiere con la biosíntesis de arabinogalactano en la membrana celular bacteriana afectando la replicación celular. Sin embargo, su mecanismo de acción molecular permanece elusivo. Se especula que el etambutol tiene efectos sinérgicos con la isoniacida a través del represor transcripcional del gen *inhA* (Lee y Nguyen, 2021). No obstante, un estudio indica que el etambutol se une al regulador transcripcional *TetR*, lo que aumenta la sensibilidad del gen *inhA* a la isoniacida (Zhu et al., 2018). La resistencia a etambutol está dada principalmente por mutaciones en el operón *emb* que involucra los genes *embA*, *embB* y *embC* junto con cuatro regiones codificadoras potenciales. Estos genes son ejemplos representativos de duplicación genética, codificando proteínas con una similitud del 61 % al 68 %. Mutaciones asociadas con resistencia involucran *embB* Met306Val y I303F (Telenti, Philipp et al., 1997).

Estreptomina: Descubierta en 1944, fue el primer agente antimicrobiano con actividad comprobada contra *M. tuberculosis*. Es un antibiótico aminoglucósido de estreptidina inyectable que inhibe la síntesis de proteínas y provoca la muerte de las células microbianas. Es un antibiótico de amplio espectro. La estreptomina actualmente se clasifica como un agente de segunda línea del grupo C para uso en regímenes más largos de TB-MDR. Su uso generalizado inicial condujo a la aparición temprana de resistencia antibiótica, lo que posteriormente limitó su utilidad clínica. En 2019, las pautas de

tratamiento de la tuberculosis de la OMS se actualizaron para recomendar solo el uso limitado de estreptomicina, a favor de agentes más nuevos o amikacina como el aminoglucósido preferido para *M. tuberculosis* resistente a los medicamentos. Sin embargo, la aparición de resistencia a fármacos más nuevos, como la bedaquilina, ha llevado a un nuevo análisis de los fármacos antituberculosos en busca de un potencial sin explorar (Cohen et al., 2020).

2.1.5.2. Antituberculosos de segunda línea

Kanamicina: Este fármaco pertenece al grupo de los aminoglucósidos de amplio espectro, siendo activo tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Elks, 2014). El mecanismo de acción la kanamicina es su unión al ARNr 16S en la subunidad ribosomal 30S, inhibiendo la síntesis de proteínas. El mecanismo de acción de los ciclo péptidos como la kanamicina no esta completamente elucidado en *M. tuberculosis* pero se sospecha que interfiere con la traducción de proteínas e inhibe la síntesis de fenilalanina en los ribosomas micobacterianos. Entre las mutaciones que confieren resistencia a kanamicina presentes en *M. tuberculosis* se tienen los genes *rrs* (37 mutaciones únicas), *tlyA* (30 mutaciones únicas), *gidB* (15 mutaciones únicas) y el promotor *eis* (12 mutaciones únicas), de las cuales 82 corresponden a mutaciones puntuales, 6 a deleciones y 6 a inserciones (Georghiou et al., 2012).

Etionamida: La etionamida o 2-etiltioisonicotinamida es un análogo estructural de la isoniacida con efectividad contra cepas resistentes a isoniacida. Además, se ha comprobado la eficacia de este fármaco en combinación con pirazinamida en infecciones resistentes, lo que la ha convertido en una droga de segunda línea para el tratamiento de tuberculosis. La resistencia a esta molécula está dada principalmente por cambios en la enzima InhA, codificada por el gen *inhA*, específicamente la mutación S94A. Dicha mutación genera la perdida de una molécula de agua y la disrupción de una red de enlaces de hidrógeno que impiden la unión del fármaco a la enzima. Otras mutaciones en *inhA* son c-8t, c-15t y c-17t en la región promotora del gen. Otros genes involucrados en la resistencia a etionamida son *ndh* y *ndhA* (alteración del potencial redox), *mshA* y *mshC* (alteración de la síntesis de micotioles), *nudC* (degradación de los complejos etionamida-NAD), *ethA* (activación del fármaco), *ethR* (regulador del gen *ethA*) (Vilchèze y Jacobs Jr, 2014).

Cicloserina: La cicloserina o R-4-amino-1,2-oxazolidin-3-ona, actúa sobre la síntesis de la membrana celular e inhibe el crecimiento bacteriano. Al ser un análogo de la D-

alanina tiene como diana terapéutica a dos enzimas involucradas en la etapa citosólica de la síntesis de péptidoglicanos: la alanina racemasa (Alr) y la D-alanina:D-alanina ligasa (Ddl). La primera de estas enzimas es dependiente de piroxal 5-fosfato que convierte L-alanina en D-alanina. La segunda enzima corresponde a una ligasa dependiente de ATP que une dos moléculas de D-alanina. Este dipéptido C-terminal está presente en las cadenas de pentapéptidos de monómeros peptidoglicanos maduros (Prosser y Carvalho, 2013). A nivel de resistencia, la acción de la cicloserina puede ser inhibida por mutaciones en el gen *ald* (L-alanina deshidrogenasa) y *alr* (Desjardins et al., 2016).

Moxifloxacino: Este fármaco pertenece a la familia de las fluoroquinolonas, las cuales son altamente efectivas contra *M. tuberculosis*, siendo recomendadas en casos de resistencia antibiótica. El moxifloxacino es una fluoroquinolona de cuarta generación que contiene un grupo 8-metoxi y un anillo diazabiclononil hidrofóbico con una configuración S,S en la posición 7, lo que reduce la habilidad *M. tuberculosis* para expulsar la droga mediante bombas de eflujo. Se recomienda el uso de moxifloxacino cuando exista intolerancia a alguna de las drogas de primera línea o en casos de mono-resistencia a isoniazida. Este antibiótico afecta tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, su mecanismo de acción corresponde a una unión a las enzimas ADN girasa o topoisomerasa II, lo que previene la replicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano. Se especula que este proceso se da en dos pasos: formación de un complejo bacteriostático quinolona - ADN girasa, seguido de la fragmentación del cromosoma. Adicionalmente, se ha demostrado la habilidad única del moxifloxacino para matar bacterias de *M. tuberculosis* en ausencia de síntesis de proteínas o durante el estado latente, lo cual es útil en casos de TBLA y la prevención de recaídas. La resistencia a este fármaco, o a las fluoroquinolonas en general, ocurre como resultado de mutaciones puntuales dentro de la región de resistencia a quinolonas (QRDR) presente en la enzima ADN girasa A (*gyrA*) y ADN girasa B (*gyrB*). Las mutaciones más frecuentes en *gyrA* ocurren en los codones A90V, S91P, D94G, D94A, D94Y, D94N, D94H. También, mutaciones dobles en ambos genes han sido reportados (Naidoo et al., 2017).

Bedaquilina (BDQ): La bedaquilina es una diarilquinolina. Este fármaco es el único antituberculoso que tiene como diana el metabolismo energético de las micobacterias. Específicamente, la bedaquilina ataca a la enzima ATP sintasa, siendo este un mecanismo de acción altamente efectivo al no depender del estado celular de la bacteria (activa, latente, en replicación activa, extracelular o intracelular). Un potencial mecanismo de resistencia se da por dos mutaciones en el gen *atpE*. Estas mutaciones evitan que la

bedaquilina inhiba el paso de cationes, y por tanto, que la síntesis de ATP se detenga. En un estudio se planteo que otro posible mecanismo de resistencia a bedaquilina seria el mismo que el de clofazimina a través de una mutación en el gen que codifica para la proteína Mmpl5, la cual expulsa sideroforos (micobactinas y carboximicobactinas), esenciales para la adquisición intracelular de hierro (Esposito, Bianchini y Blasi, 2015).

Linezolid: Este fármaco ha sido la primer oxazolidinona que ha sido desarrollada y aprobada para uso clínico. Presenta actividad ante una alta diversidad de bacterias, sin embargo, su uso principal corresponde al tratamiento de enfermedades infecciosas Gram-positivas incluyendo *M. tuberculosis*. Su mecanismo de acción corresponde a una inhibición de la síntesis de proteínas en hasta un 90 % mediante la prevención de la formación del complejo funcional de iniciación de la traducción. Específicamente, esta molécula inhibe la formación de los complejos de iniciación ribosomales que involucran los ribosomas 30S y 70S en *Escherichia Coli* y 70S en *Staphyococcus aureus*. También, se especula que las oxaolidinonas se acoplan a las subunidades 50S, distorsionando el sitio de unión del factor de iniciación ARN^tfMet y evitando la formación del complejo de iniciación (Clemett y Markham, 2000). A nivel de resistencia, la mutación predominante en *M. tuberculosis* corresponde T460C en el gen *rplC*, el cual codifica para una proteína ribosomal (Beckert et al., 2012).

Delamanida: Esta molécula, derivada nitro-dihidro-imidazooxazol presenta actividad antimicobacteriana in vitro altamente selectiva, sin mostrar actividad contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas o de la flora intestinal. Los derivados de nitroimidazo piranos actúan a través de la inhibición de la biosíntesis de ácido micólico, previniendo la formación de la pared celular y facilitando el ingreso de otros medicamentos. La delamanida es una prodroga que se activa por acción de la enzima nitroreductasa dependiente de deazaflavina, siendo uno de sus intermediarios de reacción la molécula activa con propiedades antituberculosas. La resistencia a este fármaco puede darse por una mutación en alguna de los cinco genes que codifican para la enzima F420: *fgd*, *Rv3547*, *fbiA*, *fbiB* y *fbiC*. En análisis *in vitro* se ha encontrado carencia de conversión de delamanida a su forma activa, mientras que en análisis *in vivo* la resistencia puede observarse en pacientes tratados con otros medicamentos antituberculosos. No obstante, no se ha observado resistencia cruzada entre delamida y rifampicina, isoniacida, etambutol o estreptomycin (Esposito, Bianchini y Blasi, 2015).

Clofazimina: Esta molécula pertenece a la familia de la riminofenazina, desarrollada inicialmente en la década de 1950 como un antituberculoso. A pesar del temprano descubrimiento de esta sustancia, su mecanismo de acción no ha sido plenamente identificado. Se cree que la clofazimina genera múltiples efectos en la bacteria, como reducción del potencial redox que desestabiliza la membrana celular y la producción de especies reactivas de oxígeno. Entre los mecanismos de resistencia a este fármaco se han identificado mutaciones en el gen *rv0678*, que codifica para un represor transcripcional, la mutación G265T en el gen *rv2535*, que codifica para una peptidasa putativa, la mutación T1052C en el gen *rv1979c*, que codifica para una permeasa para transporte de aminoácidos, entre otros (S. Zhang et al., 2015).

Carbapenémicos (Imipenem, Meropenem, Ertapenem) Este tipo de sustancias pertenecen al grupo de penicilinas de amplio espectro. Estos fármacos presentan actividad contra las proteínas de unión a penicilinas y contra las L,D-transpeptidasas mediante una unión covalente e irreversible, lo que evita la formación de entrecruzamientos 3-3 en los peptidoglicanos de la pared celular. Adicionalmente, los carbapenémicos no son neutralizados por la β -lactamasa BlaC presente en micobacterias. Como posibles mecanismos de resistencia se consideran permeabilidad reducida, menor afinidad a las proteínas de unión a penicilinas, mutaciones en β -lactamasas y bombas de flujo capaces de expulsar este tipo de compuestos (Esposito, Bianchini y Blasi, 2015). La tabla 2.4 presenta los genes asociados a resistencia antibiótica en *Mycobacterium tuberculosis*.

2.1.6. Diagnóstico de la Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por tener una fase latente prolongada y difícil de detectar, junto con una fase activa que puede ser altamente perjudicial para el paciente, así como altamente infecciosa. Existen diversas opciones para el diagnóstico de la tuberculosis y su uso depende del propósito de la prueba (Detección de LTBI, tuberculosis activa o resistencia antibiótica). Dentro de las técnicas para la identificación de la tuberculosis se encuentran las técnicas de imagen como la radiografía torácica, microscopía directa como la baciloscopia y la microscopía de fluorescencia, pruebas de detección de antígeno, cultivo y técnicas de biología molecular. Sin embargo, sólo las dos últimas permiten identificar la enfermedad y la resistencia antibiótica al tiempo (Pai, M. P. Nicol y C. C. Boehme, 2016). A continuación, se hace una breve descripción de los métodos más comunes utilizados para el diagnóstico de tuberculosis, sus ventajas y desventajas.

Tabla 2.4: Genes asociados a resistencia antibiótica en *M. tuberculosis*

Antibiótico	Genes asociados a resistencia a antituberculosos
Isoniacida (INH)	<i>ahpC, inhA, katG, mshA, ndh, Rv1258c, Rv2752c</i>
Rifampicina (RIF)	<i>rpoB, rpoA, rpoC, Rv2752c</i>
Etambutol (EMB)	<i>embA, embB, embC, embR, ubiA</i>
Pirazinamida (PZA)	<i>pncA, clpC1, panD, Rv1258c, PPE35, Rv3236c</i>
Fluoroquinolonas (FQ)	<i>gyrA, gyrB, None</i>
Bedaquilina (BDQ)	<i>pepQ, Rv0678, mmpL5, mmpS5, atpE, Rv1979c</i>
Linezolid (LZD)	<i>rplC, rrl</i>
Clofazimina (CFZ)	<i>pepQ, Rv0678, mmpL5, mmpS5, Rv1979c</i>
Delamanid (DLM)	<i>fgd1, ddn, fbiA, fbiB, fbiC, Rv2983, None</i>
Amikacina (AMK)	<i>rrs, eis, whiB7, whiB6, ccsA, fprA, aftB</i>
Estreptomicina (STM)	<i>rrs, rpsL, gid, whiB7, Rv1258c, whiB6</i>
Etionamida (ETO)	<i>inhA, ethA, ethR, mshA, Rv3083, ndh</i>
kanamicina (KAN)	<i>rrs, eis, whiB7</i>
Capreomicina (CAP)	<i>rrs, tlyA, whiB6, ccsA, fprA, aftB</i>

2.1.6.1. Prueba de tuberculina de Matoux

Esta prueba diagnóstica ha sido un estándar para la detección de tuberculosis, siendo ampliamente utilizada alrededor del mundo debido a su bajo costo y facilidad de administración. A pesar del extendido uso de esta prueba, la interpretación de sus resultados es altamente variable, ya que depende de las condiciones del paciente como la edad, estado inmunológico, comorbilidades y vacunación previa, las cuales pueden afectar la veracidad del resultado de la prueba de tuberculina (I. Shah, 2012). Adicionalmente, esta prueba es altamente no específica en niños, sin importar si los mismos ya han sido vacunados o no, lo cual puede deberse a condiciones fisiológicas de estos pacientes, que incluyen estados de desnutrición (Rehman et al., 2018).

A pesar de la facilidad de implementación de la prueba tópica de tuberculina, la alta incertidumbre en sus resultados ha llevado a la necesidad de investigar otros métodos de diagnóstico que conserven su practicidad, velocidad y costo, pero con un aumento significativo en la certeza de sus resultados. Uno de estos métodos corresponde a la prueba de sangre, la cual se remonta hasta el año 1990 con las pruebas de interferón γ , diseñadas para detectar la infección latente por tuberculosis. Las pruebas en sangre detectan la producción de interferón γ realizada por las células sanguíneas mononucleares

expuestas a péptidos diseñados para estimular los antígenos de *M. tuberculosis*. Este tipo de pruebas presentan ventajas sobre la prueba tópica como una única visita por paciente, una cuantificación objetiva y reactivos específicos (diana antigénica secretoria temprana 6 [ESAT-6], proteína de filtrado de cultivo [CFP-10] y TB.7) (LoBue y Castro, 2012).

2.1.6.2. Radiografía de tórax

La infección por tuberculosis puede alojarse en los pulmones generando granulomas en el espacio pleural y la partición del pecho. Regularmente, los granulomas licuados pueden quedar remanentes en el espacio pleural, causando reinfección. Después que este tipo de granulomas crece radicalmente y comprime el pulmón se produce dificultad respiratoria. Este tipo de crecimiento puede diagnosticarse a través de radiografías de tórax, en donde la infección se observa como una masa blanca dentro del pulmón. Dependiendo del lugar en que se desarrolle la infección se puede clasificar de diferentes maneras: cavitaria si se da en los lóbulos o parte superior de lo pulmones; miliar cuando se presentan manchas dispersas por toda el área pleural; finalmente laríngea, cuando la infección se presenta en la laringe, siendo este tipo de tuberculosis extremadamente infecciosa (Jemal, 2019). Las radiografías de tórax actualmente siguen siendo uno de los métodos principales de diagnóstico de tuberculosis (Skoura, Zumla y Bomanji, 2015).

2.1.6.3. Microbiología diagnóstica

Los métodos de diagnóstico mediante cultivo generan una confirmación absoluta de *M. tuberculosis*. Sin embargo, requiere tiempos prolongados que pueden superar las 2 semanas, llegando inclusive a las 6 semanas. El cultivo se realiza generalmente a 37C y condiciones anaerobias, ya sea en agar sólido o medio líquido. El principal tipo de muestra utilizada para el cultivo microbiológico es el esputo. El conteo viable de unidades formadoras de colonias promedio para este tipo de muestra es de 7.39/ml y un número probable de microorganismos promedio de 8.37/ml (Dhillon, Fourie y Mitchison, 2014). El cultivo directo del microorganismo ofrece ventajas tales como la caracterización de la resistencia antibiótica.

Otra prueba microbiológica empleada en muchos países incluido Colombia para el diagnóstico de la tuberculosis, es la baciloscopia de esputo. Este método consiste en la identificación del bacilo por microscopía directa de muestras de esputo tomadas al paciente de forma seriada. Esta prueba sólo permite la detección de la mitad de los casos de tuberculosis y no permite identificar la farmacorresistencia.

2.1.6.4. Pruebas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis

Las pruebas de diagnóstico molecular basadas en PCR emplean como principio de identificación la hibridación de cebadores moleculares específicos sobre el genes diana, como es el caso del gen *rpoB*, causante de hasta el 95 % de los casos de tuberculosis resistente a la rifampicina y que a su vez codifica para una subunidad de la RNA polimerasa del microorganismo, permitiendo la identificación clínica del bacilo y casos de resistencia en menos de 24 horas. El uso de pruebas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis se ha ampliado considerablemente desde 2010, cuando la OMS recomendó por primera vez el uso de la prueba rápida Xpert MTB/RIF, la cual detecta de forma simultánea la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina. En Latinoamérica la disponibilidad de pruebas de diagnóstico molecular rápido ha aumentado notablemente, pasando de los 11 equipos que había en el 2011 a 591 del 2019 (PAHO, 2020). El diagnóstico de casos de tuberculosis con estas pruebas aumentó de 13,1 % en el 2017 a 25,0 % en el 2019. Sin embargo, la baciloscopia sigue siendo el método más utilizado para el diagnóstico inicial de la tuberculosis en la Región de las Américas. A continuación, se describen las técnicas moleculares de uso clínico más empleadas:

Xpert MTB/RIF La prueba Xpert MTB/RIF desarrollada por la empresa Cepheid Inc. es una prueba automatizada para el diagnóstico de tuberculosis basada en la detección de ácidos nucleicos específicos del bacilo tuberculoso en cualquier muestra orgánica. Esta prueba contiene de manera integrada los tres pasos requeridos para el análisis molecular de la muestra biológica, como lo es la extracción del ADN, su amplificación y la detección de la enfermedad. Las pruebas moleculares Gene Xpert MTB/RIF consisten en una amplificación de los ácidos nucleicos basada en cartuchos (NAAT) para el diagnóstico rápido simultaneo de la tuberculosis y su sensibilidad antibiótica (Helb et al., 2010). Esta técnica molecular desarrollada por la Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey en colaboración con Cepheid inc, purifica y concentra los bacilos tuberculosos a partir de muestras de esputo, aísla el material genómico de las bacterias capturadas por zonificación y posteriormente amplifica el ADN genómico por PCR. El proceso identifica la mayoría de las mutaciones inductoras de resistencia a la rifampicina clínicamente relevantes presentes en el gen *rpoB*, para lo cual emplea sondas fluorescentes denominadas balizas moleculares. (C. C. Boehme et al., 2011). Cada una de las cinco sondas posee mutaciones que inhiben su unión al ADN muestra, interrumpiendo así la señal de la sonda respectiva. Por lo tanto, cuando Xpert detecta una mutación, al menos una sonda no se une. Ciertas mutaciones que interfieren completamente con la unión de la sonda dan como resultado un abandono o ausencia de la

sonda, mientras que las mutaciones que permiten la hibridación limitada de la sonda están representadas por sondas retardadas. Los resultados se obtienen de muestras de esputo sin procesar en 90 minutos, con un riesgo biológico mínimo y muy poca capacitación técnica requerida para operar. Esta prueba molecular puede detectar la presencia de *M. tuberculosis* en muestras en menos de dos horas e inclusive, puede detectar la resistencia a Rifampicina mediante el cebador del gen *rpoB* (Steingart et al., 2013).

Existen numerosos estudios que comparan la efectividad de las técnicas de detección por amplificación con respecto a técnicas de cultivo directo, como las realizadas por Piersimoni y colaboradores en 2019, quienes reportan tasas de sensibilidad entre el 87 % y el 95 % para Xpert MTB/RIF Ultra y alrededor del 75 % para Xpert MTB/RIF (Piersimoni et al., 2019). Las pruebas de diagnóstico molecular, pese a lograr un diagnóstico rápido, presentan una sensibilidad intermedia, mejor que la microscopía de frotis, pero menor que el cultivo directo del microorganismo, con el riesgo de resultados falsos negativos (Allahyartorkaman et al., 2019). Adicionalmente, pueden presentar disminución en su sensibilidad en pacientes co-infectados con VIH (Vergara Gómez, González-Martin y Garcia-Basteiro, 2017; Bahr et al., 2018). Pese a los valores de sensibilidad y especificidad de este método para detectar resistencia a rifampicina (R), se han observado discrepancias entre los resultados fenotípicos y moleculares, por lo que cuando se detecta una resistencia a R por el Xpert MTB/Rif, pero el método fenotípico señala sensibilidad, sólo la secuenciación del gen *rpoB* efectuada en laboratorios de referencia puede resolver la discordancia y confirmar o descartar una TB-RR (Arias y Herrera, 2016). Se estima que cuando la prevalencia de la resistencia a la R es menor al 2 % en una población, un test positivo tiene 50 % de posibilidades de ser un error de laboratorio. En la práctica, en los casos en que se detecta TB-RR con el Xpert MTB/RIF, para garantizar que no se trata de un falso positivo, por errores pre y post analíticos, se recomienda repetir el Xpert MTB/Rif en una segunda muestra distinta del paciente. Esto es especialmente necesario en pacientes que no están en grupos de riesgo de resistencia a rifampicina y en países con baja prevalencia de TB-RR (Arias y Herrera, 2016).

Xpert MTB/RIF ULTRA Desde el lanzamiento de la prueba Xpert MTB/RIF se han desarrollado cuatro generaciones, las cuales han mejorado parámetros del diagnóstico a través de la combinación de diferentes software y cartuchos. La cuarta generación (G4) tiene además modificaciones que mejoran la detección de resistencia a rifampicina. Sin embargo, para mejorar aún más la sensibilidad de esta prueba, la empresa Cepheid desarrolló el test Xpert MTB/RIF Ultra a través de reingeniería de su antecesor, con un nuevo cartucho que puede ser leído en máquinas previas con tan solo una actua-

lización de software. Ultra incorpora dos dianas de ampliación de múltiples copias y una cámara de amplificación de ADN de mayor volumen (World Health Organization, 2017). Adicionalmente, se ha reportado que Ultra mejoró el límite de detección a 15.6 UFC/mL de muestra (esputo) en comparación con 112.6 UFC/mL requerida por Xpert MTB/RIF (Chakravorty et al., 2017). En otro estudio se determinó que Ultra presenta una sensibilidad del 85 al 91 % con especificidad del 94 al 97 % (Horne et al., 2019).

Ensayos de sensibilidad para las pruebas moleculares gene Xpert Numerosos estudios comparan la efectividad de las técnicas de detección por amplificación con respecto a técnicas de cultivo directo, como las realizadas por Piersimoni et al., en 2019, quienes reportan tasas de sensibilidad entre el 87 % y el 95 % para Xpert MTB/RIF Ultra y alrededor del 75 % para Xpert MTB/RIF (Piersimoni et al., 2019).

Las pruebas de diagnóstico molecular, pese a lograr un diagnóstico rápido, presentan una sensibilidad intermedia, que si bien, es mejor que la microscopía de frotis, resulta menor que el cultivo directo del microorganismo, con el riesgo de resultados falsos negativos (C. C. Boehme et al., 2011; (helb2010rapid)). Adicionalmente, pueden presentar disminución en su sensibilidad en pacientes co-infectados con VIH y niños (Atherton et al., 2019). La tabla ?? presenta mutaciones asociadas a la región RRDR en estudios de diferentes regiones geográficas.

En 2015 Sánchez y colaboradores, identificaron que la mutación rpoB I491F se expresaba en el 30 % de las cepas aisladas de Mycobacterium tuberculosis en Swazilandia, dicha mutación no se detecta mediante el uso de Xpert MTB/RIF y había sido catalogada como una mutación de baja frecuencia en aislamientos clínicos de otras regiones del mundo como Hong Kong y Australia (Siu et al., 2011), lo que implica una reducción en la sensibilidad del diagnóstico por Xpert MTB/RIF en Swazilandia y presumiblemente da como resultado un diagnóstico insuficiente y un tratamiento potencialmente inadecuado (Elisabeth Sanchez-Padilla et al., 2015).

En 2023 Truman y colaboradores compararon los resultados de Xpert MTB /XDR y análisis de secuenciación de genoma completo para aislamientos de tuberculosis de la península balcánica, encontrando que WGS reveló mutaciones menos conocidas en genes que confieren resistencia a INH y ETH que no eran detectadas por la técnica Xpert XDR, como es el caso de mutaciones dispersas a lo largo del gen ethA. La prueba Xpert MTB/XDR no cuenta con marcadores moleculares únicos para la identificación de dichas mutaciones (Truden, Sodja y Žolnir-Dovč, 2023). En 2022 Ule y colaboradores realizaron una evaluación de Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de tuberculosis en un laboratorio de referencia, encontrando mediante secuenciación del gen rpoB la presencia

Tabla 2.5: Mutaciones asociadas a la región RRDR en estudios de diferentes regiones geográficas.

País y año de publicación	Mutaciones dentro de RRDR	Mutaciones fuera de RRDR	Fuente
Brasil (2015)	Ser531Leu, Ser531Trp, Asp516Phe	Phe505Val e Ile572Val	Prim et al., 2015
India (2015)	Ser531Leu, His526Tyr, Asp516Val Arg511Cys, Val 513 Asp, Glu521Asp	Asn413His, Asp 435Glu y Ala451Asp	Tgirimurugana et al., 2015
Vietnam (2011)	Ser531Leu, Ser531Trp, Ser531Phe, Ser531Gln, His526Leu, His526Asn, His526Arg, His526Tyr y His526Ser Asp516Val, Leu530Met	Gln490His y Gln490Arg	Minh et al., 2011
Sudáfrica (2016)	MDR-TB - Ser531Leu, His526Leu, Asp516Tyr, Leu533Pro, XDR-TB - Asp516Gly y Leu533Pro, S531L	Pro535Thr, Ile572Met, Tyr645His	Dookie et al., 2016
China (2010)	codón no. 531, 526, 516, 511, 522, 533, 550, 509 y 572	Val550Leu	Chen et al., 2010
Pakistán (2014)	Ser531Leu, Asp516Val y Asp516Tyr. Ser512Ile, Leu533Pro		Qazi et al., 2014
Tailandia (2014)	Ser531Leu e His526Cys, Gly523Ala Leu533Arg, Gly523Gly	Leu538Arg, Gly536Gly	Htike et al., 2014

de la mutación H526N que ocasionaba resistencia de bajo nivel a la rifampicina, dicha mutación no fue detectada durante los ensayos moleculares (Belotti et al., 2022).

ANYPLEX La prueba ANYPLEX MTB desarrollada por la empresa Seegene usa tecnología de Oligonucleótido Cebador Dual (DPO por sus siglas en inglés) para prevenir el alineamiento no específico de los cebadores con respecto a las muestras biológicas. Adicionalmente, esta prueba utiliza la tecnología de Detección de Amplicones Reales (READ por sus siglas en inglés) que permite realizar multiplexing de alto rendimiento en PCR de tiempo real junto con la tecnología de 8-metoxipsoraleno (8-MOP) para minimizar la contaminación de ADN. Se ha reportado una sensibilidad del 87.5 % con especificidad del 98.2 % en un total de 1167 muestras biológicas de pacientes con tuberculosis. Adicionalmente, se reportó un valor de predicción positiva (PPV) del 80.2 %, valor de predicción negativa (NNP) del 99.0 % y una eficiencia general del 97.8 % (Lim et al., 2014). De forma más reciente se ha desarrollado una nueva versión de la prueba ANYPLEX, llamada ANYPLEX II MTB/MDR/XDR que permite el análisis simultáneo de mutaciones que confieren resistencia a fármacos antituberculosis de primera y segunda línea, junto con la detección de *M. tuberculosis*.

La versión ANYPLEX II utiliza corte y extensión etiquetada de oligonucleótidos en adición a oligonucleótidos cebadores duales, lo que provee lecturas en tiempo real basadas en análisis de temperaturas de fusión durante el PCR. La prueba utiliza dos cartuchos de PCR en donde uno se destina a la detección de *M. tuberculosis* y 25 mutaciones específicas (18 en el gen *rpoB*, 3 en la región promotora del gen *inbA* y 4 en el gen *katG*), y en el segundo se realiza detección de tuberculosis junto con 13 mutaciones específicas de extrema resistencia (7 en el gen *gyrA*, 3 en el gen *rrs* y 3 en los promotores *eis*). Como parámetros de rendimiento se determinó que la prueba ANYPLEX II presenta sensibilidad del 97 % con especificidad del 100 %, valor de predicción positiva del 100 % y valor de predicción negativa del 99.1 %, lo que implica que la prueba es

altamente confiable (Causse et al., 2015).

MTB LAMP Esta prueba fue diseñada con 6 cebadores que reconocen ocho regiones distintas del gen 16S de *M. tuberculosis* mediante el software PrimerExplorer V3, aplicado a la tecnología de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP por sus siglas en inglés). Un conjunto de cebadores se compone de cebadores externos F3 y B3, cebadores internos FIP y BIP y cebadores de bucle FLP y BLP. Inicialmente, esta prueba alcanza una sensibilidad del 100 % con especificidad del 94.2 %, valor de predicción positiva del 94.1 % y valor de predicción negativa del 100 % (Pandey et al., 2008). En comparación con otros métodos moleculares para detección de tuberculosis, la prueba MTB LAMP presenta una alta sensibilidad (98.6 %) y especificidad (99 %), valor de predicción positiva del 99 % y valor de predicción negativa del 94 %. Así mismo, en comparación con la prueba Xpert demostró que presenta una menor sensibilidad (99.1 % para Xpert) pero mayor especificidad (96 % para Xpert) (Bojang et al., 2016).

Ensayos con Sondas en Línea (LPA) Los ensayos con sondas en línea o LPA (Line Probe Assays) son pruebas moleculares que utilizan tiras reactivas de nitrocelulosa (tecnología DNA Strip) que contienen regiones moleculares parciales o sondas de los genes de resistencia en estudio (Arias y Herrera, 2016). Esta tecnología se realiza extrayendo el ADN de las muestras en estudio, para luego realizar una amplificación por PCR múltiple de punto final seguido de una hibridación reversa del ADN amplificado a las sondas de ADN específico unido a las tiras de nitrocelulosa y por último se realiza la evaluación de las tiras para determinar la identificación de especie y si se detectan genes que confieren resistencia (Arias y Herrera, 2016). Algunos productos comerciales disponibles para el diagnóstico de tuberculosis mediante LPA son Genotype® MDRTB plus, Genoscholar TB-NTM+MDR, Genotype MTBDR.

2.2. Herramientas bioinformáticas para el estudio de la tuberculosis

La utilidad de las tecnologías de secuenciación de próxima generación ha sido ampliamente estudiada para mejorar la detección de tuberculosis resistente a los medicamentos en todo el mundo (Gardy y Loman, 2018). La secuenciación de genoma completo (WGS) por sus siglas en inglés, ya está siendo implementada en países como Reino Unido, Dinamarca y Estados Unidos para reemplazar las pruebas de susceptibilidad a fármacos en la clínica y está siendo evaluada como estrategia de la Organización Mundial de la

Salud para la predicción de perfiles de susceptibilidad a antituberculosos de primera línea, con una secuenciación inicial de 10,209 aislamientos procedentes de 16 países (CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, 2018). Esta estrategia permite la identificación con precisión de polimorfismos de un solo nucleótido presentes en la región de resistencia a la rifampicina RR-DR. Así como mutaciones presentes en otras regiones que podrían generar procesos de resistencia antibiótica. Adicionalmente, se ha demostrado que WGS es más discriminatorio que las técnicas actuales de tipificación molecular para diferenciar entre episodios de recaída o reinfección y resolver transmisiones Faksri et al., 2016).

Diversos estudios han intentado validar WGS para intervenciones de salud pública. Gardy, Johnston et al., 2011 demostraron la resolución limitada de MIRU-VNTR para la investigación de brotes de tuberculosis mediante la secuenciación de 32 aislamientos de *M. tuberculosis* de un brote de tuberculosis de tres años en Columbia, Canadá. Los datos WGS mostraron claramente la presencia de dos linajes distintos de *M. tuberculosis* con tipos MIRU-VNTR idénticos, aunque probablemente ambos descendían de un ancestro común histórico. Torok et al., 2013 investigaron dos casos de MDR-TB asociados con una escuela de idiomas en Cambridge, Reino Unido. Los casos tenían nexos epidemiológicos, pero hubo discrepancia en los resultados fenotípicos; uno fue determinado resistente a la estreptomycin y el otro sensible. Se determinó que ambos aislamientos eran del linaje Beijing y del mismo tipo MIRU-VNTR. Sin embargo, la diferencia fenotípica sugirió que eran cepas diferentes. El análisis por WGS posterior mostró que los aislamientos no mostraron ninguna diferencia en los SNP, lo que sugiere un evento de transmisión directa o indirecta. Este caso destaca un problema particular con la confiabilidad de las pruebas fenotípicas (Torok et al., 2013).

Otros estudios han investigado el impacto potencial de WGS en el beneficio del paciente, al intentar predecir las susceptibilidades de los genotipos aislados a los antituberculosos. Koser et al., 2013 demostraron que WGS puede proporcionar a los médicos tratantes información valiosa en un período de tiempo clínicamente relevante, varias semanas antes de que se obtengan los resultados de susceptibilidad fenotípica, cuyos resultados son afectados por el tiempo de replicación del microorganismo. Más recientemente, Pankhurst et al., 2016 calcularon los costos del tratamiento hospitalario para tuberculosis resistente a los medicamentos, comparando el costo de las pruebas fenotípicas y WGS, encontrando diferencias mínimas, que corroboran la viabilidad económica de esta estrategia.

El advenimiento de la secuenciación de próxima generación ha convertido a WGS en una alternativa más rápida y cada vez más accesible para los estudios de epidemiología

molecular. Por ejemplo, Ford et al., 2011 emplearon WGS para comparar los SNPs de 33 aislamientos de *M. tuberculosis* de monos *Macacos cynomolgus* con enfermedad activa, latente o reactivada, estimaron la tasa de mutación y encontraron que *M. tuberculosis* continua adquiriendo mutaciones aún en estado latente, lo que según estos investigadores explica por qué la monoterapia con isoniazida para la tuberculosis latente es un factor de riesgo para la aparición de resistencia a la isoniazida. Roetzer et al., 2013 realizaron un estudio retrospectivo de vigilancia epidemiológica de tuberculosis entre 1997 y 2010, lo que les permitió identificar un brote del linaje Haarlem de *M. tuberculosis* en Hamburgo. El análisis de WGS de estos aislados permitió el establecimiento de nexos epidemiológicos, así como identificar el posible inicio de la expansión del brote y patrones de dispersión.

Tagliani et al., 2021 emplearon un enfoque basado en WGS para la vigilancia genómica de *M. tuberculosis*, este estudio analizó un total de 2218 aislamientos pertenecientes a 25 países europeos y presenta una caracterización genética de los aislamientos encontrando que los linajes más frecuentes eran el linaje 4 (Euroamericano) y linaje 2 (Beiging) que representaron el 65 % y el 29,7 % de los aislamientos. Adicionalmente en este estudio identificaron mutaciones asociadas a resistencia a rifampicina en el 97 % de las muestras, de las cuales el 91,2 % tenían una resistencia adicional a la isoniacida, así como resistencia a las fluoroquinolonas en un 27 % y resistencia a al menos un antibiótico inyectable en el 15 % de los aislados (TB-XDR).

Estudios aislados han secuenciado y analizado mediante WGS aislados latinoamericanos de tuberculosis, describiendo los linajes que circulan en diferentes países y realizando una caracterización de la resistencia antibiótica (Alvarez et al., 2016; De Las Rivas, Bonavides-Martinez y Campos-Laborie, 2019; Baena et al., 2019; Nieto Ramirez et al., 2020; Sanchez-Corrales et al., 2021). Sin embargo, en la búsqueda bibliográfica realizada para el desarrollo de esta tesis, no se encontraron estudios que comparen aislamientos de diferentes orígenes geográficos dentro del continente americano o que evalúen la capacidad diagnóstica de las pruebas moleculares para la detección de la tuberculosis en esta región geográfica, ya sea de forma experimental o computacional.

El cultivo previo del bacilo tuberculoso implica un retraso de entre 2 y 3 semanas tanto para los estudios fenotípicos como para los análisis de WGS. Adicionalmente, el cultivo repetido reduce la diversidad genética de los microorganismos debido a la selección de clones adecuados para el crecimiento en cultivo y/o la pérdida aleatoria de linajes. Los análisis realizados directamente a la muestra de esputo representan un reto debido a la baja cantidad de microorganismos y la presencia de ADN contaminante humano y no micobacteriano. Brown et al., 2015 emplearon un método que utiliza ce-

badores de ARN biotinilados diseñados específicamente para el ADN de *M. tuberculosis* para capturar ADN genómico del MBTC directamente de muestras de esputo, lo que permite la secuenciación del genoma completo sin necesidad de cultivo previo. Por su parte, Nimmo et al., 2019 realizaron un estudio comparativo entre secuencias de genoma completo de *M. tuberculosis* generadas a partir de 33 muestras clínicas emparejadas utilizando dos métodos. En un método, el ADN se extrajo directamente del esputo y luego se enriqueció con cebadores de oligonucleótidos y en el otro se extrajo del cultivo de micobacterias (MGIT), encontrando que el ADN secuenciado directamente del esputo mostró una diversidad significativamente mayor dentro de la muestra que la del cultivo.

Los análisis de WGS podrían usarse para expandir los métodos moleculares específicos rápidos actuales al mejorar el poder predictivo de cualquier mutación identificada, mientras que el enfoque molecular requiere un desarrollo técnico constante para mantener una lista completa de detección de mutaciones, WGS solo requiere actualizaciones de su algoritmo predictivo, mejorando así el poder de diagnóstico más rápidamente (Witney et al., 2016). Entre las principales ventajas del uso de WGS para el estudio de la tuberculosis están la identificación de un mayor número de mutaciones en simultáneo, la identificación de infecciones mixtas, la predicción de resistencia antibiótica con un enfoque holístico respecto al genoma del microorganismo, así como una mayor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia.

El uso cada vez mayor de WGS en las iniciativas de investigación y salud pública asociadas a la tuberculosis, ha impulsado la generación de desarrollos tecnológicos específicos como software y servidores web que proporcionan resultados de tipología epidemiológica, útiles para el seguimiento y vigilancia de patologías. Los avances recientes en tecnologías genómicas de alto rendimiento, especialmente la secuenciación de próxima generación para la secuenciación del genoma completo de aislamientos de *M. tuberculosis*, han brindado nuevos conocimientos sobre la evolución molecular y la diversidad genómica de esta bacteria. Adicionalmente, estas herramientas permiten inferir sobre la resistencia a los antibióticos en diferentes especies microbianas de interés clínico. Entre las herramientas bioinformáticas más empleadas para el estudio de la tuberculosis se encuentran los servidores web CASTB, PhyResSe y TBProfiler y las soluciones de software KvarQ y Microbe Predictor (Steiner et al., 2014; Bradley et al., 2015; Coll, McNerney et al., 2015; Feuerriegel et al., 2015; Iwai et al., 2015). Estas herramientas proporcionan datos de tipo a partir de WGS utilizando spoligotyping *In silico*, polimorfismos de secuencia o variantes específicas para predecir la resistencia a múltiples fármacos. Sus principales diferencias radican en la posibilidad de analizar

datos por lotes, la capacidad de exportar y almacenar los resultados, la facilitación de actualización, el formato de ingreso y grado de preprocesamiento de los datos requerido (Schleusener et al., 2017).

Muchas canalizaciones de software se han desarrollado y están en uso en laboratorios individuales o disponibles a través de interfaces web. Sin embargo, la implementación futura de WGS en la práctica clínica dependerá del desarrollo de herramientas de software robustas y validadas que sean fáciles de usar e interpretar en el contexto de diagnóstico. Se están desarrollando ejemplos prometedores que pueden predecir un fenotipo a los pocos minutos de cargar los datos de la secuencia, por ejemplo, Mykrobe (Witney et al., 2016). La confiabilidad de la predicción genotipo-fenotipo depende no solo de una buena correlación de datos, sino también de buenos recursos de bases de datos para permitir un fácil acceso a dichos datos. El proyecto ReSeqTB recientemente financiado, cuyo objetivo es implementar un repositorio único para correlaciones validadas de tuberculosis resistente a los medicamentos, puede cumplir este papel. Sin embargo, todavía se encuentra en las primeras etapas de desarrollo. La interacción entre las herramientas de software y las bases de datos globales de mutaciones de resistencia e información filogenética es uno de los principales retos para las herramientas en desarrollo (Witney et al., 2016). El desarrollo de herramientas de software basadas en WGS para tuberculosis no se limita a la identificación de la resistencia antibiótica. A la fecha han sido creadas estrategias bioinformáticas que facilitan la diferenciación entre tuberculosis activa y LTBI mediante métodos de discriminación para la detección de infecciones (Jiangpeng Wu et al., 2019) y algoritmos para la identificación de infecciones mixtas por miembros del MTB Complex (Sobkowiak et al., 2018). Adicionalmente, el uso de herramientas computacionales ha permitido la formulación de nuevas sondas para la detección molecular de la tuberculosis (Loukil et al., 2018). La tabla 2.6 presenta una recopilación de herramientas de software, bases de datos y servidores web diseñados para el estudio de la tuberculosis.

Aproximaciones basadas en Machine Learning pueden emplearse para el diagnóstico de la tuberculosis. El aprendizaje de máquina con redes neuronales convulsionales profundas (DCNN) puede emplearse para clasificar con precisión la tuberculosis en radiografías de tórax. Para este enfoque, Lakhani y Sundaram, 2017 emplearon dos DCNN diferentes (AlexNet y GoogLeNet) para clasificar las imágenes como “con manifestaciones de tuberculosis pulmonar” o como “sanas”. Este abordaje aumentado por radiólogos resultó en una sensibilidad del 97,3% y una especificidad del 100%. Por su parte, Xiong et al., 2018 construyeron un modelo de redes neuronales convolucionales (CNN), llamado tuberculosis TB-AI, para la identificación del bacilo tuberculoso en

Herramienta	Descripción/Clasificación						Año de publicación	Autores
	Análisis filogenéticos	Genotipado / Sitios de inserción	Base de datos	Análisis de WGS /	Análisis de			
	Spoligotyping	MIRU-VNTR-IS	SNPs/WGS/RNA-seq	Anotación de genomas	farmacoresistencia			
CASTB	X	X	X				2015	Iwai et al., 2015
GenoMycDB				X	X		2006	Catanzo et al., 2006
GMTV				X	X	X	2014	Chernyavets et al., 2014
ISMMapper			X				2015	Hawkey et al., 2015
ISSaga					x		2011	Varani et al., 2011
MIGDD				X	X		2008	Vishnoi et al., 2008
MIRU-VNTR plus			X				2012	Waniger et al., 2010
Mycobrowser portal					X		2010	Kapopoulou et al., 2011
MycDB		X	X	X			2012	Rodriguez-Campos et al., 2012
PATRIC	X			X	X		2006	Snyder et al., 2007; Wattam et al., 2014
PhyResSE		X				X	2015	Feuerriegel et al., 2015
PhyTB	X					X	2015	Benavente et al., 2015
SITVIT/SpolDB4				X			2012	Demay et al., 2012
SpnTree	X						2012	Leekitcharoenphon et al., 2012
SpolPred		X					2012	Coll et al., 2012
SpolTyping		X					2016	Xia et al., 2016
TBDB				X			2008	Galagan et al., 2010; Reddy et al., 2009
TB-Profiler						X	2015	Coll et al., 2015
TGS-TB	X	X	X				2015	Sekizuka et al., 2015
TRF							1999	Benson, 1999
TubercuList				X	x		1998	Coll et al., 1998; Lew et al., 2011

Tabla 2.6: Herramientas bioinformáticas para el estudio de la tuberculosis

imágenes de microscopía. TB-AI logró una sensibilidad del 97,94 % y una especificidad del 83,65 %- (Yugaswara, Fathurahman et al., 2020), emplearon técnicas comunes de aprendizaje automático que incluyen Regresión logística, Vecino más cercano, Naivy Bayes, Máquina de vectores de soporte, Bosque aleatorio, Red neuronal y análisis discriminante lineal para diagnosticar la tuberculosis utilizando métodos de clasificación basados en datos clínicos.

En 2020, Jamal y colabores emplearon enfoques de aprendizaje automático basados en inteligencia artificial para predecir la resistencia en los genes *rpoB*, *inhA*, *katG*, *pncA*, *gyrA* y *gyrB* para los medicamentos rifampicina, isoniazida, pirazinamida y fluoroquinolonas. En dicha investigación emplearon algoritmos de ML como Naivy Bayes, vecino más cercano, máquina de vectores de soporte y red neuronal artificial, para construir los modelos de predicción. Los modelos de clasificación tuvieron una precisión promedio del 85 % en todos los genes examinados y se evaluaron en un conjunto de datos externo invisible para demostrar su aplicación. Además, se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular y dinámica molecular (Jamal et al., 2020).

Referencias

- Allahyartorkaman, Mohammadreza et al. (2019). «Low diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: A multicenter surveillance». En: *Scientific reports* 9.1, pp. 1-6.
- Alvarez, N et al. (2016). «Whole-genome sequencing of a Haarlem extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate from Medellin, Colombia». En: *Genome announcements* 4.3, e00566-16.

- Andrews, Jason R et al. (2012). «Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Clinical infectious diseases* 54.6, pp. 784-791.
- Antoine, Rudy, Cyril Gaudin y Ruben C Hartkoorn (2021). «Intragenic Distribution of IS 6110 in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Strains: Bioinformatic Evidence for Gene Disruption Leading to Underdiagnosed Antibiotic Resistance». En: *Microbiology Spectrum* 9.1, e00019-21.
- Arias, Fabiola y Tania Herrera (2016). «Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis». En: *Revista chilena de enfermedades respiratorias* 32.4, pp. 254-259.
- Atherton, Rachel R et al. (2019). «Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis testing in children: a mini-review and commentary». En: *Frontiers in pediatrics* 7, p. 34.
- Baena, Andres et al. (2019). «Differential determinants of virulence in two *Mycobacterium tuberculosis* Colombian clinical isolates of the LAM09 family». En: *Virulence* 10.1, pp. 695-710.
- Bahr, Nathan C et al. (2018). «Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculous meningitis in HIV-infected adults: a prospective cohort study». En: *The Lancet Infectious Diseases* 18.1, pp. 68-75.
- Banuls, Anne-Laure et al. (2015). «*Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium». En: *Journal of medical microbiology* 64.11, pp. 1261-1269.
- Barbier, Maxime y Thierry Wirth (2016). «The evolutionary history, demography, and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex». En: *Microbiology spectrum* 4.4, pp. 4-4.
- Beckert, Patrick et al. (2012). «rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains». En: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56.5, pp. 2743-2745.
- Belotti, Naiara Ule Ule et al. (2022). «Evaluation of xpert *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin for tuberculosis diagnosis in a reference laboratory». En: *The International Journal of Mycobacteriology* 11.4, pp. 435-441.
- Boehme, Catharina C et al. (2011). «Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study». En: *The lancet* 377.9776, pp. 1495-1505.
- Bojang, Adama L et al. (2016). «Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia». En: *Journal of Infection* 72.3, pp. 332-337.

- Bos, Kirsten I et al. (2014). «Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis». En: *Nature* 514.7523, pp. 494-497.
- Bradley, Phelim et al. (2015). «Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Nature communications* 6.1, pp. 1-15.
- Brown, Amanda C et al. (2015). «Rapid whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical samples». En: *Journal of clinical microbiology* 53.7, pp. 2230-2237.
- Camus, Jean-Christophe et al. (2002). «Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv». En: *Microbiology* 148.10, pp. 2967-2973.
- Causse, M et al. (2015). «New Anyplex™ II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in *M. tuberculosis* cultures». En: *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 19.12, pp. 1542-1546.
- Chakravorty, Soumitesh et al. (2017). «The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing». En: *MBio* 8.4, e00812-17.
- Clemett, Delyth y Anthony Markham (2000). «Linezolid». En: *Drugs* 59.4, pp. 815-827.
- Cohen, Keira A et al. (2020). «Evidence for expanding the role of streptomycin in the management of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64.9, e00860-20.
- Cole, ST y BG Barrell (1998). «Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv». En: *Genetics and Tuberculosis: Novartis Foundation Symposium 217*. Wiley Online Library, pp. 160-177.
- Coll, Francesc, Ruth McNerney et al. (2015). «Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences». En: *Genome medicine* 7.1, pp. 1-10.
- Coll, Francesc, Jody Phelan et al. (2018). «Genome-wide analysis of multi-and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Nature genetics* 50.2, pp. 307-316.
- De Las Rivas, Javier, Cesar Bonavides-Martinez y Francisco Jose Campos-Laborie (2019). «Bioinformatics in Latin America and SoIBio impact, a tale of spin-off and expansion around genomes and protein structures». En: *Briefings in Bioinformatics* 20.2, pp. 390-397.
- Desjardins, Christopher A et al. (2016). «Genomic and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains implicate ald in D-cycloserine resistance». En: *Nature genetics* 48.5, pp. 544-551.

- Dhillon, Jasvir, P Bernard Fourie y Denis A Mitchison (2014). «Persister populations of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum that grow in liquid but not on solid culture media». En: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69.2, pp. 437-440.
- Driscoll, Jeffrey R (2009). «Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex». En: *Molecular Epidemiology of Microorganisms*, pp. 117-128.
- Esposito, Susanna, Sonia Bianchini y Francesco Blasi (2015). «Bedaquiline and delamanid in tuberculosis». En: *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16.15, pp. 2319-2330.
- Faksri, Kiaticchai et al. (2016). «Bioinformatics tools and databases for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Infection, Genetics and Evolution* 45, pp. 359-368.
- Feuerriegel, Silke et al. (2015). «PhyResSE: a web tool delineating *Mycobacterium tuberculosis* antibiotic resistance and lineage from whole-genome sequencing data». En: *Journal of clinical microbiology* 53.6, pp. 1908-1914.
- Ford, Christopher B et al. (2011). «Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection». En: *Nature genetics* 43.5, pp. 482-486.
- Gagneux, Sebastien (2018). «Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Nature Reviews Microbiology* 16.4, pp. 202-213.
- Gagneux, Sebastien et al. (2006). «Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.8, pp. 2869-2873.
- Gardy, Jennifer L, James C Johnston et al. (2011). «Whole genome sequencing and social network analysis of a tuberculosis outbreak». En: *New England Journal of Medicine* 364.8, pp. 730-739.
- Gardy, Jennifer L y Nicholas J Loman (2018). «Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system». En: *Nature Reviews Genetics* 19.1, pp. 9-20.
- Garnier, Thierry et al. (2003). «The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.13, pp. 7877-7882.
- Georghiou, Sophia B et al. (2012). «Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review». En: *PloS one* 7.3, e33275.
- Getahun, Haileyesus et al. (2015). «Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection». En: *New England Journal of Medicine* 372.22, pp. 2127-2135.
- Ghielmetti, Giovanni et al. (2021). «*Mycobacterium microti* Infections in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*)». En: *Emerging Infectious Diseases* 27.8, p. 2025.

- Goldstein, Beth P (2014). «Resistance to rifampicin: a review». En: *The Journal of antibiotics* 67.9, pp. 625-630.
- Gopinath, Vipin et al. (2015). «Profiling the proteome of Mycobacterium tuberculosis during dormancy and reactivation». En: *Molecular & cellular proteomics* 14.8, pp. 2160-2176.
- Groenen, Peter MA et al. (1993). «Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method». En: *Molecular microbiology* 10.5, pp. 1057-1065.
- Hartmann, Guido R et al. (1985). «Molecular mechanism of action of the antibiotic rifampicin». En: *Angewandte Chemie International Edition in English* 24.12, pp. 1009-1014.
- Helb, Danica et al. (2010). «Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology». En: *Journal of clinical microbiology* 48.1, pp. 229-237.
- Horne, David J et al. (2019). «Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults». En: *Cochrane Database of Systematic Reviews* 6.
- Instituto Nacional de Salud (2022). *Protocolo de Vigilancia de Tuberculosis 2021*. URL: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro_Tuberculosis%5C%202022.pdf (visitado 01-09-2022).
- Iwai, Hiroki et al. (2015). «CASTB (the comprehensive analysis server for the Mycobacterium tuberculosis complex): a publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates». En: *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 95.6, pp. 843-844.
- Jamal, Salma et al. (2020). «Artificial Intelligence and Machine learning based prediction of resistant and susceptible mutations in Mycobacterium tuberculosis». En: *Scientific reports* 10.1, pp. 1-16.
- Koser, Claudio U et al. (2013). «Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of M. tuberculosis». En: *New England journal of medicine* 369.3, pp. 290-292.
- Lakhani, Paras y Baskaran Sundaram (2017). «Deep learning at chest radiography: automated classification of pulmonary tuberculosis by using convolutional neural networks». En: *Radiology* 284.2, pp. 574-582.
- Lange, Christoph et al. (2022). «100 years of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin». En: *The Lancet Infectious Diseases* 22.1, e2-e12.
- Lee, Nick y Hoang Nguyen (2021). «Ethambutol». En: *StatPearls [Internet]*.

- Li, Hao et al. (2015). «Transmitted extended-spectrum extensively drug-resistant tuberculosis in Beijing, China, with discordant whole-genome sequencing analysis results». En: *Journal of clinical microbiology* 53.8, pp. 2781-2784.
- Lim, Jinsook et al. (2014). «Multicenter evaluation of Seegene Anyplex TB PCR for the detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens». En: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24.7, pp. 1004-1007.
- Lipworth, Samuel et al. (2019). «SNP-IT tool for identifying subspecies and associated lineages of Mycobacterium tuberculosis complex». En: *Emerging infectious diseases* 25.3, p. 482.
- LoBue, Philip A y Kenneth G Castro (2012). «Is it time to replace the tuberculin skin test with a blood test?» En: *JAMA* 308.3, pp. 241-242.
- Loukil, Ahmed et al. (2018). «FISHing Mycobacterium tuberculosis complex by use of a rpoB DNA probe bait». En: *Journal of Clinical Microbiology* 56.10, e00568-18.
- Luna, JA Caminero (2016). «Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar». En: *Revista Clínica Española* 216.2, pp. 76-84.
- Luo, Tao et al. (2015). «Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.26, pp. 8136-8141.
- Mackowiak, Philip A et al. (2005). «On the origin of American tuberculosis». En: *Clinical infectious diseases* 41.4, pp. 515-518.
- Meehan, Conor J et al. (2021). «Reconstituting the genus Mycobacterium». En: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71.9.
- Ministerio de Salud y de la Protección Social (2021). *INFORME DE EVENTO TUBERCULOSIS AÑO 2021 - PROGRAMA NACIONAL DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS*. URL: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/comportamiento-tuberculosis-2020.pdf> (visitado 01-09-2022).
- Moser, I et al. (2008). «Mycobacterium pinnipedii: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*)». En: *Veterinary microbiology* 127.3-4, pp. 399-406.
- Mostowy, Serge, Debby Cousins et al. (2002). «Genomic deletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculosis complex». En: *The Journal of infectious diseases* 186.1, pp. 74-80.
- Mostowy, Serge, Anthony Onipede et al. (2004). «Genomic analysis distinguishes Mycobacterium africanum». En: *Journal of clinical microbiology* 42.8, pp. 3594-3599.

- Naidoo, Anushka et al. (2017). «A Review of Moxifloxacin for the Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis». En: *The Journal of Clinical Pharmacology* 57.11, pp. 1369-1386.
- Nasiri, Mohammad J et al. (2017). «New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria». En: *Frontiers in microbiology* 8, p. 681.
- Natarajan, Arvind et al. (2020). «A systemic review on tuberculosis». En: *Indian Journal of Tuberculosis*.
- Nieto Ramirez, Luisa Maria et al. (2020). «Genetic profiling of Mycobacterium tuberculosis revealed “modern” Beijing strains linked to MDR-TB from Southwestern Colombia». En: *PLoS One* 15.4, e0224908.
- Nimmo, Camus et al. (2019). «Whole genome sequencing Mycobacterium tuberculosis directly from sputum identifies more genetic diversity than sequencing from culture». En: *BMC genomics* 20.1, pp. 1-9.
- O’Garra, Anne et al. (2013). «The immune response in tuberculosis». En: *Annual review of immunology* 31, pp. 475-527.
- PAHO (2020). *Tuberculosis en las Américas - Informe Regional 2019*. URL: <https://www.paho.org/es/documentos/tuberculosis-americas-informe-regional-2019> (visitado 08-11-2021).
- Pai, Madhukar, Mark P Nicol y Catharina C Boehme (2016). «Tuberculosis diagnostics: state of the art and future directions». En: *Microbiology spectrum* 4.5, pp. 4-5.
- Pandey, Basu Dev et al. (2008). «Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients». En: *Journal of Medical Microbiology* 57.4, pp. 439-443.
- Pankhurst, Louise J et al. (2016). «Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study». En: *The Lancet Respiratory Medicine* 4.1, pp. 49-58.
- Pansy, F, H Stander y Re Donovick (1952). «In vitro studies on isonicotinic acid hydrazide». En: *American review of tuberculosis* 65.6, pp. 761-764.
- Papaventsis, D et al. (2017). «Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of drug resistance: a systematic review». En: *Clinical Microbiology and Infection* 23.2, pp. 61-68.
- Pareek, Manish et al. (2013). «Ethnicity and mycobacterial lineage as determinants of tuberculosis disease phenotype». En: *Thorax* 68.3, pp. 221-229.
- Parija, Subhash Chandra (2023). «Genus Mycobacterium and Mycobacterium tuberculosis». En: *Textbook of Microbiology and Immunology*. Springer, pp. 419-437.

- Perron, Gabriel G et al. (2012). «Bacterial recombination promotes the evolution of multi-drug-resistance in functionally diverse populations». En: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279.1733, pp. 1477-1484.
- Piersimoni, Claudio et al. (2019). «Comparative evaluation of Xpert MTB/RIF and the new Xpert MTB/RIF ultra with respiratory and extra-pulmonary specimens for tuberculosis case detection in a low incidence setting». En: *Journal of clinical tuberculosis and other mycobacterial diseases* 15, p. 100094.
- Prasad, PV (2002). «General medicine in Atharvaveda with special reference to Yaksma (consumption/tuberculosis)». En: *Bull Indian Inst Hist Med Hyderabad* 32.1, pp. 1-14.
- Prosser, Gareth A y Luiz Pedro S de Carvalho (2013). «Kinetic mechanism and inhibition of Mycobacterium tuberculosis d-alanine: d-alanine ligase by the antibiotic d-cycloserine». En: *The FEBS journal* 280.4, pp. 1150-1166.
- Rehman, Mujeeb Ur et al. (2018). «Role of Tuberculin test as a Diagnostic tool for tuberculosis». En: *Journal of Ayub Medical College Abbottabad* 30.4, pp. 529-533.
- Reyes, Josephine F, Carmen HS Chan y Mark M Tanaka (2012). «Impact of homoplasy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in Mycobacterium tuberculosis». En: *Infection, Genetics and Evolution* 12.4, pp. 811-818.
- Rodriguez-Campos, Sabrina et al. (2014). «Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis». En: *Research in veterinary science* 97, S5-S19.
- Roetzer, Andreas et al. (2013). «Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study». En: *PLoS medicine* 10.2, e1001387.
- Sánchez, Luciana et al. (2016). «Tuberculosis extrapulmonar». En: *Revista Argentina de Diagnóstico por Imágenes* 5.14, pp. 25-37.
- Sanchez-Corrales, Lusayda et al. (2021). «Phylogenomic analysis and Mycobacterium tuberculosis antibiotic resistance prediction by whole-genome sequencing from clinical isolates of Caldas, Colombia». En: *PloS one* 16.10, e0258402.
- Sanchez-Padilla, Elisabeth et al. (2015). «Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland». En: *New England Journal of Medicine* 372.12, pp. 1181-1182.
- Sandgren, Andreas et al. (2009). «Tuberculosis drug resistance mutation database». En: *PLoS medicine* 6.2, e1000002.

- Schleusener, Viola et al. (2017). «Mycobacterium tuberculosis resistance prediction and lineage classification from genome sequencing: comparison of automated analysis tools». En: *Scientific reports* 7.1, pp. 1-9.
- Shah, Ira (2012). «Interpretation of Tuberculin Skin Testing in Children vaccinated with BCG». En: *Pediatric Oncall* 9.10, pp. 91-2.
- Silva, Marta L et al. (2022). «Tuberculosis caused by Mycobacterium africanum: Knowns and unknowns». En: *PLoS pathogens* 18.5, e1010490.
- Skoura, Evangelia, Alimuddin Zumla y Jamshed Bomanji (2015). «Imaging in tuberculosis». En: *International Journal of Infectious Diseases* 32, pp. 87-93.
- Sobkowiak, Benjamin et al. (2018). «Identifying mixed Mycobacterium tuberculosis infections from whole genome sequence data». En: *BMC genomics* 19.1, pp. 1-15.
- Sosa, Lynn E et al. (2019). «Tuberculosis screening, testing, and treatment of US health care personnel: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2019». En: *Morbidity and Mortality Weekly Report* 68.19, p. 439.
- Steiner, Andreas et al. (2014). «KvarQ: targeted and direct variant calling from fastq reads of bacterial genomes». En: *BMC genomics* 15.1, pp. 1-12.
- Steingart, Karen R et al. (2013). «Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults». En: *Cochrane database of systematic reviews* 1.
- Supply, Philip et al. (2013). «Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis». En: *Nature genetics* 45.2, pp. 172-179.
- Tagliani, Elisa et al. (2021). «Use of a whole genome sequencing-based approach for Mycobacterium tuberculosis surveillance in Europe in 2017–2019: An ECDC pilot study». En: *European Respiratory Journal* 57.1.
- Telenti, Amalio, Paul Imboden et al. (1993). «Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis». En: *The Lancet* 341.8846, pp. 647-651.
- Telenti, Amalio, Wolfgang J Philipp et al. (1997). «The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol». En: *Nature medicine* 3.5, pp. 567-570.
- Thangavelu, Kalpana et al. (2021). «Prevalence and speciation of non-tuberculous mycobacteria among pulmonary and extrapulmonary tuberculosis suspects in South India». En: *Journal of Infection and Public Health* 14.3, pp. 320-323.
- Tiberi, Simon et al. (2018). «Taking forward the stop TB partnership and world health organization joint theme for world TB day march 24th 2018—“wanted: leaders for

- a TB-free world. You can make history. End TB”». En: *International Journal of Infectious Diseases* 68, pp. 122-124.
- Torok, M Este et al. (2013). «Rapid whole-genome sequencing for investigation of a suspected tuberculosis outbreak». En: *Journal of clinical microbiology* 51.2, pp. 611-614.
- Truden, Sara, Eva Sodja y Manca Žolnir-Dovč (2023). «Drug-resistant tuberculosis on the balkan peninsula: determination of drug resistance mechanisms with xpert MTB/XDR and whole-genome sequencing analysis». En: *Microbiology Spectrum* 11.2, e02761-22.
- Vasquez Michel, Aneth y Veronica Chipana Cortez (2016). «Tuberculosis extrapulmonar: Breve Revision General y Nuevas Alternativas de Diagnostico». En: *Revista CON-CIENCIA* 4.2, pp. 71-79.
- Vergara Gómez, A, J González-Martin y AL Garcia-Basteiro (2017). «Xpert® MTB/RIF: utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis y de la resistencia a la rifampicina». En: *Medicina Clinica* 149.9, pp. 399-405.
- Vilchèze, Catherine y William R Jacobs Jr (2007). «The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics». En: *Annu. Rev. Microbiol.* 61, pp. 35-50.
- Vilchèze, Catherine y William R Jacobs Jr (2014). «Resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: genes, mutations, and causalities». En: *Microbiology spectrum* 2.4, pp. 2-4.
- Walker et al. (2015). «Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study». En: *The Lancet infectious diseases* 15.10, pp. 1193-1202.
- Wirth, Thierry et al. (2008). «Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex». En: *PLoS pathogens* 4.9, e1000160.
- Witney, Adam A et al. (2016). «Clinical use of whole genome sequencing for Mycobacterium tuberculosis». En: *BMC medicine* 14.1, pp. 1-7.
- Woodman, Marc, Ilsa L Haeusler y Louis Grandjean (2019). «Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective». En: *Genes* 10.1, p. 53.
- World Health Organization (2013). *Xpert MTB/RIF implementation manual*. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112469/9789241506700_eng.pdf (visitado 30-09-2021).
- (2017). *WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF*. Inf. téc.
- (2019). *Colombia: country profiles*. URL: https://www.who.int/gho/countries/col/country_profiles/en/ (visitado 08-08-2021).

- World Health Organization (2021). *Global Tuberculosis Report 2021*. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>.
- Wu, Jiangpeng et al. (2019). «ATBdiscrimination: an in silico tool for identification of active tuberculosis disease based on routine blood test and T-SPOT. TB detection results». En: *Journal of Chemical Information and Modeling* 59.11, pp. 4561-4568.
- Xiong, Yan et al. (2018). «Automatic detection of mycobacterium tuberculosis using artificial intelligence». En: *Journal of thoracic disease* 10.3, p. 1936.
- Yeh, Robert W et al. (1998). «Stability of Mycobacterium tuberculosis DNA genotypes». En: *Journal of Infectious Diseases* 177.4, pp. 1107-1111.
- Yugaswara, Hery, Muhamad Fathurahman et al. (2020). «Experimental Analysis of Tuberculosis Classification Based on Clinical Data Using Machine Learning Techniques». En: *International Conference on Soft Computing and Data Mining*. Springer, pp. 153-160.
- Zaw, Myo T, Nor A Emran y Zaw Lin (2018). «Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis». En: *Journal of infection and public health* 11.5, pp. 605-610.
- Zhang, Shuo et al. (2015). «Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in Mycobacterium tuberculosis». En: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70.9, pp. 2507-2510.
- Zhang, Ying et al. (2014). «Mechanisms of pyrazinamide action and resistance». En: *Microbiology spectrum* 2.4, pp. 2-4.
- Zhu, Chen et al. (2018). «Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against Mycobacterium tuberculosis». En: *Journal of Biological Chemistry* 293.43, pp. 16741-16750.

Artículo

Genómica de *Mycobacterium tuberculosis* en América Latina y el Caribe: Análisis exploratorio de polimorfismos de un solo nucleótido, farmacorresistencia e identificación de linajes de aislamientos clínicos.

Marcela Orjuela–Rodríguez^{1 3 4}; Johan S Hernández–Botero^{2 4}; Gustavo A Isaza³

¹*Departamento de Sistemas e Informática – Universidad de Caldas*

²*Grupo de Investigación Médica, Escuela de Medicina, Universidad de Manizales*

³*Grupo de Investigación en Tecnologías de la Información y Redes – GITIR*

⁴*Grupo de resistencia antibiótica de Manizales*

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad de etiología bacteriana causada por micobacterias pertenecientes al *Mycobacterium tuberculosis complex*, esta patología presenta un espectro dinámico de infección asintomática que puede migrar a una enfermedad potencialmente mortal. Al día de hoy, la tuberculosis es la principal causa de muerte por un patógeno específico y produjo entre 1.1 y 1.7 millones de muertes durante la presente década. En Colombia, se estima que 16,000 personas adquirieron tuberculosis en el año 2017 y 1,200 perdieron la vida. Se calcula que a nivel global el 3,3% de los casos de tuberculosis nuevos y un 20% de los casos previamente tratados exhiben un patrón de multiresistencia antibiótica, lo que junto a largos tratamientos antibióticos dificulta el control de la diseminación del bacilo tuberculoso. El presente estudio explora las mutaciones presentes en genes asociados a resistencia antibiótica en 310 aislamientos de

Mycobacterium tuberculosis de países de América Latina y el Caribe mediante análisis *In silico* de susceptibilidad antibiótica basada en SNPs. Presentamos un flujo de trabajo bioinformático que permite el análisis de datos de secuenciación genómica, la identificación de linajes microbianos mediante espoligotipado *In silico*, la caracterización de la resistencia antibiótica mediante identificación de mutaciones asociadas a resistencia y predicciones computacionales de las pruebas moleculares de uso clínico GenoType MDRTB plusv 2.0, Genoscholar NTM + MDRTB; Xpert MTB/RIF Classic, Xpert MTB/RIF Ultra y Xpert MTB/XDR. Se aplicaron técnicas de aprendizaje automático con el fin evaluar la capacidad de predicción de los fenotipos resistentes a partir de modelos de aprendizaje automático para determinar la resistencia a los medicamentos basados en las mutaciones encontradas. Este flujo de trabajo permitió clasificar el 53 % de los aislamientos como sensibles a los antibióticos, 19 % como TB-MDR, 17 % tuberculosis mono-resistente a seis diferentes fármacos, 7 % tuberculosis polidrogoresistente y 3 % TB Pre-XDR. La tipificación de espoligotipos de los aislamientos produjo un total de 86 patrones diferentes de los cuales 20 se consideraron espoligotipos huérfanos. Se identificaron 45 mutaciones de resistencia a los antibióticos y la presencia de la mutación de significado incierto L49P, presuntamente asociada a resistencia antibiótica cruzada a antituberculosos de segunda línea.

Palabras clave: Farmacorresistencia; Genómica comparativa; GenoType MDRTB; Genoscholar; Spoligotyping; Tuberculosis; Xpert MTB probes.

1. Introducción

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más letales del mundo. Según lo establece la Organización Panamericana de Salud, a 2021, cada día mueren al rededor de 4000 personas y cerca de 28000 resultan infectadas con el bacilo tuberculoso. Esta infección se encuentra diseminada por todo el mundo y en 2019 afectó aproximadamente a 10 millones de personas (World Health Organization, 2019). Según estimaciones de OPS/OMS en América Latina se presentaron aproximadamente 290.000 casos de tuberculosis con cerca de 22.900 muertes asociadas (PAHO, 2020). Se estima que aproximadamente 54.000 pacientes no recibieron atención oportuna o no fueron diagnosticados correctamente (PAHO, 2020). La mayor parte de los países latinoamericanos reportan entre 10 a 49 casos por cada 100 mil habitantes, con excepción de Perú y Bolivia, que reportan 100 a 299 casos por cada 100 mil habitantes. *M. tuberculosis* es el patógeno responsable por la mayoría de las infecciones reportadas. Sin

embargo, también se han reportado casos de tuberculosis humana causada por otras micobacterias del complejo (World Health Organization, 2013).

Se estima que en América Latina de cada 11000 pacientes con tuberculosis resistente solo 5000 son diagnosticados correctamente, de los cuales, solo el 89% reciben tratamiento y de estos, solo el 59% de los casos concluye con la erradicación del patógeno (PAHO, 2020). La multi-resistencia de *M. tuberculosis* en Latinoamérica es un problema que cobra cada vez más relevancia. En particular, un 9% del total de casos de tuberculosis en Perú presenta resistencia a fármacos, comparado con un 3% tanto en Brasil como México. En el año 2019 solo el 33% de estos pacientes recibieron pruebas de resistencia a fármacos, lo que deja un preocupante estimado de 7 mil pacientes con tuberculosis resistente no diagnosticados o tratados. Además, la fracción de tratamiento exitoso de tuberculosis en el continente americano solo alcanzó un 56% (PAHO, 2020).

Dada la elevada prevalencia de tuberculosis a nivel global, la OMS a través de su plan “End TB Strategy” propone que el diagnóstico de sensibilidad antibiótica sea de uso rutinario, realidad que no se cumple debido a los altos requerimientos técnicos para llevar a cabo estos análisis. En la actualidad, dentro de las estrategias para la identificación de la tuberculosis se encuentran la radiografía torácica, baciloscopía, microscopía de fluorescencia, cultivo del microorganismo y técnicas de biología molecular basadas en PCR. Sin embargo, sólo las dos últimas permiten identificar la enfermedad y la resistencia antibiótica al tiempo (Pai, 2020). Las técnicas de cultivo son demandantes técnicamente, peligrosas en términos de bioseguridad, analizan un número limitado de fármacos y no ofrecen información alguna sobre el origen del aislamiento o su virulencia. Adicionalmente, presentan limitaciones en cuanto al tiempo de diagnóstico dada la biología propia del microorganismo, cuyo crecimiento efectivo varía entre dos y cuatro meses (R. S. Lee y Behr, 2016). La tuberculosis es quizá una de las enfermedades más estudiadas que existen. Sin embargo, con un microorganismo que exhibe patrones de resistencia antibiótica cambiantes, un diagnóstico lento y la dificultad para la identificación de patrones de multiresistencia, es necesario seguir innovando para el entendimiento de esta enfermedad a través de estudios que se concentren en áreas geográficas donde existe una alta prevalencia como es el caso de los países de América latina y el Caribe.

El uso cada vez mayor de secuenciación de genoma completo (WGS) en las iniciativas de investigación y salud pública asociadas a la tuberculosis, ha impulsado la generación de desarrollos tecnológicos como software y servidores web que proporcionan resultados de tipología epidemiológica, útiles para el seguimiento y vigilancia de patologías. Adicionalmente, estas herramientas permiten inferir sobre la resistencia a los antibióticos

en diferentes especies microbianas de interés clínico. La utilidad de las tecnologías de secuenciación de próxima generación ha sido ampliamente estudiada para mejorar la detección de tuberculosis resistente a los medicamentos en todo el mundo (Gardy y Loman, 2018). Esta estrategia permite la identificación con precisión de polimorfismos de un solo nucleótido presentes en la región de resistencia a la rifampicina RR-DR. Así como mutaciones presentes en otras regiones que podrían generar procesos de resistencia antibiótica. La secuenciación de genoma completo ya está siendo implementada en países como Reino Unido, Dinamarca y Estados Unidos para reemplazar las pruebas de susceptibilidad a fármacos en la clínica y está siendo evaluada como estrategia de la Organización Mundial de la Salud para la predicción de perfiles de susceptibilidad a antituberculosos de primera línea, con una secuenciación inicial de 10,209 aislamientos procedentes de 16 países (CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, 2018).

El presente estudio explora las mutaciones presentes en genes asociados a resistencia antibiótica en 310 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* de países latinoamericanos mediante análisis *In silico* de susceptibilidad antibiótica basada en SNPs. Presentamos un flujo de trabajo bioinformático que permite el análisis de datos de secuenciación genómica, la identificación de linajes microbianos mediante espoligotipado *In silico*, la caracterización de la resistencia antibiótica, interpretación de la relevancia clínica de las mutaciones encontradas y predicciones computacionales de resultados de pruebas moleculares de uso clínico.

2. Materiales y métodos

2.1 Generación de la muestra

Se realizó una búsqueda de datos de secuenciación de genoma completo de *M. tuberculosis* en la base de datos NCBI para los 38 países que conforman América Latina y el Caribe. Se excluyeron datos de RNA-Seq y aislados pertenecientes a otras micobacterias del MTBC incluyendo *M. bovis*. Se realizó una selección aleatoria de las muestras por país, las cuales posteriormente fueron analizadas con el programa FastQValidator versión 1.0.5 2017 (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>) con el fin de validar la integridad de los archivos fastq descargados. Se construyó una muestra final de 310 genomas distribuidos en 7 países: Argentina (n=20), Brazil (n=63), Colombia (n=26), Guatemala (n=24), México (n=83), Panamá (n=40) y Perú (n=54). En el caso de Colombia se encontraron 16 genomas publicados y se incluyeron 10 genomas

adicionales secuenciados por el grupo de Investigación Médica de la Universidad de Manizales y el Grupo de Resistencia Antibiótica de Manizales - GRAM. Los códigos de acceso de NCBI de los genomas evaluados se presentan en el anexo 1.

2.2 Identificación de linajes y familias de espoligotipos.

Se identificaron los linajes y sublinajes de las muestras empleando un análisis de genotipos asistido por computadora mediante spoligotyping, se empleó la herramienta Spotyping V.2.0 (<https://github.com/xiaeryu/SpoTyping-v2.0>) para la obtención de espoligotipos en patrón binario y octal, se asignó el clado y el número SIT (Spoligotyping International Type number) empleando la SITVITWEB database. Una vez identificados los linajes se realizó una validación de los linajes obtenidos empleando los 62 marcadores únicos para la discriminación entre cepas de tuberculosis propuesto por Coll et al., 2014.

2.3 Análisis de farmacoresistencia.

Se realizó un análisis de calidad para cada una de las muestras seleccionadas empleando el programa FastQC versión 0.11.9 (Brown, Pirrung y McCue, 2017). La remoción de los adaptadores y la eliminación de lecturas de baja calidad se realizó con trimmomatic versión 0.36 [SLIDINGWINDOW:4:15 LEADING:3 TRAILING:3 MINLEN:80] (Bolger, Lohse y Usadel, 2014). Para la identificación y filtrado de variantes se empleó el flujo de trabajo bioinformático propuesto por Sanchez y colaboradores. Este flujo de trabajo emplea Kraken v.2 para la detección de posible contaminación con otros microorganismos incluyendo otras micobacterias (Wood, J. Lu y Langmead, 2019). Se realizó el mapeo de las lecturas contra el genoma de referencia H37Rv (NCBI: NC-000962) empleando el programa BWA versión 0.7.17 (Li, 2013). Las lecturas duplicadas fueron marcadas y excluidas por el módulo Mark Duplicates de Picard v 2.9.1. El control de la calidad del alineamiento se realizó con el programa Qualimap versión 2.2.1 (Okonechnikov, Conesa y Garcia-Alcalde, 2016). La profundidad de todos los loci de interés asociados a resistencia antibiótica se realizó con Alfred (Rausch et al., 2019). Para el llamado y el filtrado de variantes se utilizó GATK versión 4.2.0.0 con configuración Hard Filter (McKenna et al., 2010). La anotación funcional de variantes de un solo nucleótido (SNV) e inserciones o eliminaciones (INDEL) se realizó utilizando NGSEP versión 4.0 y SnpEff 5.0 (McKenna et al., 2010; Cingolani et al., 2012). Se determinaron como variantes altamente confiables aquellas que cumplieran con los parámetros QD<2.0, FS>60.0, SOR>3.0, MQ<40.0, MQRankSum <-12.5 y ReadPos-

RankSum <-8.0 (Sanchez-Corrales et al., 2021).

2.4 Susceptibilidad antibiótica mediante secuenciación de genoma completo.

Se identificó la resistencia antibiótica de los aislados a 16 fármacos antituberculosos como lo son amikacina, etambutol, capreomicina, etionamida, isoniacida, kanamicina, pirazinamida, rifampicina, bedaquilina, clofazimina, delamanid, estreptomycin, linezolid, levofloxacina, moxifloxacina y ácido paraaminosalicílico a partir de la identificación de variantes asociadas a farmacorresistencia. Se construyó un script en el lenguaje de programación python 3.0 que toma las variantes filtradas del llamado de variantes y las clasifica empleando el catálogo de mutaciones de resistencia en MBTC propuesto por la OMS (World Health Organization, 2021). Las mutaciones encontradas son clasificadas como: con asociación a resistencia antibiótica comprobada (R-Associated), con probable asociación a resistencia (R-interim), variantes de significancia incierta (R-Uncertain) y sin asociación comprobada a la resistencia (R-NotAssociated). Esta aproximación permite asociar cada aislamiento con un posible fenotipo resistente y categorizar las muestras como sensibles, monoresistentes, MDR, pre-XDR o XDR. Adicionalmente, el script propuesto genera un informe de resistencia para todas las mutaciones encontradas en genes de interés, indicando el fármaco al cual confieren resistencia, su clasificación según la OMS y valores de sensibilidad y especificidad asociados a la resistencia (Anexo 3). Este script se encuentra disponible en el siguiente enlace: <https://github.com/marorjuelarod/MTBResUCaldas.git>. Se validó la capacidad de clasificar los fenotipos de resistencia mediante el análisis de un subset de datos pertenecientes al proyecto "Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis - Cryptic" los cuales cuentan con resultados experimentales de caracterización de resistencia (NCBI PRJNA413593). Se validó la identificación de mutaciones de resistencia mediante el análisis de los genomas secuenciados por Sanchez y colaboradores, en cuya publicación se reportan las mutaciones encontradas para 9 aislamientos de tuberculosis de Chinchiná, Colombia (Sanchez-Corrales et al., 2021). Así mismo, se compararon los resultados obtenidos empleando para herramienta Tb-profiler para un subset de 15 genomas (<https://github.com/jodyphelan/TBProfiler>).

2.5 Pruebas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis.

Se realizó una aproximación computacional a los resultados de las pruebas moleculares de uso clínico GenoType MDRTB plus v2.0, Genoscholar NTM+MDRTB II;

Xpert MTB/RIF Classic y Xpert MTB/RIF Ultra empleando la herramienta MycTB Genome to Test (MTBGT) (Ng et al., 2019). Adicionalmente se realizó una aproximación a los posibles resultados de la prueba diagnóstica Xpert MTB/XDR mediante un enfoque basado en SNPs. Las aproximaciones computacionales a posibles resultados de las pruebas moleculares busca identificar aquellas variantes de resistencia que no son tenidas en cuenta por estas pruebas, ya sea por que estén en regiones diferentes a las evaluadas por la técnica o por que la técnica no contemple su identificación, permitiendo así contribuir a la información disponible sobre las pruebas moleculares empleadas para el diagnóstico de la tuberculosis. La figura 3.1 describe el flujo de trabajo bioinformático empleado en la presente investigación.

2.6 Análisis de Machine Learning para el estudio de variantes genómicas.

Se emplearon métodos de aprendizaje automático para evaluar la capacidad de clasificación de fenotipos de resistencia a partir de SNPs. Se construyó un conjunto de datos de entrenamiento que correlaciona los SNPs de alta calidad encontrados para cada genoma con una etiqueta binaria de resistencia/susceptibilidad. Se incluyeron adicionalmente datos genómicos de aislados de MTB de otras regiones geográficas con el fin de enriquecer la diversidad genética, para un total de 396 genomas evaluados [Alemania (7); Bélgica (3); Italia (4); Países bajos (8); Reino Unido (38); Rusia (19); Serbia (1); Sudáfrica (1); Suiza (5); Argentina (n=20), Brasil (n=63), Colombia (n=26), Guatemala (n=24), México (n=83), Panamá (n=40) y Perú (n=54)]. La presencia/ausencia de una mutación se representó mediante una clasificación binaria en el dataset de entrenamiento, donde 1 indica la presencia y 0 indica la ausencia. Se usó validación cruzada en 3 particiones (train, test, validation) para evaluar 4 algoritmos supervisados de clasificación como lo son Naïve Bayes (NB), K vecino más cercano (KNN), Support Vector Cluster (SVC), Random Forest (RF) y regresión logística (LGR). El notebook que permite reproducir este experimento puede encontrarse en <https://colab.research.google.com/drive/1maZ7l0mgk0ry1cmzHkxIx97HI8c4qczH>. Se para cada algoritmo evaluado se determinó la exactitud y se generaron las curvas de características de funcionamiento del receptor (ROC)

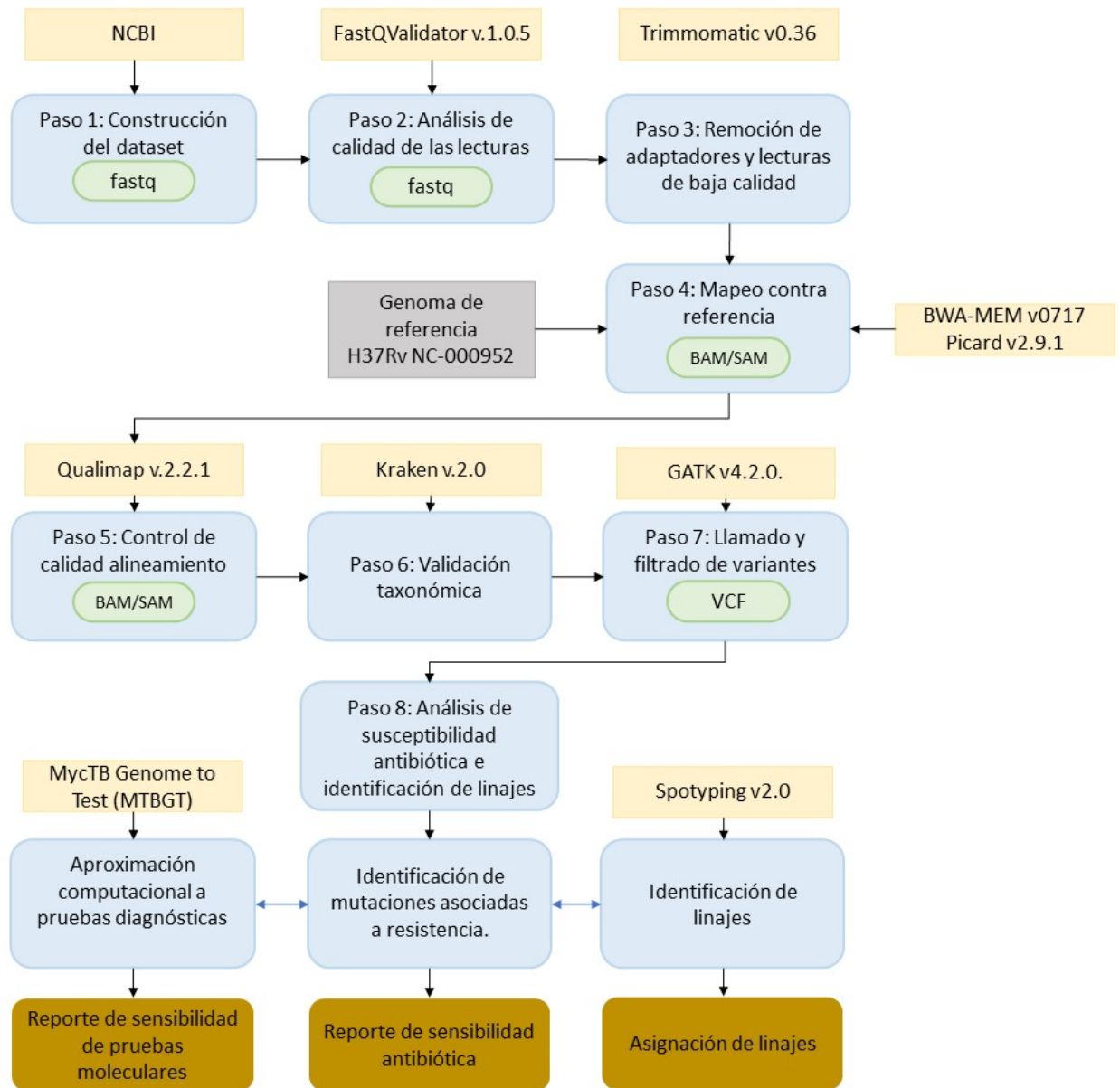


Figura 3.1: Flujo de trabajo bioinformático para el análisis genómico de aislados de *M. tuberculosis*

3. Resultados

3.1 Análisis de espigotipos e identificación de linajes

La tipificación de espigotipos de los 310 aislamientos de micobacterias produjo un total de 86 patrones de espigotipos diferentes siendo el 000000000003771 el más frecuente, este patrón corresponde al SIT1 y pertenece al linaje 2 (East-Asian) clado

Beijing (15.16 %). Otros espilogotipos frecuentes fueron SIT53, SIT1355, SIT92 y SIT42, los cuales corresponden a las familias T1 (9,03 %), LAM3(8,38 %), X3 (7,09 %) y LAM9 (5,8 %) del linaje Euroamericano respectivamente. De los 86 patrones encontrados, 66 (76,77 %) se encuentran reportados en la base de datos SITVITWEB, por lo tanto, se consideraron "tipos compartidos", mientras que los 20 patrones restantes (23,25 %) se consideraron spoliogotipos huérfanos. No se logró la asignación de espilogotipos en 2 muestras (0.64 %). Sin embargo, fue posible identificar su linaje empleando los 62 marcadores únicos para la discriminación entre cepas de tuberculosis propuesto por Coll et al., 2014. El 60 % de las muestras se agruparon en 9 patrones de espilogotipos y el 17 % de los patrones encontrados fueron únicos (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Frecuencia de espilogotipos de *M. tuberculosis* encontrados para genomas de Latinoamérica

Spoligotype	Spoligotype octal	Frequency %	SIT	Clade	Lineage
000000000000000000000000000000111111111	000000000003771	15,16	1	Beijing	L2 East-Asian
11111111111111111111111111111100001111111	777777777760771	9,03	53	T1	
111111111111111111000001111011100001110111	777777407560731	8,39	1355	LAM	
1110000000001111011111111111100001111111	700076777760771	7,10	92	X3	
1111111111111111110000111111100001111111	777777607760771	5,81	42	LAM9	
000000000000000000000000000000100000100001111111	000000004020771	5,81	2	H2	
1111111000111111110000111111100001111111	776177607760771	3,23	33	LAM3	L4 Euro-American
0000000000000000000000000000111111100001111111	000000007760771	2,90	4	H3	
11111111111111111110111111111111100001100001	777776777760601	2,58	137	x2	
111111111111111111111111111000000100001110111	77777774020731	1,94	62	H1	
111111111111111111100000111111011100001111111	777774077560771	1,94	222	X1	
11111110001111111100000000000000000011111	776177400000171	1,61	106	LAM	
111000001111111111111111111111100001111111	701777777760771	1,61	*	*	

* Spoliogotipo huérfano (No reportado en SITVITWEB database).

El linaje 4 (Euro-American) fue el más abundante y diverso dentro de las muestras evaluadas (77,42%), seguido por los linajes 2 (16.13 %), 3 (1.29 %) y 1 (0.64 %). El sublinaje más reportado para el linaje euroamericano fue la familia de espilogotipos LAM (Latin American and Mediterranean), otras subfamilias encontradas dentro del linaje 4 fueron T (9,35 %), X (11,29 %), Haarlem (11,61 %) y S (0.64 %). El 7,74 % restante de las muestras fueron clasificadas dentro del linaje 4 pero no fue posible discriminar entre las subfamilias T, H y X (Fig. 3.2).

La asignación de espilogotipos y número SIT permitió la correcta identificación de linajes en el 99,3 % de las muestras, encontrándose concordancia entre los clados asignados por spoliogotyping y los asignados empleando los 62 marcadores únicos de Coll et al., 2014. El linaje 4 fue dominante en 6 de los 7 países considerados en este estudio y contó con una alta diversidad representada en la identificación de al menos 2 familias diferentes en cada país. Se encontró la presencia del linaje 2 (East-Asian)

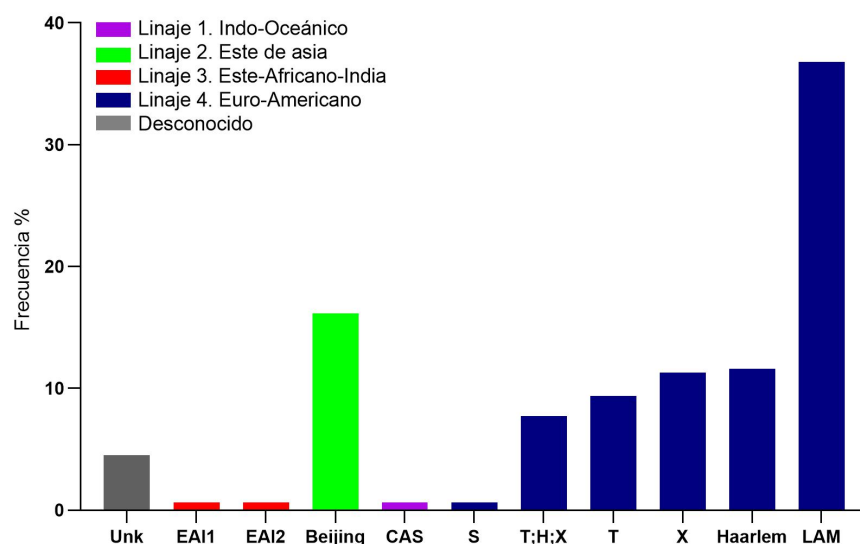


Figura 3.2: Linajes y familias de espoligotipos encontrados en genomas de *M. tuberculosis* latinoamericanos

en todos los países, siendo Panamá el país con mayor representatividad. Este resultado no permite considerar la dominancia epidemiológica de este linaje para el país, toda vez que la totalidad de las muestras provienen de un mismo estudio y localidad. Se identificó la presencia del linaje 3 en Guatemala, México y Brasil, así como 2 muestras del linaje 1 en México (Fig. 3.3). El anexo 4 presenta el listado total de espoligotipos encontrados durante esta investigación.

3.2 Análisis de susceptibilidad antibiótica.

El análisis de susceptibilidad antibiótica permitió asociar los SNPs encontrados en cada una de las muestras con diferentes fenotipos. Se consideraron aislamientos resistentes aquellos que presentaran al menos una de las mutaciones reportadas como críticamente asociadas a la resistencia antibiótica según la OMS (World Health Organization, 2021). De los 310 aislamientos evaluados el 53% fueron clasificados como sensibles a los antibióticos, el 19% como TB-MDR, 17% tuberculosis monoresistente, 7% Tuberculosis poliresistente y 3% Pre-XDR. Las monoresistencias más frecuentes fueron resistencia a la rifampicina y a la isoniacida. Sin embargo, también se encontraron casos de monoresistencia a la pirazinamida, estreptomina, levofloxacino y etambutol. Argentina fue el país con mayor proporción de casos de tuberculosis resistente, identificándose que el 95% de los aislados evaluados presentaron algún tipo de resistencia antibiótica, seguido por Brasil (62%), Perú (59%) y México (58%). Los países con

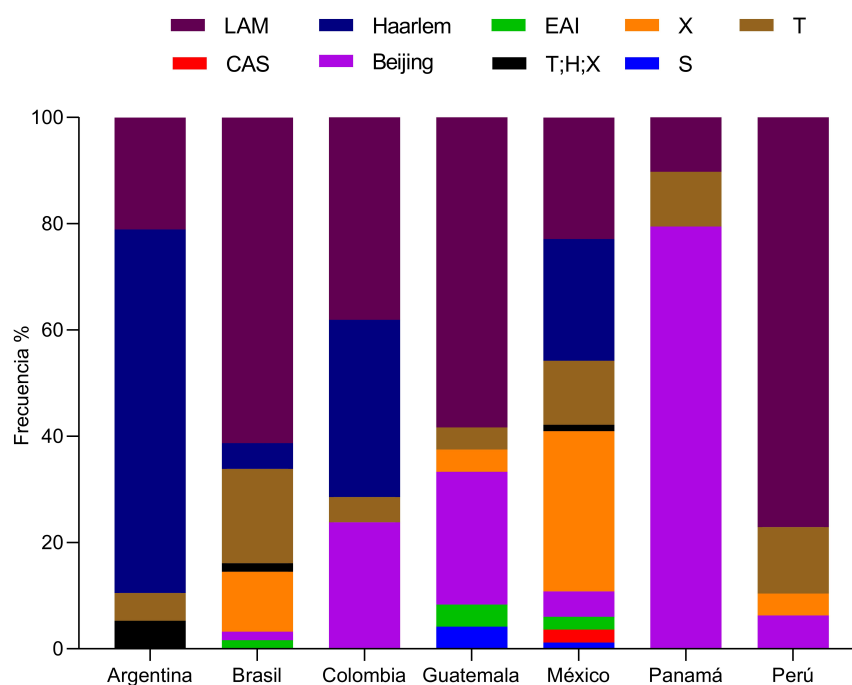


Figura 3.3: Linajes de *M. tuberculosis* identificados para latinoamérica

mayor porcentaje de casos de tuberculosis multidrogorresistente y polidrogorresistente fueron Argentina, Perú y México, con el 60 %, 19 % y 17 % de los aislados resistentes respectivamente. La totalidad de los aislamientos de Panamá fueron clasificados como sensibles a los antibióticos.

El presente estudio permitió identificar en total 45 diferentes mutaciones asociadas a resistencia en los 310 genomas de aislados latinoamericanos. La rifampicina fue el antibiótico con mayor diversidad de mutaciones encontradas (13), seguido por la pirazinamida (13), el levofloxacino (5) y el etambutol (5). El 7 % de los aislamientos fueron clasificados como tuberculosis monoresistente a la rifampicina, en todos los casos las mutaciones asociadas a la resistencia fueron encontradas en el gen *rpoB*. La mutación más común para este gen fue S450W, que se encontró en 53 aislamientos de tuberculosis distribuidos en Brasil, Colombia, México y Perú. Esta mutación ha sido reportada en todo el mundo y se ha asociado con niveles moderados de resistencia a la rifampicina.

Se encontró la presencia de mutaciones únicas asociadas a la distribución geográfica para la resistencia a la rifampicina, como fue el caso de las mutaciones sobre la posición 445 del gen *rpoB*, en las cuales la mutación H445D fue encontrada únicamente en aislamientos de Brasil y Perú, mientras que las mutaciones H445L y H445Y fueron exclusivas de México y Colombia respectivamente (Tabla 3.2). Es de resaltar que dado

el número limitado de genomas estudiados no es posible restringir estas mutaciones a un país o población específica. Adicionalmente, se identificó la presencia de una combinación de las mutaciones H445N y L452V en el gen *rpoB* para uno de los aislados de México.

Respecto a la isoniacida, se encontraron 24 casos de monoresistencia, siendo Brasil el país con el mayor número de casos, todas las mutaciones identificadas se encontraban en el gen *katG*. S315T fue la mutación asociada a resistencia con mayor frecuencia a lo largo de este estudio, con 98 casos distribuidos en Brasil, Colombia, Argentina, México y Perú, mientras que la variante S315N fue encontrada únicamente en Brasil y Perú, con un caso cada uno. Se identificó la presencia de 3 diferentes mutaciones asociadas al gen *RPSL* como lo son K43R, K88Q y K88R, las cuales están directamente asociadas a la resistencia a la estreptomicina, así como la mutación P84L en el gen *GID*. El 19,2% de los aislamientos presentaron al menos 1 de las 5 mutaciones asociadas a resistencia a etambutol reportadas en la tabla 3.2. La mayor parte de los casos de resistencia a este fármaco fueron asociados a eventos de polidrogoresistencia.

El gen *pncA* tuvo el mayor número de SNPs asociados, con 13 diferentes variantes distribuidas a lo largo del gen, el cual está íntimamente relacionado con la resistencia a la pirazinamida. Otras resistencias identificadas en este estudio fueron la monoresistencia a la estreptomicina, al etambutol, y a la levofloxacina, cada una de ellas correspondiente a menos del 1% de los casos. No se encontraron mutaciones sinónimas asociadas a resistencia para ninguno de los genes evaluados.

Se identificaron sólo 4 casos de resistencia a la etionamida, todos ellos causados por la presencia de las mutaciones P378L o S390L en el gen *ethA*. Se encontró la presencia de la mutación L49P en el gen de la nitrorreductasa dependiente de deazaflavina (*ddn*). Esta mutación es categorizada como de significancia incierta debido a que no se cuenta con estudios suficientes que respalden una asociación directa con casos de resistencia antibiótica. No se encontraron mutaciones asociadas a resistencia a la amikacina, capreomicina, kanamicina, bedaquilina, clofazimina, linezolid, moxifloxacina y ácido paraaminosalicílico. El anexo 2 presenta el listado de genotipos de resistencia encontrados en el desarrollo de esta investigación.

3.3 Rendimiento *In-silico* de pruebas de diagnóstico molecular.

El uso de la herramienta MycTB Genome to Test (MTBGT) permitió caracterizar la capacidad diagnóstica de las pruebas GenoType MDRTB plusv 2.0, Genoscholar NTM + MDRTB; Xpert MTB/RIF Classic y Xpert MTB/RIF Ultra para el diagnóstico de

Tabla 3.2: Mutaciones asociadas a resistencia para aislados de tuberculosis de América Latina y el Caribe

Antibiótico	Gen	Mutación	País						
			Brasil	Colombia	Guatemala	México	Panamá	Perú	Argentina
Etambutol	<i>embB</i>	D328Y	0	0	0	0	0	1	0
		G406D	1	0	0	1	0	3	1
		M306V	3	3	0	2	0	5	0
		Q497R	1	0	0	0	0	1	0
		Y319S	0	0	0	0	0	4	0
Etionamida	<i>ethA</i>	P378L	0	0	0	0	0	3	0
		S390F	0	0	0	0	0	1	0
Isoniacida	<i>katG</i>	S315N	1	0	0	0	0	1	0
		S315T	27	5	0	30	0	19	17
Levofloxacino	<i>gyrA</i>	D94G	3	1	1	1	0	2	0
		D94H	1	0	0	0	0	0	0
		D94N	2	0	1	0	0	0	0
		D94Y	1	0	0	1	0	0	0
		S91P	0	0	0	0	0	1	0
Pirazinamida	<i>pncA</i>	D8G	0	0	0	0	0	1	0
		G97S	0	0	0	0	0	1	0
		H51R	0	0	0	0	0	3	1
		H57Y	1	0	0	1	0	0	0
		K48T	0	0	0	0	0	3	0
		L120P	0	0	0	14	0	0	0
		Q10P	0	0	0	0	0	0	13
		Q10R	0	0	0	0	0	5	0
		V128G	0	0	0	1	0	0	0
		V139G	0	0	0	1	0	0	0
		W68G	1	0	0	1	0	0	0
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Y103C	0	0	0	0	0	1	0
		Y103H	0	0	0	0	0	1	0
		D435V	0	0	0	2	0	10	0
		D435Y	1	0	0	0	0	3	0
		H445D; RPOB H445R	0	0	0	1	0	0	0
		H445L	0	0	0	1	0	0	0
		H445N; RPOB L452V	0	1	0	0	0	0	0
		H445Y	3	0	0	3	0	0	0
		L430P	0	0	0	1	0	0	0
		L452P	0	0	0	0	0	2	0
		Q432K	0	1	0	0	0	0	0
		Q432L	0	0	0	1	0	0	0
		Q432P	1	0	0	0	0	0	0
		S450L	14	2	0	30	0	7	17
		S450W	0	0	0	1	0	2	0
Estreptomicina	GID	P84L	0	0	0	0	0	3	0
		K43R	2	2	0	2	0	6	0
	RPSL	K88Q	2	0	0	1	0	0	0
		K88R	0	0	0	1	0	0	0
Delamanid	<i>ddn</i>	L49P*	0	0	0	1	0	0	

*Mutación de significancia incierta.

la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina. Esta herramienta permite caracterizar la resistencia antibiótica mediante la identificación de mutaciones asociadas al gen *rpoB* y la región de resistencia a la rifampicina (RR-DR), por lo cual se evaluó la resistencia a otros fármacos mediante scripts propios, empleando un enfoque basado en SNPs. Todas las pruebas analizadas brindaron una sensibilidad del 100 % para la identificación de casos de tuberculosis. Sin embargo, se evidenciaron variaciones en su capacidad para identificar correctamente la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia antibiótica.

Las técnicas GenoType MDRTB plus v2.0 y Genoscholar NTM + MDRTB detectaron correctamente la resistencia a la rifampicina en el 97 % de los casos, identificando erróneamente como sensibles 4 de los aislamientos resistentes. Estas muestras presentaban al menos una de las mutaciones Q432P, Q432L, Q432K o D435Y en el gen *rpoB*. Adicionalmente, las dos pruebas diagnósticas permiten caracterizar la resistencia a la isoniacida mediante sondas que hibridan en los genes *inhA* y *katG*. Se obtuvo una sensibilidad del 100 % para la identificación de tuberculosis monoresistente a la isoniacida y una sensibilidad del 93 % para el diagnóstico de casos de TB-MDR. Es de resaltar que las pruebas GenoType MDRTB plus v2.0 y Genoscholar NTM + MDRTB están diseñadas exclusivamente para la identificación de casos de resistencia a la rifampicina e isoniacida mediante sondas que hibridan en los genes anteriormente mencionados. Por lo tanto, no es posible detectar resistencia a otros fármacos, incluyendo otras monoresistencias y polidrogoresistencias empleando estas técnicas.

La sensibilidad de las pruebas Xpert MTB/RIF Classic y Xpert MTB/RIF Ultra para la detección de resistencia a la rifampicina fue del 100 %, identificando correctamente todas las mutaciones encontradas en este estudio para el gen *rpoB*. Estas pruebas se basan en la hibridación de sondas sobre la región RR-DR. Sin embargo, no detectan mutaciones por fuera de esta región, lo que limita ampliamente su alcance para la detección de otras monoresistencias, polidrogoresistencias e incluso casos de TB-MDR. La sensibilidad global de las técnicas Xpert MTB/RIF Classic y Xpert MTB/RIF Ultra para la identificación de farmacoresistencia fue de solo el 71 %.

En combinación con la prueba de primera línea Xpert MTB/RIF Ultra, recientemente ha sido creada la prueba Xpert MTB/XDR, la cual aumenta la capacidad diagnóstica de sus antecesoras mediante la detección de mutaciones asociadas a la resistencia a la isoniazida, las fluoroquinolonas, los fármacos inyectables de segunda línea (SLID) (amikacina, kanamicina, capreomicina) y la etionamida en una sola prueba. Xpert MTB/XDR tuvo una sensibilidad del 100 % para la identificación de mutaciones asociadas a la resistencia a la rifampicina, isoniacida y levofloxacino. Sin embargo, la

técnica no detectó la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia a la etionamida, etambutol y pirazinamida.

3.4 Análisis de Machine Learning para el estudio de variantes genómicas.

Se construyó un conjunto de datos de entrenamiento que correlaciona las mutaciones encontradas en los diferentes aislamientos con el fenotipo de resistencia. La presencia/ausencia de una mutación se representó mediante una clasificación binaria en el dataset de entrenamiento, donde 1 indica la presencia y 0 indica la ausencia. Para cada fármaco y aislado se consideró una etiqueta binaria de resistencia/susceptibilidad. Se abordaron en total 35553 variantes a lo largo del genoma. Dada la asimetría y desbalance entre el número de muestras y atributos, se emplearon técnicas de data augmentation con el fin de extender el muestreo aleatoriamente en el conjunto de entrenamiento. El uso de métodos de aprendizaje automático no supervisados, arrojó valores de exactitud superiores al 80 % para la clasificación binaria de los aislamientos. Los métodos con mayor exactitud fueron KNN, RF y LGR, el método con menor exactitud fue KNN (3.4). Se usó validación cruzada en 3 particiones (train, test, validation) de 70/20/10, 80/10/10 y 60/20/20, los dos mejores clasificadores fueron SVC (Support Vector Cluster) y RF (random Forest), para esta fase se usó la librería Sklearn de Python y para visualización matplotlib, el notebook que permite reproducir este experimento puede encontrarse en <https://colab.research.google.com/drive/1maZ7l0mgk0ry1cmzHkxIx97HI8c4qczH> no obstante, si bien se puede inferir que el preprocesamiento y los modelos pueden aproximarse a una predicción adecuada, la cantidad de muestras no permite establecer una generalización del modelo, pero se presenta como una alternativa ante la posible escalabilidad de datos. (Fig. 3.5 - 3.6).

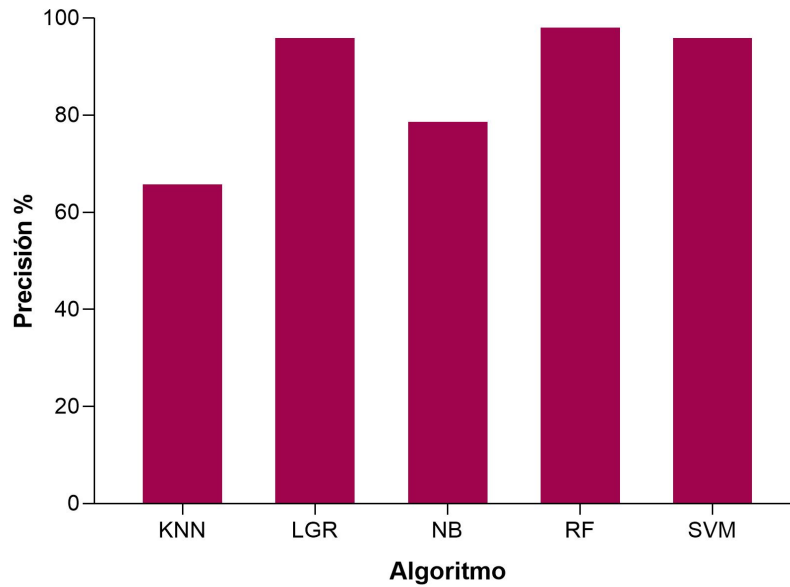


Figura 3.4: Nivel de exactitud de métodos de aprendizaje automático para la predicción de resistencia

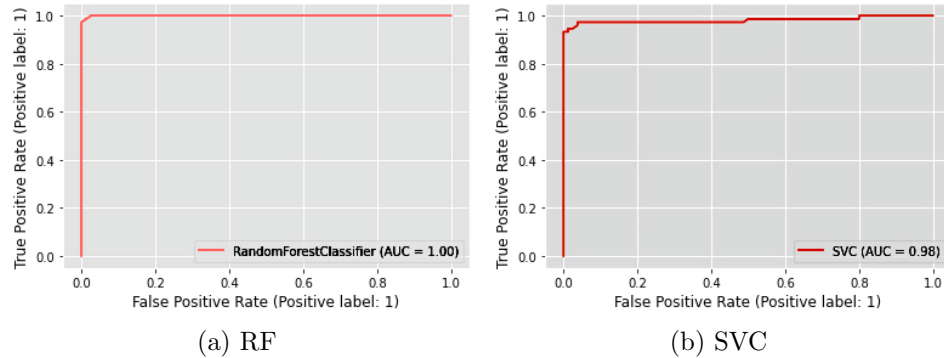


Figura 3.5: Curva ROC de métodos de aprendizaje automático Random Forest y Support vector machine para la predicción de resistencia a antituberculosos

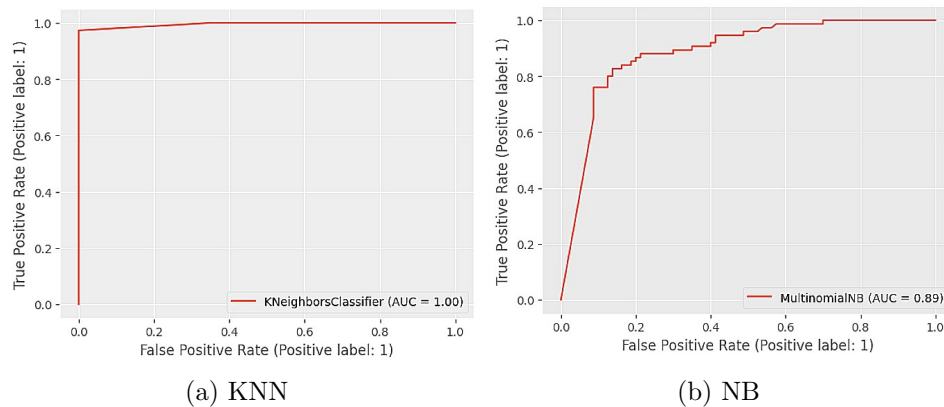


Figura 3.6: Curva ROC de métodos de aprendizaje automático k vecinos más cercanos y Naive Bayes para la predicción de resistencia a antituberculosos

4. Discusión

4.1 Espoligotipos y linajes de MTB en América Latina y el Caribe

El grado de diversidad genética dentro del MTBC ha sido un tema ampliamente debatido. *M. tuberculosis* se caracteriza por ser un microorganismo poco susceptible a la transferencia horizontal, lo que conlleva a un patrón clonal de evolución donde las cepas y los linajes emergen de un ancestro común (Woodman, Haeusler y Grandjean, 2019). En este estudio se pudo evidenciar la presencia de 4 linajes de tuberculosis como lo fueron el linaje 1 o Indo-oceánico con presencia de espoligotipos de África oriental e India (EAI), el linaje 2 también denominado Este de Asia que incluye al sublinaje Beijing, linaje 3 o Asia central/Este de África (CAS-DELHI) y linaje 4 o Euroamericano, incluyendo a los sublinajes Latinoamericano-Mediterráneo (LAM), Haarlem y las familias de espoligotipos T, X y S. Adicionalmente se encontró la presencia de 86 patrones de espoligotipos diferentes, lo que sugiere una amplia diversidad genómica circulante en América Latina y el Caribe.

Se encontraron diferencias entre la proporción de genotipos de *M. tuberculosis* circulantes en los diferentes países (Fig.3.7). El linaje 4 fue dominante en 6 de los 7 países considerados en este estudio y contó con una alta diversidad representada en la identificación de al menos 2 familias diferentes en cada país. La dominancia del linaje 4 en América del Sur, junto con su distribución mundial, respalda la hipótesis de que este linaje fue introducido y dispersado en América durante el proceso de colonización (Comas et al., 2013; Wiens et al., 2018). Otro posible factor asociado a la diversidad genotípica de la tuberculosis en las Américas son los patrones diferenciales de migración humana a lo largo del continente (Woodman, Haeusler y Grandjean, 2019).

La identificación de linajes y sublinajes de tuberculosis, resulta fundamental no solo para el entendimiento de los patrones de dispersión del microorganismo, sino para su posible asociación con fenotipos clínicos, transmisibilidad, probabilidad de resistencia a los medicamentos y adaptación a distintas poblaciones humanas. Por ejemplo, el genotipo Beijing es especialmente relevante dentro del MBTC al exhibir características de multi-resistencia y mayor virulencia (T. Luo et al., 2015). Adicionalmente, investigaciones sugieren que diferentes genotipos pueden tener velocidades de transmisión diferenciales, así como prevalencia por grupos poblacionales específicos (Sgaragli y Frosini, 2016).

4.2 Resistencia antibiótica de MTB en aislados latinoamericanos.

En cuanto a la farmacorresistencia en América latina, se estima que de cada 11000

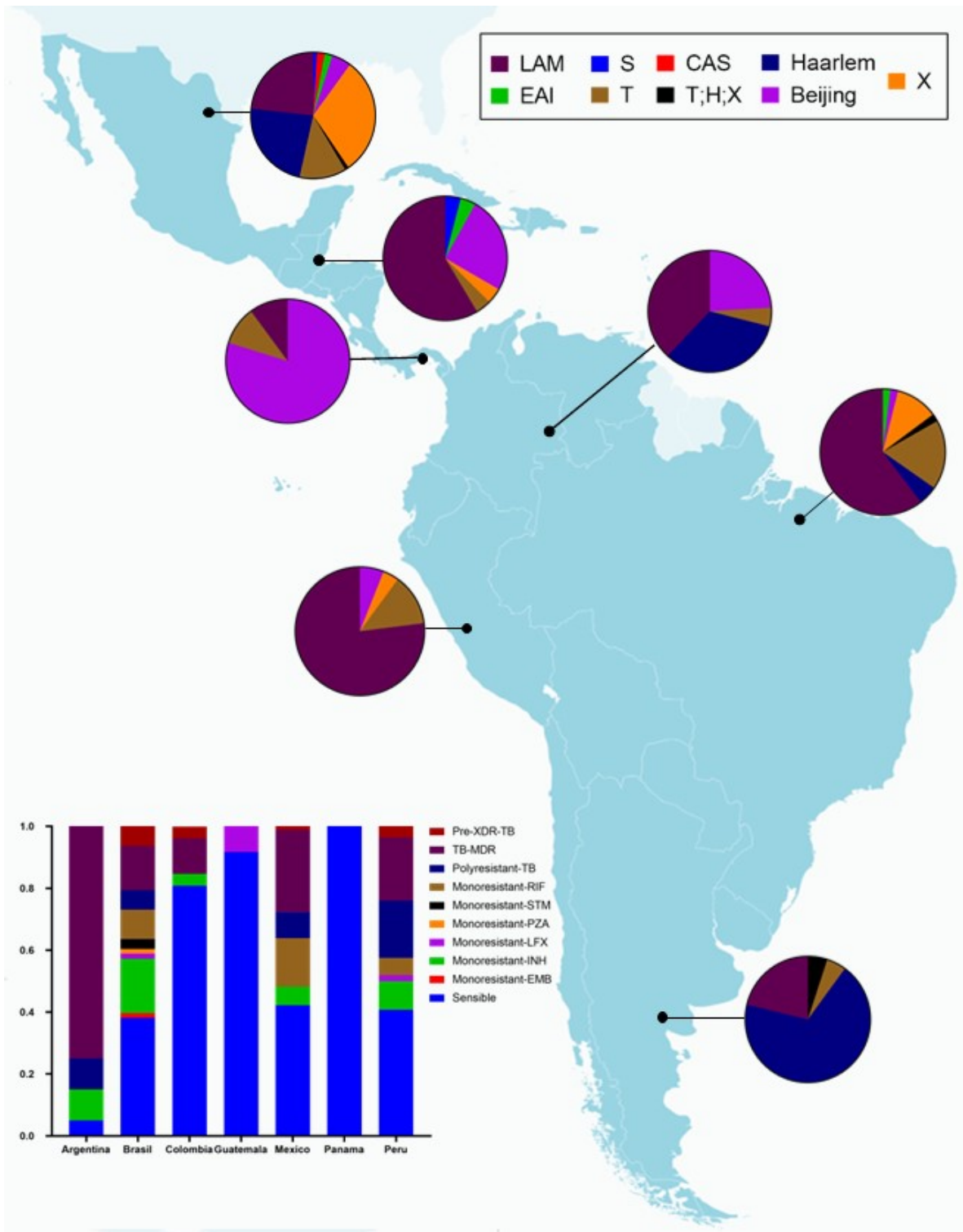


Figura 3.7: Clasificación de los aislamientos de *M. tuberculosis* analizados

pacientes con tuberculosis resistente, solo 5000 son diagnosticados correctamente, de los cuales solo el 89 % reciben tratamiento y de estos, solo el 59 % de los casos, concluye con

la erradicación del patógeno (PAHO, 2020). La multi-resistencia de *M. tuberculosis* en Latinoamérica es un problema que cobra cada vez más relevancia. Se estima que un 9 % del total de casos de tuberculosis en Perú presenta resistencia a fármacos, comparado con un 3 % tanto en Brasil como México (PAHO, 2020). En el año 2017 solo el 33 % de estos pacientes recibieron pruebas de resistencia a fármacos, lo que deja un preocupante estimado de 7 mil pacientes con tuberculosis resistente no diagnosticados o tratados. Además, la fracción de tratamiento exitoso de tuberculosis en el continente americano solo alcanzó un 56 % (PAHO, 2020).

En este estudio se pudo evidenciar la presencia de 45 mutaciones críticamente asociadas con resistencia a fármacos (Tabla 3.2), así como un amplio espectro de fenotipos resistentes como lo fueron casos de monoresistencia a 6 fármacos diferentes, TB-MDR, tuberculosis polidrogoresistente y casos de TB Pre-XDR. Es de resaltar que el 47 % de los aislados estudiados presentaron al menos una mutación asociada a resistencia. Se evidenció una amplia variabilidad sobre el gen *rpoB*, el cual se emplea no sólo como marcador para la resistencia a la rifampicina, sino que a su vez se emplea para el diagnóstico de la tuberculosis, toda vez que este gen codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa del microorganismo.

Investigaciones recientes demuestran que el gen *rpoB* es altamente polimórfico y las mutaciones pueden variar significativamente en función del linaje microbiano y su localización geográfica (Htike et al., 2014; Thirumurugan et al., 2015; Vergara Gómez, González-Martin y Garcia-Basteiro, 2017; Kigozi et al., 2018; Zaw, Emran y Lin, 2018; Wanzala et al., 2019). Estas variaciones podrían disminuir la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico molecular en diferentes regiones del mundo. En 2015 Sánchez y colaboradores, identificaron que la mutación *rpoB* I491F se expresaba en el 30 % de las cepas aisladas de *M. tuberculosis* en Swazilandia, dicha mutación no se detecta mediante el uso de Xpert MTB/RIF y había sido catalogada como una mutación de baja frecuencia en aislamientos clínicos de otras regiones del mundo, como Hong Kong y Australia (Sanchez-Padilla et al., 2015), lo que implica una reducción en la sensibilidad del diagnóstico por Xpert MTB/RIF en Swazilandia y presumiblemente da como resultado un diagnóstico insuficiente y un tratamiento potencialmente inadecuado. La transmisión adicional de la cepa *rpoB* I491F en esta población es otra consecuencia probable (Sanchez-Padilla et al., 2015).

La resistencia a la isoniazida es causada por diferentes mecanismos moleculares que pueden estar asociados a variaciones en la patogenicidad de las cepas resistentes. La resistencia a este fármaco está asociada a cambios puntuales en los genes *katG* o *inhA*. En este estudio se encontraron únicamente mutaciones en *katG* (S315T / S315N). La

resistencia antibiótica asociada a este gen se presenta en cepas catalasa-negativas con mutaciones deletéreas o puntuales que generan una catalasa-peroxidasa inactiva que no puede modificar químicamente a la prodroga en un conjunto de especies altamente reactivas (Vilchèze y Jacobs, 2007).

Estudios recientes proponen que el grado de resistencia a la isoniacida varía en función del gen en el que se presenta la mutación (Getahun et al., 2022). Las mutaciones en el promotor *inhA* generalmente confieren resistencia de bajo nivel, mientras que las mutaciones en el gen *katG*, particularmente en S315T se asocian con resistencia de alto nivel (Machado et al., 2013). Las mutaciones en *katG* son las principales mutaciones genéticas en la TB MDR, este hallazgo destaca la importancia de los procesos de caracterización genómica para el tratamiento de la tuberculosis, conocer previamente las mutaciones causantes del fenotipo resistente podría beneficiar a los pacientes, quienes en función de las variantes encontradas podrían requerir dosis más altas para la erradicación del bacilo.

Se identificaron 4 casos de resistencia a la etionamida, todos ellos causados por la presencia de las mutaciones P378L o S390L en el gen *ethA*, las mutaciones encontradas se asociaron a aislamientos de tuberculosis clasificados como polidrogoresistentes o TB-MDR con poliresistencia, en los cuales ocurrieron en simultáneo casos de resistencia a la pirazinamida, isoniacida, rifampicina, estreptomycin y/o etambutol. En total se presentaron 26 casos de resistencia al etambutol asociados a eventos de tuberculosis polidrogoresistente y Pre-XDR, todos ellos con mutaciones en el gen *embB*. Adicionalmente, se evidenció un caso de monoresistencia a este fármaco. Es de resaltar que las pruebas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis que incorporan sondas para la identificación de antituberculosos de segunda línea, están limitadas a unos pocos genes, lo que genera falsos negativos frente a este tipo de fármacos. En el caso puntual de este estudio, la prueba molecular Xpert MTB/XDR no logró identificar la resistencia al etambutol.

No se encontraron mutaciones asociadas a resistencia a la amikacina, capreomicina, kanamicina, bedaquilina, clofazimina, linezolid, moxifloxacina y ácido paraaminosalicílico. Sin embargo, se evidenció la presencia de la mutación *ddn* L49P, la cual es categorizada por la OMS como de significancia incierta. Estudios sugieren que L49 participa en la activación de bedaquilina, delamanida y pretomanida (Reichmuth et al., 2020). Se cree que L49P confiere resistencia cruzada a estos fármacos (B. M. Lee et al., 2020; Reichmuth et al., 2020). Sin embargo, aún se requieren más estudios para confirmar esta afirmación.

4.3 Rendimiento *In-silico* de pruebas de diagnóstico molecular.

Las pruebas de diagnóstico molecular basadas en PCR emplean como principio de identificación la hibridación de cebadores moleculares específicos sobre genes diana, como es el caso del gen *rpoB*, causante de hasta el 95 % de los casos de tuberculosis resistente a la rifampicina y que a su vez codifica para una subunidad de la RNA polimerasa del microorganismo, permitiendo la identificación clínica del bacilo y casos de resistencia en menos de 24 horas, lo que representa una importante reducción en el tiempo de diagnóstico de esta patología. El uso de pruebas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis se ha ampliado considerablemente desde 2010, cuando la OMS recomendó por primera vez el uso de la prueba rápida Xpert MTB/RIF. En Latinoamérica la disponibilidad de pruebas de diagnóstico molecular rápido ha aumentado notablemente, pasando de los 11 equipos que había en el 2011 a 591 del 2019 (PAHO, 2020). El diagnóstico de casos de tuberculosis con estas pruebas aumentó de 13,1 % en el 2017 a 25,0 % en el 2019. Sin embargo, la baciloscopia sigue siendo el método más utilizado para el diagnóstico inicial de la tuberculosis en la Región de las Américas.

El análisis *In-silico* de las pruebas GenoType MDRTB plusv 2.0, Genoscholar NTM + MDRTB; Xpert MTB/RIF Classic y Xpert MTB/RIF Ultra y Xpert MTB/XDR, permitió evidenciar la elevada capacidad de las técnicas moleculares basadas en PCR para el diagnóstico de la tuberculosis y la identificación de resistencia a la rifampicina, con valores de sensibilidad superiores al 95 % para todas las técnicas. Sin embargo, la información que aportan estas pruebas a la identificación de antituberculosos de segunda línea es limitada.

Existen numerosos estudios que comparan la efectividad de las técnicas de detección por amplificación con respecto a técnicas de cultivo directo, como las realizadas por Piersimoni y colaboradores en 2019, quienes reportan tasas de sensibilidad entre el 87 % y el 95 % para Xpert MTB/RIF Ultra y alrededor del 75 % para Xpert MTB/RIF (Piersimoni et al., 2019).

Las pruebas de diagnóstico molecular, pese a lograr un diagnóstico rápido, presentan una sensibilidad intermedia, mejor que la microscopía de frotis, pero menor que el cultivo directo del microorganismo, con el riesgo de resultados falsos negativos (Allahyartorkaman et al., 2019). Adicionalmente, pueden presentar disminución en su sensibilidad en pacientes co-infectados con VIH (Vergara Gómez, González-Martin y Garcia-Basteiro, 2017; Bahr et al., 2018). En este estudio, se pudo comprobar la necesidad de implementar nuevas sondas asociadas a diferentes genes para mejorar la capacidad diagnóstica de las pruebas moleculares y la importancia de conocer las mutaciones circulantes en

las diferentes regiones para la selección de los métodos moleculares de diagnóstico.

La utilidad de las tecnologías de secuenciación de próxima generación ha sido ampliamente estudiada para mejorar la detección de tuberculosis resistente a los medicamentos en todo el mundo (Gardy y Loman, 2018). La secuenciación de genoma completo (WGS) por sus siglas en inglés, ya está siendo implementada en países como Reino Unido, Dinamarca y Estados Unidos para reemplazar las pruebas de susceptibilidad a fármacos en la clínica y está siendo evaluada como estrategia de la OMS para la predicción de perfiles de susceptibilidad a antituberculosos de primera línea (Faksri et al., 2016). Diversos estudios han intentado validar WGS para intervenciones de salud pública. Gardy, Johnston et al., 2011 demostraron la resolución limitada de MIRU-VNTR para la investigación de brotes de tuberculosis mediante la secuenciación de 32 aislamientos de *M. tuberculosis* de un brote de tuberculosis de tres años en Columbia, Canadá.

Otros estudios han investigado el impacto potencial de WGS en el beneficio del paciente, al intentar predecir la susceptibilidad de los genotipos aislados a los antituberculosos. Koser et al., 2013 demostraron que WGS puede proporcionar a los médicos tratantes información valiosa en un período de tiempo clínicamente relevante, varias semanas antes de que se obtengan los resultados de susceptibilidad fenotípica, cuyos resultados son afectados por el tiempo de replicación del microorganismo. Más recientemente, Pankhurst et al., 2016 calcularon los costos del tratamiento hospitalario para tuberculosis resistente a los medicamentos, comparando el costo de las pruebas fenotípicas y WGS, encontrando diferencias mínimas, que corroboran la viabilidad económica de esta estrategia.

El advenimiento de las técnicas de secuenciación ha convertido a WGS en una alternativa más rápida y cada vez más accesible para los estudios de epidemiología molecular. Sin embargo, estas tecnologías aún se usan de forma limitada para el estudio de la tuberculosis, especialmente en regiones como América Latina y el Caribe. Este trabajo busca complementar la información disponible frente a esta patología en la región y resaltar la importancia de generar datos genómicos que puedan impactar directamente la salud pública y el bienestar del paciente.

Referencias

- Allahyartorkaman, Mohammadreza et al. (2019). «Low diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: A multicenter surveillance». En: *Scientific reports* 9.1, pp. 1-6.

- Bahr, Nathan C et al. (2018). «Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculous meningitis in HIV-infected adults: a prospective cohort study». En: *The Lancet Infectious Diseases* 18.1, pp. 68-75.
- Bolger, Anthony M, Marc Lohse y Bjoern Usadel (2014). «Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data». En: *Bioinformatics* 30.15, pp. 2114-2120.
- Brown, Joseph, Meg Pirrung y Lee Ann McCue (2017). «FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool». En: *Bioinformatics* 33.19, pp. 3137-3139.
- Cingolani, Pablo et al. (2012). «A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3». En: *Fly* 6.2, pp. 80-92.
- Coll, Francesc et al. (2014). «A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains». En: *Nature communications* 5.1, pp. 1-5.
- Comas, Iñaki et al. (2013). «Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans». En: *Nature genetics* 45.10, pp. 1176-1182.
- Faksri, Kiaticchai et al. (2016). «Bioinformatics tools and databases for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis*». En: *Infection, Genetics and Evolution* 45, pp. 359-368.
- Gardy, Jennifer L, James C Johnston et al. (2011). «Whole genome sequencing and social network analysis of a tuberculosis outbreak». En: *New England Journal of Medicine* 364.8, pp. 730-739.
- Gardy, Jennifer L y Nicholas J Loman (2018). «Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system». En: *Nature Reviews Genetics* 19.1, pp. 9-20.
- Getahun, Muluwork et al. (2022). «Minimum inhibitory concentrations of rifampin and isoniazid among multidrug and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia». En: *Plos one* 17.9, e0274426.
- Htike, Kyi Pyar Min et al. (2014). «Novel mutation detection IN rpoB OF rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using pyrosequencing». En: *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 45.4, p. 843.
- Kigozi, Edgar et al. (2018). «Prevalence and patterns of rifampicin and isoniazid resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Uganda». En: *PLoS One* 13.5, e0198091.
- Koser, Claudio U et al. (2013). «Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis*». En: *New England journal of medicine* 369.3, pp. 290-292.

- Lee, Brendon M et al. (2020). «Predicting nitroimidazole antibiotic resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* with protein engineering». En: *PLoS pathogens* 16.2, e1008287.
- Lee, Robyn S y Marcel A Behr (2016). «The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis». En: *Therapeutic advances in infectious disease* 3.2, pp. 47-62.
- Li, Heng (2013). «Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM». En: *arXiv preprint arXiv:1303.3997*.
- Luo, Tao et al. (2015). «Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.26, pp. 8136-8141.
- Machado, Diana et al. (2013). «High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations». En: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68.8, pp. 1728-1732.
- McKenna, Aaron et al. (2010). «The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data». En: *Genome research* 20.9, pp. 1297-1303.
- Ng, Kamela CS et al. (2019). «Bridging the TB data gap: in silico extraction of rifampicin-resistant tuberculosis diagnostic test results from whole genome sequence data». En: *PeerJ* 7, e7564.
- Okonechnikov, Konstantin, Ana Conesa y Fernando Garcia-Alcalde (2016). «Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data». En: *Bioinformatics* 32.2, pp. 292-294.
- PAHO (2020). *Tuberculosis en las Américas - Informe Regional 2019*. URL: <https://www.paho.org/es/documentos/tuberculosis-americas-informe-regional-2019> (visitado 08-11-2021).
- Pai, Madhukar (2020). «Tuberculosis: the story after the Primer». En: *Nature Reviews Disease Primers* 6.1, pp. 1-2.
- Pankhurst, Louise J et al. (2016). «Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study». En: *The Lancet Respiratory Medicine* 4.1, pp. 49-58.
- Piersimoni, Claudio et al. (2019). «Comparative evaluation of Xpert MTB/RIF and the new Xpert MTB/RIF ultra with respiratory and extra-pulmonary specimens for tuberculosis case detection in a low incidence setting». En: *Journal of clinical tuberculosis and other mycobacterial diseases* 15, p. 100094.

- Rausch, Tobias et al. (2019). «Alfred: interactive multi-sample BAM alignment statistics, feature counting and feature annotation for long-and short-read sequencing». En: *Bioinformatics* 35.14, pp. 2489-2491.
- Reichmuth, Martina L et al. (2020). «Natural polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis conferring resistance to delamanid in drug-naive patients». En: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64.11, e00513-20.
- Sanchez-Corrales, Lusayda et al. (2021). «Phylogenomic analysis and Mycobacterium tuberculosis antibiotic resistance prediction by whole-genome sequencing from clinical isolates of Caldas, Colombia». En: *PloS one* 16.10, e0258402.
- Sanchez-Padilla, Elisabeth et al. (2015). «Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland». En: *New England Journal of Medicine* 372.12, pp. 1181-1182.
- Sgaragli, Giampietro y Maria Frosini (2016). «Human tuberculosis I. Epidemiology, diagnosis and pathogenetic mechanisms». En: *Current medicinal chemistry* 23.25, pp. 2836-2873.
- Thirumurugan, Ravibalan et al. (2015). «Molecular analysis of rpoB gene mutations in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India». En: *Journal of Infection and Public Health* 8.6, pp. 619-625.
- Vergara Gómez, A, J González-Martin y AL Garcia-Basteiro (2017). «Xpert® MTB/RIF: utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis y de la resistencia a la rifampicina». En: *Medicina Clinica* 149.9, pp. 399-405.
- Vilchèze, Catherine y William R Jacobs Jr (2007). «The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics». En: *Annu. Rev. Microbiol.* 61, pp. 35-50.
- Wanzala, Sylvia I et al. (2019). «Retrospective Analysis of Archived Pyrazinamide Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates from Uganda—Evidence of Interspecies Transmission». En: *Microorganisms* 7.8, p. 221.
- Wiens, Kirsten E et al. (2018). «Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis». En: *BMC medicine* 16.1, pp. 1-13.
- Wood, Derrick E, Jennifer Lu y Ben Langmead (2019). «Improved metagenomic analysis with Kraken 2». En: *Genome biology* 20.1, pp. 1-13.
- Woodman, Marc, Ilsa L Haeusler y Louis Grandjean (2019). «Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective». En: *Genes* 10.1, p. 53.

- World Health Organization (2013). *Xpert MTB/RIF implementation manual*. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112469/9789241506700_eng.pdf (visitado 30-09-2021).
- (2019). *Colombia: country profiles*. URL: https://www.who.int/gho/countries/col/country_profiles/en/ (visitado 08-08-2021).
- (2021). *Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistances*. URL: <https://www.who.int/publications/item/9789240028173> (visitado 08-09-2021).
- Zaw, Myo T, Nor A Emran y Zaw Lin (2018). «Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis». En: *Journal of infection and public health* 11.5, pp. 605-610.

Conclusiones generales

4.1. Contribuciones del trabajo de grado

Este trabajo presenta una caracterización de polimorfismos asociados a la resistencia antibiótica en 310 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de 7 países de América Latina y el Caribe. Se realizó un aporte al conocimiento de los linajes y espoligotipos del bacilo tuberculoso que circulan en la región, describiendo 86 patrones de espoligotipos de los cuales 20 son considerados patrones huerfanos, es decir que no habían sido reportados previamente en la base de datos SITVITWEB.

Proponemos un flujo de trabajo bioinformático pensado para la identificación de variantes de interés en *Mycobacterium tuberculosis*, el cual aborda desde la limpieza de las lecturas crudas hasta la interpretación clínica de las variantes obtenidas. Para el desarrollo de esta investigación se creó un programa creado en python que clasifica las variantes encontradas en función de su resistencia antibiótica basado en el catálogo de mutaciones de resistencia de la Organización Mundial de la Salud y brinda al usuario un reporte detallado que incluye el gen, la mutación encontrada, el fármaco asociado a resistencia, la sensibilidad y especificidad asociada a la variante y su clasificación en términos de resistencia. Adicionalmente, este programa realiza 4 pruebas moleculares *In silico* para la detección de resistencia a la rifampicina. El conocimiento de polimorfismos locales de genes asociados a resistencia empleados en el diagnóstico de tuberculosis proporciona a los médicos herramientas valiosas que permiten elegir y optimizar el método de diagnóstico más apropiado, reduciendo así el tiempo de detección.

El presente trabajo genera una ampliación en el conocimiento acerca de mutaciones específicas en genes asociados a la resistencia antibiótica en *Mycobacterium tuberculosis* que circulan en Latinoamérica y específicamente en Colombia. Esta información resulta valiosa para comprender factores epidemiológicos de esta enfermedad. Adicionalmente, evaluar la capacidad diagnóstica de las pruebas moleculares respecto a las variaciones

génicas circulantes, permite reafirmar las estrategias adoptadas por el sector salud para el diagnóstico de la tuberculosis o identificar la necesidad de optimizar las estrategias para la identificación y monitoreo de esta patología.

Este trabajo permitió fortalecer redes de conocimiento especializado, mediante la cooperación entre el Grupo de Investigación Médica de la Universidad de Manizales, el Grupo de Investigación en Redes y Tecnologías de la Información - GITIR de la Universidad de Caldas y el Grupo de Resistencia Antibiótica de Manizales - GRAM. A nivel personal, el desarrollo de este trabajo contribuyó a mi formación en el campo de la bioinformática, a mi desarrollo como investigadora y a mi formación profesional.

4.2. Recomendaciones y trabajos futuros

A futuro se plantea ampliar el número de genomas estudiados, de tal forma que sea posible identificar nuevos esplogotipos y mutaciones asociadas a resistencia para América Latina y el Caribe. Es de resaltar que a la fecha de la entrega de este trabajo han sido reportados nuevos genomas para la región que no fueron tenidos en cuenta en el presente estudio, por ejemplo un dataset de genomas de Paraguay fue publicado en enero de 2023.

Se plantea la posibilidad de continuar desarrollando el script propuesto para la clasificación de variantes de resistencia, con el fin de incorporar recomendaciones de tratamiento antibiótico según los lineamientos de la OMS, de tal forma que se brinde un acercamiento entre los resultados de análisis de secuenciación genómica y el personal de salud encargado de tomar decisiones sobre el tratamiento de los pacientes.

Anexos

5.1. Listado de códigos de acceso de NCBI para las muestras analizadas

Tabla 5.1: Anexo 1. Listado de códigos de acceso de NCBI para las muestras analizadas

México						
ERR3148147	ERR3148169	ERR3148191	ERR3148213	ERR3148160	ERR3148182	ERR3148204
ERR3148148	ERR3148170	ERR3148192	ERR3148214	ERR3148161	ERR3148183	ERR3148205
ERR3148149	ERR3148171	ERR3148193	ERR3148215	ERR3148162	ERR3148184	ERR3148206
ERR3148150	ERR3148172	ERR3148194	ERR3148216	ERR3148163	ERR3148185	ERR3148207
ERR3148151	ERR3148173	ERR3148195	ERR3148217	ERR3148164	ERR3148186	ERR3148208
ERR3148152	ERR3148174	ERR3148196	ERR3148218	ERR3148165	ERR3148187	ERR3148209
ERR3148153	ERR3148175	ERR3148197	ERR3148219	ERR3148166	ERR3148188	ERR3148210
ERR3148154	ERR3148176	ERR3148198	ERR3148220	ERR3148167	ERR3148189	ERR3148211
ERR3148155	ERR3148177	ERR3148199	ERR3148221	ERR3148168	ERR3148190	ERR3148212
ERR3148156	ERR3148178	ERR3148200	ERR3148222	ERR3148226	ERR3148230	ERR3148159
ERR3148157	ERR3148179	ERR3148201	ERR3148223	ERR3148227	ERR3148225	ERR3148229
ERR3148158	ERR3148180	ERR3148202	ERR3148224	ERR3148228	ERR3148181	ERR3148203
Brasil						
ERR2432984	ERR2653010	ERR2653067	ERR2653150	SRR7974377	ERR2653064	ERR2653134
ERR2432998	ERR2653013	ERR2653068	ERR2653165	ERR2652993	ERR2653039	ERR2653122
ERR2433001	ERR2653017	ERR2653073	ERR2653178	ERR2652998	ERR2653046	ERR2653126
ERR2433004	ERR2653021	ERR2653081	ERR2653181	ERR2653003	ERR2653050	ERR2653129
ERR2433005	ERR2653028	ERR2653083	ERR2653186	ERR2653007	ERR2653054	ERR2653131
ERR2652979	ERR2653029	ERR2653092	ERR2653188	ERR2653200	ERR2653207	ERR2653224
ERR2652983	ERR2653031	ERR2653112	ERR2653192	ERR2653202	ERR2653212	ERR2653225
ERR2652989	ERR2653032	ERR2653117	ERR2653199	ERR2653203	ERR2653214	ERR2653229
ERR2653146	SRR7276699	ERR2653138	ERR2653241	ERR2653206	ERR2653222	ERR2653234
Colombia						
SAMN33243733	SAMN33243737	SAMN33243741	SRR1180947	SRR1181051	SRR15508553	SRR15508553
SAMN33243734	SAMN33243738	SAMN33243742	SRR1180972	SRR1181090	SRR15508554	SRR15508554
SAMN33243735	SAMN33243739	SRR1180928	SRR1180999	SRR1181100	SRR15508555	SRR15508555
SAMN33243740	SAMN33243736	SRR1180929	SRR1181037	SRR1181121	SRR15508556	SRR15508556
Argentina						
ERR757160	ERR760600	ERR760798	ERR760877	ERR776459	ERR757189	SRR6848322
ERR757165	ERR760602	ERR760830	ERR760894	ERR776671	ERR760759	ERR772254
ERR757173	ERR760732	ERR760836	ERR760913	ERR845304	ERR760850	

Tabla 5.2: Anexo 1. Listado de códigos de acceso de NCBI para las muestras analizadas

Panamá						
ERR2206618	ERR4403829	ERR2861345	ERR2861342	ERR4403838	ERR2861354	ERR4403833
ERR2206619	ERR4403830	ERR2861346	ERR2861343	ERR4403839	ERR2861355	ERR4403834
ERR2206620	ERR4403831	ERR2861347	ERR2861344	ERR4403840	ERR4403825	ERR4403835
ERR2206621	ERR4403832	ERR2861348	SRR15508557	ERR2861341	ERR2861351	ERR4403836
ERR2206622	ERR2206624	ERR2861349	SRR15508558	ERR2861352	ERR4403843	
ERR2206623	ERR2206625	ERR2861350	ERR4403828	ERR2861353	ERR4403837	
Guatemala						
SRR10808536	SRR10809060	SRR1765874	SRR6389897	SRR6389901	SRR6389906	SRR6389911
SRR10808569	SRR10809067	SRR1765877	SRR6389898	SRR6389903	SRR6389907	SRR6389905
SRR10808744	SRR10809122	SRR1765879	SRR6389899	SRR6389904	SRR6389909	SRR6389900
SRR10809022	SRR1765872	SRR6389896				
Perú						
ERR2451322	ERR2516452	ERR2516546	ERR2516589	ERR2516620	ERR2516698	SRR8698484
ERR2451323	ERR2516457	ERR2516565	ERR2516598	ERR2516632	ERR2516708	SRR8698485
ERR2451324	ERR2516462	ERR2516568	ERR2516605	ERR2516637	ERR2516717	SRR8698486
ERR2516420	ERR2516520	ERR2516581	ERR2516619	ERR2516645	SRR1107609	SRR8698487
ERR2516450	ERR2516538	ERR2516662	SRR8698501	SRR8698507	SRR8698494	SRR8698489
SRR8698491	SRR8698496	ERR2516693	SRR8698502	SRR8698508	SRR8698495	SRR8698490
SRR8698492	SRR8698497	ERR2516697	SRR8698503	SRR8698478	SRR8698499	SRR8698505
SRR8698493	SRR8698498	SRR8698488	SRR8698504	SRR8698479	SRR8698500	SRR8698506

5.2. Genotipos asociados a resistencia antibiótica.

Tabla 5.3: Anexo 2. Genotipos asociados a resistencia antibiótica.

País	Muestra	Genotipos
Argentina	ERR760759	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR776671	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR760798	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR772254	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR776459	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR757165	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR757173	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR757189	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760600	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760602	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760732	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760830	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760836	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760850	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760877	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760894	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	ERR760913	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10P
	SRR6848322	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=PNCA MUT=H51R;GENE=EMBB MUT=G406D
ERR757160	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=PNCA MUT=Q10P	
Colombia	SRR1181090	GENE=GYRA MUT=D94G;GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K43R;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=EMBB MUT=M306V
	SRR1181051	GENE=KATG MUT=S315T
	SAMN33243733	GENE=RPOB MUT=H445N;GENE=RPOB MUT=L452V;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=EMBB MUT=M306V
	SRR1181100	GENE=RPOB MUT=Q432K;GENE=KATG MUT=S315T
	SRR1180972	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K43R;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=EMBB MUT=M306V
	SRR1765872	GENE=GYRA MUT=D94G
Guatemala	SRR1765872	GENE=GYRA MUT=D94G
	SRR1765877	GENE=GYRA MUT=D94N
Mexico	ERR3148213	GENE=GYRA MUT=D94G;GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148169	GENE=GYRA MUT=D94Y;GENE=RPOB MUT=S450L; GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=V139G
	ERR3148162	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148163	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148190	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148208	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148211	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148160	GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148185	GENE=PNCA MUT=H57Y;GENE=EMBB MUT=G406D
	ERR3148223	GENE=RPOB MUT=D435V
	ERR3148215	GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148184	GENE=RPOB MUT=H445D;GENE=RPOB MUT=H445R; GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148200	GENE=RPOB MUT=H445L;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148189	GENE=RPOB MUT=H445Y
	ERR3148167	GENE=RPOB MUT=H445Y;GENE=KATG MUT=S315T
ERR3148171	GENE=RPOB MUT=H445Y;GENE=KATG MUT=S315T	

Tabla 5.4: Anexo 2. Genotipos asociados a resistencia antibiótica

PAIS	MUESTRA	GENOTIPOS
México	ERR3148203	GENE=RPOB MUT=L430P
	ERR3148159	GENE=RPOB MUT=Q432L
	ERR3148147	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148158	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148174	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148177	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148178	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148182	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148188	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148194	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148204	GENE=RPOB MUT=S450L
	ERR3148181	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=EMBB MUT=M306V
	ERR3148221	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148225	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148151	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148154	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148172	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148173	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148176	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148183	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148197	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148198	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148201	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148217	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148219	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148222	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	ERR3148199	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=W68G; GENE=EMBB MUT=M306V
	ERR3148187	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K43R
	ERR3148180	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K43R; GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=V128G
	ERR3148192	GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K88R
	ERR3148170	GENE=RPOB MUT=S450W;GENE=KATG MUT=S315T
	ERR3148175	GENE=RPSL MUT=K88Q;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=L120P
	Perú	ERR2516645
ERR2516619		GENE=GYRA MUT=D94G;GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K43R;GENE=KATG MUT=S315T; GENE=PNCA MUT=G97S;GENE=EMBB MUT=M306V
ERR2516568		GENE=GYRA MUT=S91P
SRR8698485		GENE=KATG MUT=S315T
SRR8698497		GENE=KATG MUT=S315T
SRR8698499		GENE=KATG MUT=S315T
SRR8698505		GENE=KATG MUT=S315T
SRR8698508		GENE=KATG MUT=S315T
ERR2451323		GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=K48T;GENE=EMBB MUT=M306V;GENE=ETHA MUT=P378L
ERR2451324		GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=K48T;GENE=EMBB MUT=M306V;GENE=ETHA MUT=P378L
SRR8698493		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=GID MUT=P84L
SRR8698484		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=EMBB MUT=Y319S
ERR2451322		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=K48T;GENE=EMBB MUT=M306V;GENE=ETHA MUT=P378L
SRR8698488		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10R
SRR8698492		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10R
SRR8698487		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=Q10R;GENE=EMBB MUT=Y319S;GENE=GID MUT=P84L
SRR8698478		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=PNCA MUT=Q10R;GENE=EMBB MUT=Y319S
SRR8698489		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=PNCA MUT=Q10R;GENE=EMBB MUT=Y319S;GENE=GID MUT=P84L
ERR2516717		GENE=RPOB MUT=D435V;GENE=RPSL MUT=K43R;GENE=PNCA MUT=Y103H
SRR8698496		GENE=RPOB MUT=D435Y;GENE=KATG MUT=S315T
ERR2516538		GENE=RPOB MUT=D435Y;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=H51R
ERR2516546		GENE=RPOB MUT=D435Y;GENE=RPSL MUT=K43R;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=EMBB MUT=M306V
ERR2516589		GENE=RPOB MUT=L452P
ERR2516708		GENE=RPOB MUT=L452P
ERR2516698		GENE=RPOB MUT=S450L
ERR2516693		GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=EMBB MUT=D328Y
ERR2516462		GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=PNCA MUT=H51R
ERR2516457		GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=PNCA MUT=H51R;GENE=EMBB MUT=G406D
ERR2516598		GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K43R;GENE=EMBB MUT=Q497R
ERR2516697		GENE=RPOB MUT=S450L;GENE=RPSL MUT=K43R;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=ETHA MUT=S390F
ERR2516605		GENE=RPOB MUT=S450W;GENE=KATG MUT=S315T;GENE=PNCA MUT=D8G
ERR2516632		GENE=RPOB MUT=S450W;GENE=PNCA MUT=Y103C;GENE=EMBB MUT=G406D
Brasil		ERR2653222
	ERR2432984	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653126	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653131	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653138	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653206	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653207	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653212	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653214	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653225	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653241	GENE=KATG MUT=S315T
	ERR2653021	GENE=PNCA MUT=H57Y

5.3. Identificación y clasificación de variantes asociadas a resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* a partir de datos de WGS.

A continuación, se presentan algunas capturas de las salidas generadas por el script MTBResUCaldas, empleado para la clasificación de mutaciones asociadas a resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.

1. Clasificación de variantes en genes asociados a resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.

1.1 Registro de mutaciones de resistencia para los antituberculosos evaluados:

PAIS	MUESTRA	INH	ETO	RIF	EMB	PZA	LFX	MXF	AMK	STM	LZD
Argentina	ERR757160	NA	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	TGN=PNCA TACH=Q10P	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR757165	TGN=KATG TACH=S315T	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	TGN=PNCA TACH=Q10P	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR757173	TGN=KATG TACH=S315T	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	TGN=PNCA TACH=Q10P	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR757189	TGN=KATG TACH=S315T	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	TGN=PNCA TACH=Q10P	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR760600	TGN=KATG TACH=S315T	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	TGN=PNCA TACH=Q10P	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR760602	TGN=KATG TACH=S315T	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	TGN=PNCA TACH=Q10P	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR760732	TGN=KATG TACH=S315T	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	TGN=PNCA TACH=Q10P	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR760759	TGN=KATG TACH=S315T	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Argentina	ERR760798	TGN=KATG TACH=S315T	NA	TGN=RPOB TACH=S450L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Figura 5.1: Anexo 3. Registro de mutaciones generado en el proceso de clasificación de variantes

1.2 Reporte de significancia

```

REPORTE DE SIGNIFICANCIA CLÍNICA GLOBAL
Argentina:
ERR757160
  Gen -> RPOB RESISTANCE - Mutación -> S450L - DRUG: RIF; VARIANT_NAME: RPOB_S450L; %SENSIVITY. 66.2%; %SPECIFICITY. 99.7%; OMS DEFINITION: ASSOCIATED WITH RESISTANCE
  Gen -> PNCA RESISTANCE - Mutación -> Q10P - DRUG: PZA; VARIANT_NAME: PNCA_Q10P; %SENSIVITY. 2.5%; %SPECIFICITY. 100.0%; OMS DEFINITION: ASSOCIATED WITH RESISTANCE
-----
ERR757165
  Gen -> RPOB RESISTANCE - Mutación -> S450L - DRUG: RIF; VARIANT_NAME: RPOB_S450L; %SENSIVITY. 66.2%; %SPECIFICITY. 99.7%; OMS DEFINITION: ASSOCIATED WITH RESISTANCE
  Gen -> KATG RESISTANCE - Mutación -> S315T - DRUG: INH; VARIANT_NAME: KATG_S315T; %SENSIVITY. 77.7%; %SPECIFICITY. 99.5%; OMS DEFINITION: ASSOCIATED WITH RESISTANCE
  Gen -> PNCA RESISTANCE - Mutación -> Q10P - DRUG: PZA; VARIANT_NAME: PNCA_Q10P; %SENSIVITY. 2.5%; %SPECIFICITY. 100.0%; OMS DEFINITION: ASSOCIATED WITH RESISTANCE

```

Figura 5.2: Anexo 3. Reporte de mutaciones encontradas y su interpretación

2. Determinación de resistencia In silico para pruebas moleculares de uso clínico

2.1 GenoType MDRTB plus v2.0

Sample name	RIF Resistance	Codon number	Codon	Absent Probe	WT1	WT2	WT3	WT4	WT5	WT6	WT7	WT8	MUT1	MUT2A	
tabFiles\ERR757160.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR757165.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR757173.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR757189.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR760600.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR760602.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR760732.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR760759.tab	NOT DETECTED														
tabFiles\ERR760798.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR760830.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
tabFiles\ERR760836.tab	DETECTED	450	TTG	WT8	MUT3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1

Figura 5.3: Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica GenoType MDRTB plus v2.0

2.2 Genoscholar NTM+MDRTB II

Sample name	RIF Resistance	Codon number	Codon	Absent Probe	Developing Probe	S1	S2	S3	S4	S5	R2	R4a	R4b	R5
tabFiles\ERR757160.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR757165.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR757173.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR757189.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR760600.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR760602.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR760732.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR760759.tab	NOT DETECTED													
tabFiles\ERR760798.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR760830.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR760836.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1
tabFiles\ERR760850.tab	DETECTED	450	TTG	S5	R5	1	1	1	1	0	0	0	0	1

Figura 5.4: Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica Genoscholar NTM+MDRTB II

2.3 Xpert MTB/RIF Classic y Xpert MTB/RIF Ultra

Sample name	RIF Resistance	Codon number	Codon	Capturing Probe	ProbeA	ProbeB	ProbeBdelayed	ProbeC	ProbeD	ProbeDdelayed	ProbeE	
tabFiles\ERR757160.tab	DETECTED	450	TTG	ProbeE	1	1	1	1	1	1	0	1
tabFiles\ERR757165.tab	DETECTED	450	TTG	ProbeE	1	1	1	1	1	1	0	1
tabFiles\ERR760600.tab	DETECTED	450	TTG	ProbeE	1	1	1	1	1	1	0	1
tabFiles\ERR760602.tab	DETECTED	450	TTG	ProbeE	1	1	1	1	1	1	0	1
tabFiles\ERR760732.tab	DETECTED	450	TTG	ProbeE	1	1	1	1	1	1	0	1
tabFiles\ERR760759.tab	NOT DETECTED											
tabFiles\ERR760798.tab	DETECTED	450	TTG	ProbeE	1	1	1	1	1	1	0	1
tabFiles\ERR760830.tab	DETECTED	450	TTG	ProbeE	1	1	1	1	1	1	0	1

Figura 5.5: Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica Xpert MTB/RIF Classic

Sample name	RIF Resistance	Codon number	Codon	Capturing Probe	rpoB1	rpoB2	rpoB3	rpoB4A	rpoB4B	deltaTm
tabFiles\ERR757160.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR757165.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR757173.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR757189.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR760600.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR760602.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR760732.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR760759.tab	NOT DETECTED									
tabFiles\ERR760798.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR760830.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5
tabFiles\ERR760836.tab	DETECTED	450	TTG	rpoB3, rpoB4A	1	1	0	0	1	2.5-2.9, 6.0-6.5

Figura 5.6: Anexo 3. Resultado de análisis in silico para la prueba diagnóstica Xpert MTB/RIF Ultra

5.4. Listado de Espoligotipos y linajes de *Mycobacterium tuberculosis* para latinoamérica

Tabla 5.5: Anexo 4: Espoligotipos y linajes de *Mycobacterium tuberculosis* para latinoamérica Parte 1

Spoligotype	Spoligotype octal	Lineage - Clade	Subclade
11011111111111111111001111111000010111111111	677777477413771	L.1 Indo-Oceanic	EAI2
111111110111111111111111111111000010111110111	776777777413731		EAI1
111111111111111111111111111111000010111110111	777777777413731		
00111110111	000000000003731	L.2 East-Asian	Beijing
001111111111	000000000003771		
00	000000000000000	L.3 East-African-Indian	CAS
000	000000000000000		
00	000000000000000		
0001111111111111111111000011111111000011111111	077777607760771	L.4 Euro-American	NA
0111111100011111111110000000000000000000000000000	376177600000000		
111111110001111111111000011111110000011111111	776177607740771		
11111111110000000000000011111111000011111111	777400007760771		
1111111111111111111111100011111111000011111111	777777743760771		
1111111111111111111111111111110001000011111111	77777777420771		
111111111111111111011100111111110000100111111	777777347760471		
11111111111111111111110000111110000000110111	777777607600331		
1111111100011111111100001111111100001110100	776177607760720		
1110000000001111101111111111111111000011111111	700076777760771		
11111111000000000000000000000011000011111111	776000000060771		
1111111100000000000000000000111011000011111111	776000003660771		
11111111000101111111000011111111000011111111	776137607760771		
111111111111111111111111111111011000011111111	777777777660771		
11111100001111111111111111000001000011111111	770177774020771	mainly T	
0000000000000000000000000010000001000011111111	000000004020771	L4.1 Euro-American	T;H;X
11111111111111111101111110000000000000000000000	777776770000000		
111111111111111111111111111000000100001110111	777777774020731		
11111111101011111111111111000000100001110111	777537774020731		
1111111111111111111111111111110111000011111111	777777777560771		
11100000000011110111111111111111000011111111	700036777760771		
111111111111111110111111111111111100001100001	777776777760601	X-type	T1
110111111111111110111111111111111100001100001	677776777760601		
11100000000011111011100111111111000011111111	700076717760771		
1111111111111111110110111000000000000000000000	777776670000000		
0000000000000000000000000010000001000011111101	000000004020761		
11111111111111111111111100000000100001100011	777777760020611		
0000000000000000000000000011111111000011111111	000000007760771		
110000000000000000000000000000000000000011111111	600000000000771		
1110000011111111111111111111111111000011111111	701777777760771		Haarlem
11111111111011111111111110000001000011111111	777737774020771		
11111111111111111111111110111111000011111111	777777775760771		

Tabla 5.6: Anexo 4: Espoligotipos y linajes de *Mycobacterium tuberculosis* para Latinoamérica Parte 2

Spoligotype	Spoligotype octal	Lineage - Clade	Subclade
1001111111101111111000011111110000111111	477737607760771		
1111111000111111111000011111110000111011	776177607760731		
1111111000111111111000011111110000111111	776177607760771		
111111111111111110000111111101110000111111	777774077560771		
11111111111111111110000111101110000111011	77777407560731		
11111111111111111110000111111110000111111	77777607760771		
01111110001111011110000111111110000111111	376173607760771		
111111100011100000000000000000000000001111	776160000000071		
11111110001111111100000000000000000001111	776177400000171		
11111110001111111110000111111000000001111	776177607700171		
11111110001111111110000111111100001110000	776177607760700		
000000000000000000001000100010000000000000	000000204200000		
111000000011111111100001111011100001110011	700177607560711		
11110001111111110000111111101110000111011	743774077560731		
111100111111111111100011111101110000111111	74777437560771		
1111111100000000110000111101110000111111	77700607560771		
111111111111111110000111111000010000111111	777774077020771	L4.3	Euro-American
111111111111111111010000111101110000111111	77777207560771		LAM
1111111111111111111110000000000000000000	77777600000000		
1111111111111111111110000111101110000111111	77777607560771		
1111111111111111111110000111111000000111111	77777607700771		
011111111111111111111000011111110000111111	37777607760771		
110110111111111111111000011111110000111111	67377607760771		
110111111110111111110000111111100001110011	677737607760711		
110111111110111111110000111111100001111000	677737607760740		
110111111111111111111000011111110000111111	67777607760771		
110000011111110111000011111110000111111	601775607760771		
11011111111011111111000011111110000111111	677737607760771		
111111111110000011000011111110000111111	777700607760771		
1111111111101111111000011111110000111111	777737607760771		
111111111111111111111000010000110000111011	77777604060731		
11111111111111111111100001100001100001111011	77777606060751		
1111111111111111111110000111111100001110000	77777607760700		
111111111111111111111000011111110000111011	77777607760731		
111111100000000000000000000000000000001111	77600000000171	L4.4	Euro-American
11111110011111111111111111111110000111111	77637777760771		S-type
111111111111111111100000001111110000111111	777777001760771	L4.7	Euro-American
1111111111111111111101101111111110000111111	77777557760771		mainly T
111111111110000011111111111110000111111	77774077760771		
11111111111111111111111111111110000111011	77777777760731	L4.8	Euro-American
11111111111111111111111111111110000111111	77777777760771		mainly T

Modificaciones realizadas al documento a partir de la evaluación de tesis.

6.1. Evaluador 1.

Tabla 6.1: Modificaciones realizadas de acuerdo a la evaluación de la Evaluadora Ghennie Rodríguez

Evaluador 1: Ghennie Tatiana Rodríguez	
Evaluación	Corrección realizada
Modificaciones de forma	Se realizaron las modificaciones de forma sugeridas por la evaluadora tales como: <ol style="list-style-type: none">1. Uso correcto de las abreviaciones.2. Adición de espacios dentro del texto3. Uso de cursivas y signos de puntuación.4. Se citan los anexos dentro del cuerpo del documento.
Actualización y adición de citas	Se incluyen citas faltantes en el marco teórico en cada una de las secciones sugeridas. Páginas: 1, 3, 4, 11, 16, 17, 20.
Estilo de citación	Se corrige el estilo de citación de acuerdo a las observaciones presentadas. Paginas: 45 y 59.
Correcciones generales	<ol style="list-style-type: none">1. Se corrige error de escritura, se aclara que el linaje 1 corresponde a Indo-oceánico y el linaje 2 a Este de Asia Pag 62 y tabla 3.1.2. Se realiza corrección en la página 69, el método de menor exactitud fue KNN.3. Se corrige la redacción en los resultados de las técnicas de ML, se depura información metodológica.
Ampliación de conceptos	<ol style="list-style-type: none">1. Se incluye la definición de infección por tuberculosis post-primaria.2. Se amplia información sobre la técnica de identificación de espigotipos haciendo énfasis en el uso de secuencias espaciadoras (IS).3. Se amplia información sobre los métodos empleados para la evaluación de los algoritmos de aprendizaje en la página 62.4. Se incluye como anexo una tabla en la cual se presentan la totalidad de los espigotipos encontrados.5. Se amplia información sobre la mutación L49P de significancia incierta y con posible fenotipo de resistencia en las páginas 66 y 74.6. Se incluyen gráficos de curvas ROC para todos los métodos de ML evaluados.

6.2. Evaluador 2.

Tabla 6.2: Modificaciones realizadas de acuerdo a la evaluación del evaluador Narmer Galeano

Evaluador 2: Narmer Galeano	
Evaluación	Corrección realizada
Modificaciones de forma	<p>Se realizaron las modificaciones de forma sugeridas por el evaluador tales como:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Uso correcto de las abreviaciones Tabla 2.4. 2. Adición de espacios dentro del texto 3. Uso de cursivas y signos de puntuación. 4. Unificación del idioma de las figuras. No se traducen las gráficas tomadas de otros autores para el marco teórico 5. Eliminación de frases de tipo metodológico dentro del planteamiento del problema. 6. Se reorganiza la justificación según la recomendación del evaluador.
Actualización y adición de citas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se incluyen citas faltantes en el marco teórico en cada una de las secciones sugeridas. Página: 11. 2. Se actualizan las citas asociadas a la taxonomía del MTBC. Páginas 12, 13 y 14
Correcciones generales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se adiciona una sección en el marco teórico ampliando información sobre la sensibilidad de las técnicas moleculares para diagnóstico de la tuberculosis. 2. Se corrige la orientación del diagrama de flujo según la recomendación del evaluador. 3. Se amplía información en los métodos sobre la estrategia empleada para validar los resultados. 4. Se reemplaza la frase "Secuenciación de próxima generación" por "Técnicas de secuenciación" para incluir las técnicas de tercera generación.