

Pontificia Universidad Católica del Ecuador Facultad de ingeniería Maestría en Biología  
Computacional

**Identificación de las mutaciones previamente secuenciadas en Ecuador de los genes rpoB,  
katG y embB, específicos de resistencia a antibióticos, a partir de *Mycobacterium  
tuberculosis*.**

**Autor: Nicole E. Oleas Arroba**

**Tutor: MSc. David Guevara**

**Ecuador, Quito 2024.**

# Índice

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. MARCO TEÓRICO.....	6
Antecedentes.....	6
Fundamentación teórica.....	14
<i>Mycobacterium</i> .....	14
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	14
Tuberculosis.....	15
Genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
Antibióticos utilizados en el tratamiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
Mutaciones que producen resistencia a antibióticos.....	17
Herramientas utilizadas para la recopilación y análisis los genomas.....	18
GenBank.....	18
MEGA 11.....	18
ClustalW:.....	18
ResFinder.....	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
5. DISEÑO Y ALCANCE.....	21
6. OBJETIVOS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
7. DATOS.....	22
8. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	24
Metodología.....	24
Resultados.....	25
9. DISCUSIÓN.....	33
10. CONCLUSIÓN.....	35
11. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	36
Anexo 1.....	36
Anexo 2.....	37
Anexo 3.....	38
Anexo 4.....	38
Anexo 5.....	39
Anexo 6.....	39



Anexo 7.....	40
Anexo 8.....	40
Anexo 9.....	41
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
Bibliografía.....	42

# 1. RESUMEN

**Autora:** Nicole Estefanía Oleas Arroba

**Tutor:** MSc. David Guevara

## RESUMEN

Este estudio investigó la resistencia a antibióticos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador, empleando 21 genomas secuenciados disponibles en el GenBank. Se observó que la rifampicina tenía la mayor proporción de resistencia con un 25,00%, lo que indica una alta tasa de resistencia a este fármaco clave. Además, la isoniacida mostró una preocupante tasa de resistencia del 23,86%. El etambutol presentó una tasa de resistencia del 14,77%, mientras que la pirazinamida y la estreptomina tuvieron resistencias del 11,36% cada una. Las capreomicina y la amikacina mostraron un 2,27% de resistencia, y las fluoroquinolonas tuvieron un 5,68% de resistencia. La etionamina, con un 3,40% de resistencia, también destacó como un fármaco con una proporción significativa de resistencia. Se identificaron mutaciones específicas, como "katG p.S315T", con un porcentaje de 76,19% para la isoniacida, y "rpoB p.S450L" para rifampicina con 54,55%, las cuales fueron las más prevalentes. Además, se encontró resistencia significativa al etambutol, con mutaciones como "embB p.M306I" (44,44%) y "embB p.M306V" (33,33%). El análisis filogenético resaltó la influencia de la ubicación geográfica en la diversidad genética. Estos resultados enfatizan la importancia del monitoreo continuo de la resistencia a antibióticos en Ecuador y la necesidad de estrategias terapéuticas personalizadas para mejorar el tratamiento de la tuberculosis en la región.

## 2. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema global que amenaza la efectividad de los tratamientos médicos. En el caso de la *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, cada día se reportan cerca de 800 nuevos casos con esta patología y fallecen más de 70 personas con esta patología (Organización Mundial de la Salud, 2023). En Ecuador, la tuberculosis sigue representando dificultades en salud pública a diario. La secuenciación de genomas completos de cepas de *M. tuberculosis* encontradas en este país es una fuente valiosa de información para estudiar la resistencia a los antibióticos en esta población. La identificación de los genes de resistencia de *M. tuberculosis* *rpoB*, *katG* y *embB* es de suma importancia, ya que se encuentran relacionados con la resistencia a la rifampicina, isoniazida y etambutol, respectivamente (Organización Mundial de la Salud, 2023).

A nivel meso, el Ministerio de Salud Pública (MSP) dispone de pruebas con métodos de biología molecular y otras pruebas con mayor sensibilidad. En el 2021 se realizaron 256.052 exámenes para la detección de *M. tuberculosis*. De ellos, 5.973 casos fueron de tuberculosis sensible y 357 de tuberculosis resistente a los fármacos (Ministerio de Salud Pública, 2023). La frecuencia de diagnósticos positivos en población ecuatoriana se observa más en pacientes de 25 a 34 años. En las ciudades de Guayaquil, Samborondón y Durán es donde se registran el 54% de incidencias. Es más persistente en hombres (79%) que en mujeres (21%) (Ministerio de Salud Pública, 2023).

A nivel micro, se puede llevar a cabo un análisis más detallado de los genes de resistencia. Se ha observado que la mutación del gen *rpoB*, específicamente, va a estar asociada a la resistencia a la rifampicina, mientras que la mutación del gen *katG* está relacionada con la resistencia a la isoniazida y la mutación del gen *embB* se encuentra ligada a la resistencia al etambutol (Morey, Fernandez, & Berná, 2022).

En este estudio se llevó a cabo una investigación centrada en abordar el creciente problema de resistencia a los antibióticos, particularmente en el contexto de la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador. La elevada incidencia diaria de nuevos casos y las tasas de mortalidad asociadas subrayan la urgencia de comprender y combatir la resistencia a los fármacos en esta población. Se optó por utilizar la secuenciación de genomas completos de cepas de *M. tuberculosis* encontradas en el país, lo cual proporciona una valiosa fuente de información genética para investigar la resistencia a los antibióticos de manera más precisa. En específico, se dio énfasis a la identificación de genes clave de resistencia, como *rpoB*, *katG* y *embB*, vinculados a la resistencia a la rifampicina, isoniazida y etambutol, respectivamente.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes

Se estima que cerca de un 25% de la población ha sido afectada por la bacteria de la tuberculosis. Sin embargo, solo entre el 5% y el 10% de las personas infectadas desarrollarán síntomas y se enfermarán de tuberculosis. Es importante destacar que las personas infectadas que aún no han desarrollado la enfermedad no pueden transmitirla.

En 2021 se registró un total de 1,6 millones de muertes por tuberculosis, incluyendo 187.000 personas con VIH. A nivel mundial, la tuberculosis ocupa el puesto 13 en causas de muerte y es la patología infecciosa más letal después de la COVID-19, superando al VIH y al sida. Durante el mismo año, como se observa en la Figura 1, se estima que 10,6 millones de personas contrajeron la tuberculosis en todo el mundo, de las cuales 6 millones fueron hombres, 3,4 millones mujeres y 1,2 millones niños. Aunque la tuberculosis afecta todas las naciones y edades, es una patología con tratamiento y prevención (Organización Mundial de la Salud, 2023).

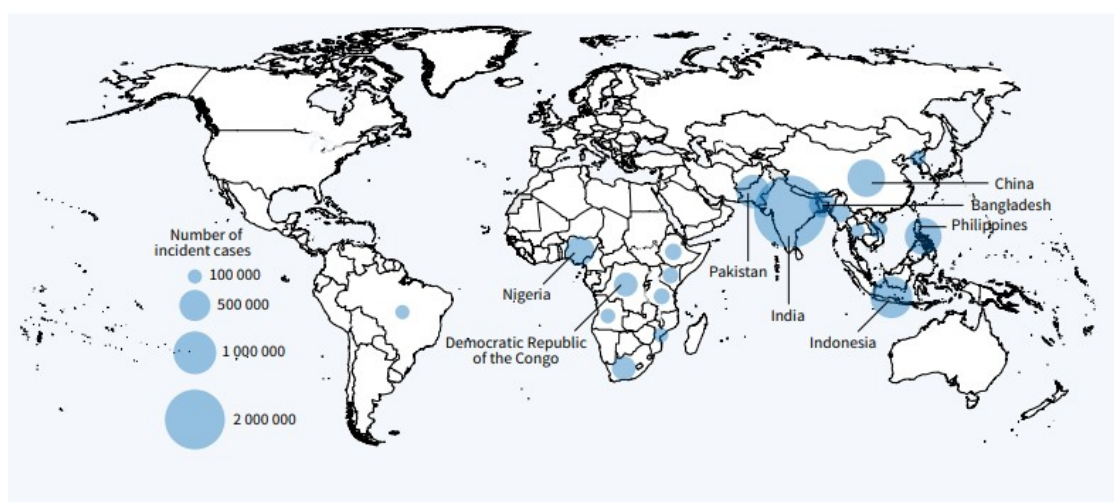


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en 2021, para países con al menos 100.000 casos nuevos (Organización Mundial de la Salud, 2022).

En relación a la tuberculosis multirresistente, se ha observado que sigue representando gran problema de salud pública. Solo una de cada tres personas con tuberculosis farmacorresistente tiene acceso al tratamiento en 2021. La tuberculosis multirresistente se debe a bacterias que toleran los medicamentos antituberculosos de

primera línea más eficaces como la isoniacida y la rifampicina. Esta forma de tuberculosis puede tratarse y curarse utilizando medicamentos de segunda línea. Sin embargo, el tratamiento de segunda línea implica un régimen prolongado con medicamentos costosos y tóxicos.

En algunos casos, puede desarrollarse una resistencia aún mayor, lo que limita aún más las opciones de tratamiento (Fig. 2), y su tendencia mundial de casos de tuberculosis multidrogorresistentes, además de un considerable crecimiento de la incidencia de la tuberculosis multirresistente (Fig. 3). La tuberculosis debida a bacterias que toleran los medicamentos antituberculosos de segunda línea más eficaces deja a los afectados con opciones de tratamiento muy limitadas (Organización Mundial de la Salud, 2023).

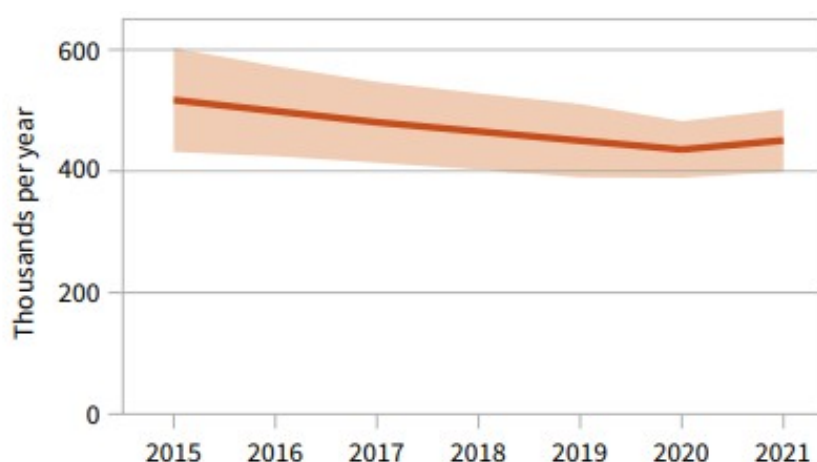


Figura 2. Tendencia mundial en el número estimado de casos incidentes de tuberculosis multidrogorresistente/resistente a medicamentos de segunda línea (MDR/RR-TB) en el período 2015-2021 (Organización Mundial de la Salud, 2022).

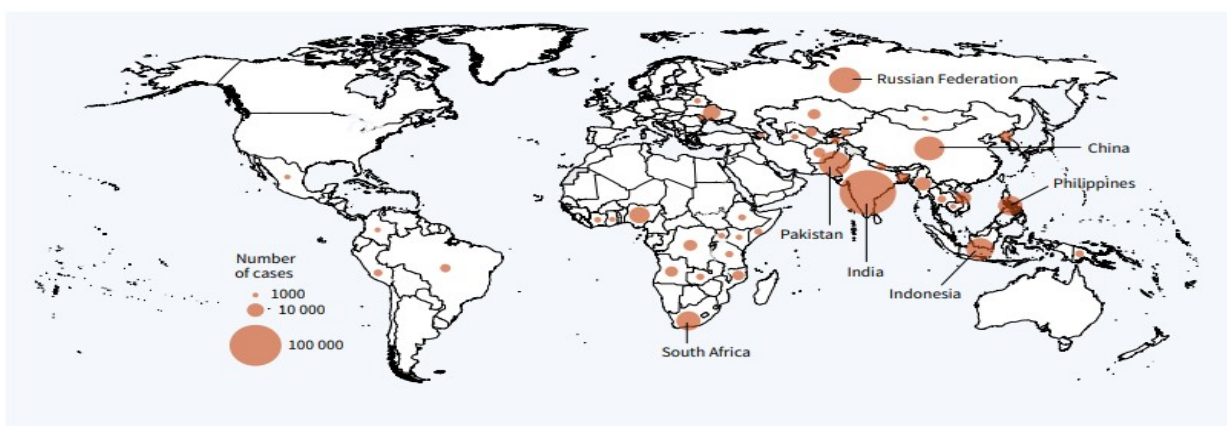


Figura 3. Incidencia estimada de tuberculosis multidrogorresistente/resistente a medicamentos de segunda línea (MDR/RR-TB) en 2021, para países con al menos 1000 casos incidentes (Organización Mundial de la Salud, 2022).

En el año 2022 se introdujeron nuevas directrices por parte de la OMS que priorizan un régimen de tratamiento de 6 meses con BPaLM/BPaL (bedaquilina, pretomanid, linezolid y moxifloxacino) para aquellos pacientes que cumplen con los criterios necesarios, tales como la confirmación de tuberculosis resistente a múltiples medicamentos, la adherencia al tratamiento, el perfil de resistencia a los medicamentos, la evaluación clínica y radiológica del paciente, la evaluación de la tolerancia a los medicamentos y la evaluación de interacciones medicamentosas. Este nuevo régimen presenta una duración más corta con menos comprimidos y una alta eficacia que tiene como objetivo aliviar la carga sobre los sistemas de salud y ahorrar recursos valiosos para expandir la cobertura de diagnóstico y tratamiento a todas las personas que lo necesitan. En el pasado, el tratamiento de la tuberculosis multirresistente solía durar al menos 9 meses e incluso podía extenderse hasta los 20 meses (Organización Mundial de la Salud, Informe Global de Tuberculosis, 2022).

El gen *rpoB* va a codificar la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa y mutaciones de una región que posee 81 pares de bases de este gen, el cual es conocido como la región más importante en cuanto a la resistencia a la rifampicina, siendo responsables de la resistencia más del 95% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la rifampicina. (Peñata, Perez, Bustamante, Ospina, & Castaño, 2022).

La enzima catalasa-peroxidasa es codificada por el gen *katG* y la presencia de mutaciones o deleciones en este gen está asociada con aproximadamente el 60% de las cepas de *M. tuberculosis* que muestran resistencia a la isoniacida. El 30% de las mutaciones se localizan en el codón 315 Ser, el cual cambia a arginina, treonina o asparagina. Además, aunque menos frecuente, se ha identificado que hay mutaciones en los codones 700, 587, 525, 501, 463, 418, 321 y 300. (Cuevas & Zenteno, 2009).

La enzima arabinosiltransferasa es codificada por el gen *embB*, el cual es uno de los genes que se encuentra asociado a la resistencia a etambutol, y se encuentra localizado en el locus 10.000 pb. Esta enzima está vinculada con la síntesis de polímeros de galactosa y arabinosa de la pared celular. Alrededor del 70% de las cepas resistentes a etambutol están puntualmente mutadas en el codon 306 Met del gen *embB*, el cual cambia por valina, leucina o isoleucina. Otras mutaciones que se encuentran con menos frecuencia son en los codones 297, 306, 328, 330, 334, 406, 497, 745, 959, 1000 y 1024 (Cuevas & Zenteno, 2009).

En América Latina existe una abundante información disponible sobre *M. tuberculosis* con énfasis en su diversidad genética analizada a través de métodos moleculares. Sin embargo, en el caso específico de Ecuador, se han llevado a cabo escasos estudios (Woodman, Haeusler, & Grandjean, 2019). A nivel mundial se han realizado diferentes estudios relacionados con la tuberculosis y los mecanismos de resistencia que ha presentado el *M. tuberculosis*, los cuales han sido de gran ayuda para poder realizar nuevos estudios. En el estudio realizado por Suthum y otros. 2020, 100 muestras de *M. tuberculosis* fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad a los medicamentos. El 42% mostró resistencia a la isoniacida (INH) y a la rifampicina (RIF), mientras que otro 25% mostró monorresistencia a la INH (25%). Las mutaciones genéticas más comunes encontradas mediante secuenciación de ADN fueron *katG* \_Ser315Thr (70%), *rpoB* \_Ser531leu (81%) y *pncA* \_Ile31Thr (84%) (Suthum, Samosornsuk, & Samosornsuk, 2020).

En cambio, en otro estudio se observaron diecisiete tipos diferentes de mutaciones en 74 aislados de *M. Tuberculosis* resistente a RIF, incluidas 57 cepas multidrogorresistente (MDR). Las sustituciones de un solo nucleótido causaron siete cambios de aminoácidos en la mayoría de las mutaciones. Las mutaciones comunes se observaron en tres codones: 531, 526 y 516, concordantes con algunos estudios sobre marcadores resistentes a la RIF. La ocurrencia de 4 sustituciones en el codón 531 se encontró en el estudio con Ser/Leu, Ser/Trp, Ser/Phe, Ser/Gln (Minh, y otros, 2012).

Los resultados del estudio “Caracterización de mutaciones *rpoB* en aislados clínicos resistentes a rifampicina de *M. Tuberculosis* de Turquía mediante secuenciación de ADN y ensayo de sonda de línea” menciona que LiPA no detectó el tipo correcto de mutación en 17 (41,5%) aislados. Sin embargo, indicó la presencia de una alteración genética. Además, LiPA identificó un aislado que tenía una mutación fuera de la región de 81 pb del gen *rpoB* como sensible a RIF. Además, reconocieron tres mutaciones nuevas. No se ha informado de una mutación de ATG (Met) a ATC (Ile) en el codón 515 y una mutación de CTG (Leu) a CCG (Pro) en el codón 533 en un aislado ni de la inserción de CGG entre los codones 514 y 515 en un aislado. También se observó en un aislado una nueva mutación (CAG a CAT en el codón 490) fuera de la región del punto caliente de 81 pb. Investigaciones anteriores informaron mutaciones fuera de la región del punto caliente: GGG a GAG en el codón 534, CCC a CAC en el codón 535, GAG a GAT en el codón 504, GAG a GAT en el codón 541, TCG a GCG en el codón 553 y ATC a TTC en el codón 572 (Cavusoglu, Hilmioglu, Guneri, & Bilgic, 2002).

En el estudio “Determinación de la mutación S315T del gen *katG* en aislados resistentes a isoniacida de *M. tuberculosis* mediante PCR-RFLP” se realizó un análisis que, con una sensibilidad de 85,4% y una especificidad de 95,2%, halló que entre las muestras de *M. tuberculosis* fenotípicamente resistentes, el 74,46% presentó la mutación del gen *katG* S315T, así como un 4.76% entre las muestras fenotípicamente sensibles (Sanchez, Nicola, & Morey, 2022).

En el estudio “Mutaciones *embB306* como indicadores moleculares para predecir la susceptibilidad al etambutol en *M. tuberculosis*”, las mutaciones M306I (n = 56), M306V (n = 18) y M306L (n = 3) en *M. Tuberculosis* mostraron una menor susceptibilidad al etambutol. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) en el 73% (56/77) de los mutantes *embB306* estaban en o justo por encima de la concentración crítica (CIM, 5,0 a  $\leq 12,5$   $\mu\text{g/ml}$ ) de etambutol que refleja resistencia limítrofe (o intermedia). Ocho aislados resistentes al etambutol carecían de mutaciones *embB*, probablemente debido a alteraciones mutacionales en otras partes del genoma (Sirgel, y otros, 2019).

En la región de las Américas, la resistencia a los medicamentos es un problema grave. En Perú, alrededor del 9% de los casos de tuberculosis presentan resistencia a los medicamentos, mientras que en Brasil y México esta cifra es del 3% (Organización Mundial de la Salud, 2023).

Según el estudio “Epidemiología genética de la tuberculosis: una perspectiva latinoamericana”, se observan en la Figura 4 y en la Tabla 1 las diferencias en la distribución de genotipos tanto entre como dentro de los países de América Latina, lo cual probablemente refleje nuevos patrones de migración humana (Woodman, Haeusler, & Grandjean, 2019).

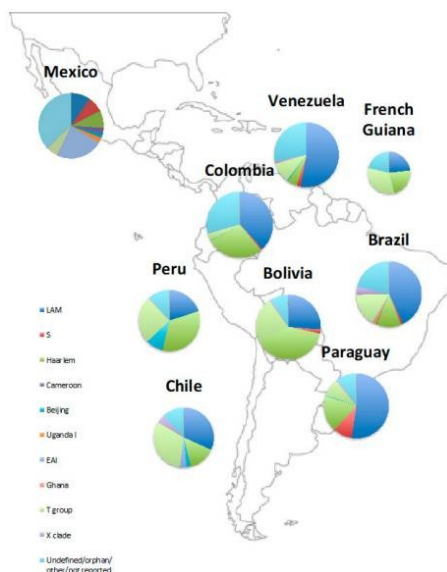


Figura 4. Distribución de grupos filogenéticos en América Latina (Woodman, Haeusler, & Grandjean, 2019)

Tabla 1. La densidad poblacional de los isologotipos MTB sudamericanos por país (Woodman, Haeusler, & Grandjean, 2019).

PAÍS	LAM(%)	S(%)	HAAR-LEM(%)	CAME-RÚN(%)	BEIGING (%)	UGAN-DA(%)	EAI(%)	GHANA (%)	GRUPO T(%)
México	9.65	7.75	8.65	2.85	2.15	2.5	23.35	0.35	5.6
Brasil(34,35,37,51,52,53,54,55)	42.99	1.09	12.12	0.27	0.12	1.33	0.66	-	16.15
Perú	20	-	33.73	-	9.22	-	-	-	24.88
Chile	31.7	-	14.55	-	2.32	-	3.55	-	31.2
Colombia	38.01	0.82	28.18	0.16	-	-	-	-	3.46
Guayana Francesa	23.3	-	22.6	-	-	-	-	-	32.6
Bolivia	26.3	2	39.4	-	-	-	-	-	22.2
Paraguay	52.3	9.5	18.2	-	0.5	-	-	-	8.6
Venezuela	53	1.9	5	-	0.4	-	0.2	-	10

0

A nivel regional, en el estudio “Estructura poblacional de aislados clínicos multirresistentes de M. Tuberculosis en Colombia” se recopiló un total de 203 aislamientos de tuberculosis MDR durante los años 2012-2013, los cuales fueron caracterizados mediante espigotipado y posteriormente por MIRU-VNTR de 24 loci (datos disponibles para 190 aislamientos). Los genotipos más frecuentes correspondieron a SIT42/LAM9 (12,81%), SIT62/H1 (10,34%) y SIT190/Beijing (10,34%). Tanto las cepas del linaje LAM como las del linaje Beijing se asociaron significativamente con MDR-TB (valor de  $p < 0.0001$ ): el linaje LAM se asoció con dos patrones de MDR, específicamente resistencia combinada a INH + rifampicina (HR) y a SHRE (estreptomicina + INH + rifampicina + etambutol), mientras que las cepas del linaje Beijing se asociaron principalmente con MDR (SHRE) (Rodríguez, y otros, 2020).

Ecuador se clasifica como un país de carga media en relación con la tuberculosis. En el año 2017 se notificaron alrededor de 5.800 casos de tuberculosis en el país, lo que representa una incidencia de 43 casos por cada 100.000 habitantes. Además, se registraron 480 muertes relacionadas con la tuberculosis y 249 casos de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) (Woodman, Haeusler, & Grandjean, 2019). Sin embargo, según el informe de la OMS de 2018, señala que existe un significativo subdiagnóstico en Ecuador. Según las estimaciones de la OMS, se estima que el país tiene alrededor de 7.200 casos de tuberculosis, con aproximadamente 650 casos de tuberculosis farmacorresistente o MDR por año, lo que equivale al 9% del total de casos de tuberculosis en el país (Garzón-Chávez, y otros., 2019). Las figuras 5 y 6 retratan el diagnóstico en Ecuador de *M. tuberculosis*.

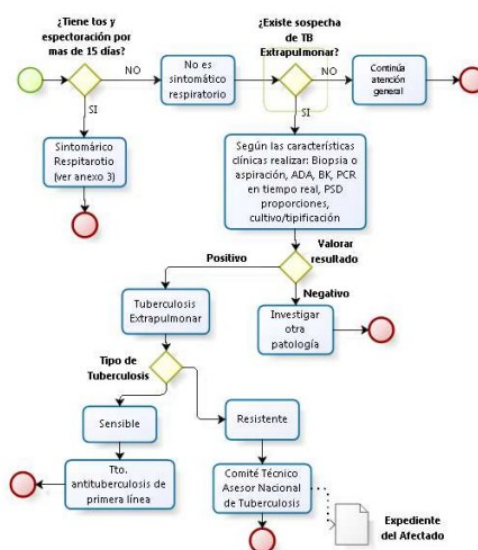


Figura 5. Identificación de persona con sospecha de TB pulmonar y extrapulmonar (Ministerio de Salud Pública, 2018).

Según el estudio “Estructura poblacional y diversidad genética de *M. tuberculosis* en Ecuador”, se ha encontrado que el linaje 4 es predominante en Ecuador (98,3% de las cepas). Solo 4 cepas pertenecen a los linajes 2-sublinaje Beijing y dos cepas al linaje 3-sublinaje Delhi. Las cepas del linaje 4 incluyeron los sublinajes LAM (45,7%), Haarlem (31,8%), S (13,1%), X (4,6%), Ghana (0,6%) y NEW (0,3%). El sublinaje LAM mostró la asociación más fuerte con la resistencia a los antibióticos. Los sublinajes X y S se encontraron predominantemente en las regiones costera y andina, respectivamente, y la razón de la alta prevalencia de estas cepas en Ecuador debe abordarse en nuevos estudios (Tabla 2) (Fig. 7) (Garzón, y otros, 2019).

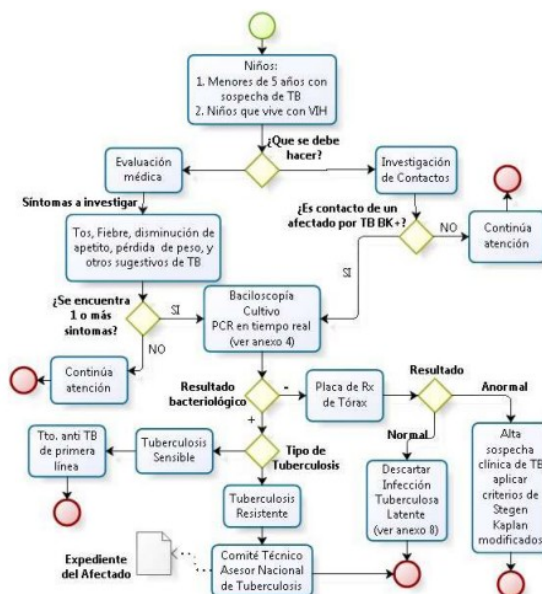


Figura 6. Diagnóstico de tuberculosis en menores de 5 años (Ministerio de Salud Pública, 2018).

Tabla 2. Números y porcentajes de los sublinajes encontrados en Ecuador para regiones geográficas específicas (Garzón, y otros, 2020).

MTBC SUB LINAGES	REGIÓN COSTA	REGIÓN ANDES	REGIÓN AMAZÓ-NICA	TOTAL
LAM	133(49.8%)	29(36.3%)	8(50%)	170(45.6%)
HAARLEM	88(32.3%)	28(35%)	4(25%)	120(32.2%)
S	29(10.8%)	17(21.3%)	3(18.8%)	49(13.2%)
X	13(5.2%)	2(2.5%)	1(6.3%)	16(4.3%)
BEIJING	1(0.4%)	3(3.8%)	---	4(1.1%)
GHANA	2(0.7%)	---	---	2(0.6%)
DELHI	2(0.7%)	---	---	2(0.6%)
NEW	---	1(1.3%)	---	1(0.3%)
LINAJE 4 SIN ASIGNACIÓN	8(2.2%)	---	1(0.3%)	9(2.4%)
<b>TOTAL</b>	<b>268(73.4%)</b>	<b>80(21.9%)</b>	<b>16(4.4%)</b>	<b>373(100%)</b>

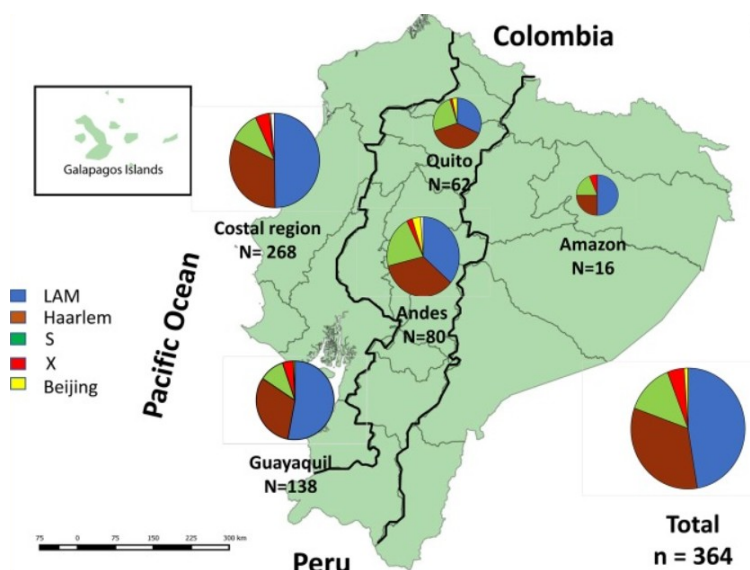


Figura 7. El mapa de Ecuador, exhibe representaciones gráficas circulares que muestran cómo se distribuyen las sublíneas principales en las tres regiones geográficas primarias: la zona costera con Guayaquil, la región de los Andes con Quito y la región amazónica. Asimismo, en gráficos circulares individuales se detalla la distribución de sublíneas para el conjunto del país y las dos ciudades más pobladas de Ecuador: Quito y Guayaquil. (Garzón-Chávez, y otros., 2019).

En el estudio “Genómica comparativa de cepas resistentes a medicamentos de *M. tuberculosis* en Ecuador” se confirma que las cepas ecuatorianas que fueron estudiadas pertenecían principalmente al linaje 4, que es dominante en todos los países de América del Sur y se ha asociado con la colonización europea de América. Se encontró una baja prevalencia de otros dos linajes, a saber, 2 y 3. Los sublinajes LAM y Haarlem (linaje 4) son predominantes en Ecuador, que es similar al resto de América del Sur. La distribución del MELA fue homogénea en Ecuador, excepto en la región andina, donde ha sido reemplazado por el sublinaje S: en Quito con una prevalencia del 24,6% y el resto de la región andina ecuatoriana con un 13%. El sublinaje X del linaje 4 (L4.1.1) tiene una prevalencia del 4% en Ecuador, que es más alta que la de otros países sudamericanos, excepto Río Grande en Brasil y Chile (Garzón, y otros, 2020).

El estudio “Detección rápida en todo el país para el linaje *M. tuberculosis* Beijing en Ecuador utilizando un método SNPPCR”, realizado por Garzón y otros, indica una baja prevalencia de la familia Beijing en Ecuador, y el estudio “Diversidad genética y farmacorresistencia de *M. tuberculosis* en Ecuador”, de Zurita y otros, el cual fue enfocado en cepas de la capital, Quito, reveló una alta prevalencia del linaje 49. Aunque este último estudio fue pionero en analizar la estructura poblacional de MTBC en Ecuador, tiene limitaciones debido al tamaño reducido de la muestra (104 aislamientos), el perfil de resistencia a los medicamentos (todos los aislamientos eran resistentes a isoniacida, rifampicina o ambos) y la ubicación (todas las cepas provenían de un solo hospital en Quito) (Garzón, y otros, 2020) (Zurita, y otros, 2019).

Los resultados del estudio “Detección de genes asociados a resistencia para isoniacida y rifampicina en cepas de *M. tuberculosis* en Ecuador” evidenciaron una correlación entre la

resistencia fenotípica a rifampicina e isoniacida y las mutaciones identificadas en los genes *rpoB* (91,6 %) y *katG* (90,3 %) en cepas ecuatorianas de *M. tuberculosis* (Franco & León, 2017).

En el estudio “Genómica comparativa de cepas resistentes a medicamentos de *M. tuberculosis* en Ecuador”, dentro de los genomas estudiados, los genotipos identificados con mayor frecuencia fueron Ser315Thr (76,2%, 16/21), Ser450Leu (57,1%, 12/21) y Met306Ile (33,3%, 7/21), codificando una sustitución en los genes *katG*, *rpoB* y *embB* que confiere resistencia a rifampicina, isoniacida y etambutol, respectivamente, mientras que para los fármacos de segunda línea fueron Thr202Ala en *thyA* que se asocia con resistencia al ácido paraaminosalicílico en 61,9% (13/21) y Lys43Arg en *rpsL* relacionado con resistencia a la estreptomicina (28,5%, 6/21) (Sanchez, Nicola, & Morey, 2022).

## Fundamentación teórica

### *Mycobacterium*

#### *Generalidades de Mycobacterium*

*Mycobacterium* es el único género de bacterias actinomicetales que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*. Estas bacterias tienen forma de bacilos delgados, son grampositivas y se caracterizan por ser acidorresistentes, no ramificadas, inmóviles, no esporuladas y carecen de hifas aéreas. Pueden ser aerobias o microaerófilas y utilizan azúcares por vía oxidativa. Dentro de las numerosas especies de *Mycobacterium*, algunas son patógenas y causan enfermedades tanto en humanos como en animales. Entre las especies más destacadas se encuentran: Complejo tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch), *M. bovis* y *M. africanum*, causantes de la tuberculosis en humanos y algunas especies animales; no cromógenas: Incluye *M. complejo avium-intracellulare* (MAC), *M. xenopi*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. shimodei*, *M. genavense*, *M. celatum*, *M. ulcerans*, *M. complejo terrae*, *M. triviale*, *M. gastri* y *M. nonchromogenicum*; fotocromógenas: Comprende *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae* y *M. asiaticum*; Escotocromógenas: *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* y *M. flavescens*. De crecimiento rápido: *Involucra M. grupo fortuitum*, *M. grupo chelonae*, *M. smegmatis*, *M. phlei* y *M. vaccae*. No clasificada: *M. leprae* (bacilo de Hansen), agente etiológico de la lepra (Navarra, 2023).

### *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria grampositiva y ácido-alcohol resistente que tiene una forma de bacilo (bastoncillo). *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria causante de la tuberculosis, se caracteriza por una estructura celular única. Su pared celular está compuesta principalmente por lípidos, incluidos los ácidos micólicos, que confieren resistencia a factores externos y contribuyen a su acidorresistencia. Además, presenta proteínas de superficie que facilitan la interacción con las células del huésped y el sistema inmunitario. Aunque la cantidad de peptidoglicano es menor que en otras bacterias grampositivas, aún está presente en la pared. La presencia de fimbrias y pili podría tener un papel en la adhesión a las

células del huésped. Estas características estructurales (Fig. 8) son fundamentales para la capacidad de *M. tuberculosis* de infectar y persistir en el cuerpo humano, lo que complica su tratamiento y control (Murray, 2013).

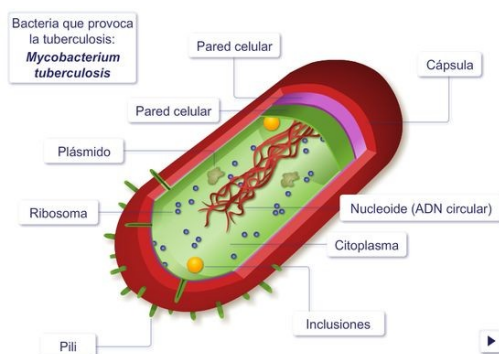


Figura 8. Estructura de *M. tuberculosis* (Murray, 2013).

## Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una infección provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque su principal objetivo son los pulmones, puede involucrar otros órganos y sistemas del cuerpo. La transmisión de la TB ocurre a través del aire cuando una persona exhala aire como causa de los estornudos, la tos y al hablar, liberando pequeñas gotas de saliva y bacterias al ambiente. Cuando una persona inhala estas gotas, puede quedar infectada (OMS, Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis, 2012).

La enfermedad se presenta en dos formas principales: TB latente y TB activa. En la TB latente, la bacteria está presente en el cuerpo, pero no está causando síntomas y no es contagiosa. En la TB activa, la bacteria se multiplica y causa síntomas como tos persistente, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso y fatiga. Si no se trata adecuadamente, la TB activa puede ser grave y potencialmente mortal (OMS, Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis, 2012).

El diagnóstico de la TB generalmente implica pruebas de laboratorio, como análisis de esputo y radiografías de tórax, para detectar la presencia de la bacteria y evaluar el alcance de la infección. El tratamiento de la TB implica una combinación de antibióticos específicos durante un período prolongado para eliminar la bacteria y prevenir la resistencia a los medicamentos (OMS, Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis, 2012).

A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, la tuberculosis aún es un gran problema de salud a nivel mundial, especialmente en lugares con sistemas de atención médica limitados. Las medidas preventivas incluyen la vacunación con la vacuna BCG y el control de la infección en entornos de atención médica y comunitarios (OMS, Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis, 2012).

## Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

El genoma de *M. tuberculosis* consta de 4.411.529 pares de bases, alberga alrededor de 4.000 genes y exhibe un alto contenido de guanina + citosina, lo que se refleja en la inclinación de los aminoácidos en las proteínas (Fig. 9). Lo que distingue a *M. tuberculosis* de otras bacterias es su notoria asignación de capacidad codificante a la síntesis y descomposición lipídica, además de su dedicación a dos novedosas familias de proteínas ricas en glicina que presentan una estructura repetitiva que podría ser una fuente de variabilidad antigénica (Cole y otros, 1998)

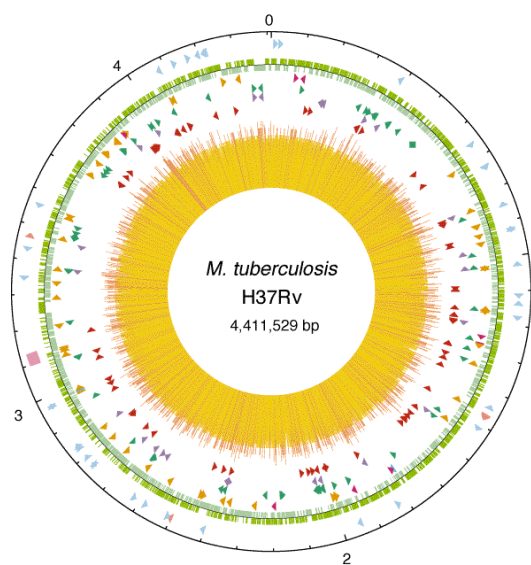


Figura 9. Mapa circular del cromosoma del *M. tuberculosis* H37Rv. La representación visual muestra la estructura del cromosoma, indicando la escala en megabases y destacando diferentes elementos, como genes de ARN, regiones repetitivas, secuencia de ADN codificante, ADN repetitivo, familias de PPE y PE, así como el contenido de G/C. El primer anillo desde el exterior muestra las ubicaciones de los genes de ARN estables (tARN en azul y otros en rosa) y la región de repeticiones directas (cubo rosa); el segundo anillo presenta la secuencia codificante por hebra (en sentido de las agujas del reloj, verde oscuro; en sentido contrario, verde claro); el tercer anillo ilustra el ADN repetitivo (secuencias de inserción en naranja; familia REP 13E12 en rosa oscuro; profagos en azul); el cuarto anillo muestra las posiciones de los miembros de la familia PPE (verde); el quinto anillo refleja las posiciones de los miembros de la familia PE (morado, excluyendo PGRS); y el sexto anillo indica las posiciones de las secuencias PGRS (rojo oscuro). En el centro, un histograma representa el contenido de G + C, mostrando en amarillo menos del 65% de G + C y en rojo más del 65% de G + C. La figura fue generada mediante el uso de software de DNASTAR. Se reimprime con permiso del autor principal y el editor, según se indica en la referencia (Cole, y otros, 1998).

## Antibióticos utilizados en el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los medicamentos clave utilizados en el tratamiento de la tuberculosis incluyen la isoniazida, que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana, y la rifampicina, que interfiere con la síntesis de ARN. La pirazinamida se dirige a las bacterias en fase de crecimiento lento, mientras que el etambutol afecta la síntesis de la pared celular. Las fluoroquinolonas como el moxifloxacino y levofloxacino interfieren con la replicación del ADN, y la estreptomycinina, un aminoglucósido, afecta la síntesis proteica. Además, medicamentos de segunda línea como la cicloserina y terizidona influyen en la pared celular bacteriana, mientras que en casos de

resistencia múltiple se pueden usar la amikacina, kanamicina y linezolid (Organización Mundial de la Salud, Informe Global de Tuberculosis, 2022).

## Mutaciones que producen resistencia a antibióticos

*Mycobacterium tuberculosis* puede adquirir resistencia a varios antibióticos esenciales utilizados en el tratamiento de la tuberculosis debido a mutaciones en genes específicos. Las mutaciones en genes como rpoA, rpoB, rpoC y rpoD están relacionadas con la resistencia a rifampicina, mientras que las mutaciones en katG e inhA pueden llevar a la resistencia a isoniazida. Genes como embB pueden sufrir mutaciones que resulten en resistencia al etambutol, y el gen pncA está asociado con la resistencia a la pirazinamida. Además, mutaciones en gyrA y gyrB pueden causar resistencia a las fluoroquinolonas, mientras que las mutaciones en los genes rrs, rrl y rrf pueden contribuir a la resistencia a los aminoglucósidos (Fontalvo & Gomez, 2015).

Las mutaciones, que pueden diferir entre cepas y regiones, plantean importantes desafíos para el tratamiento efectivo de la tuberculosis. Estas variaciones conducen a la formación de cepas resistentes a múltiples fármacos, complicando su control. La Tabla 3 destaca este fenómeno al mostrar la presencia de genes que se vuelven más frecuentes y que están directamente relacionados con la resistencia a fármacos (Navas Elorza, E., & Moreno Guillén, S.,2010).

Tabla 3. Fármacos antituberculosis y genes más frecuentemente implicados en la resistencia (Navas Elorza, E., & Moreno Guillén, S.,2010).

FÁRMACO	GEN IMPLICADO	FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN
<b>rifampicina</b>	Subunidad B RNA (rpo)	96%
<b>Isoniacida</b>	Enoil-acp-reductasa(inhA) Catalasa-peroxidasa (katG)	10-20
	Alquil- hidroxiperoxidreductasa(ahpC )	30-60%
<b>etambutol</b>	Arabinosa- transferasa(embC,A,B)	2-8%
<b>pirazinamida</b>	Pirazinamidas- nicotinamidas(pncA)	80%
<b>estreptomina</b>	Proteína ribosomal subunidad 12(rpsL)	72-97%
	RNA ribosomal 16 S(rrs)	52-59%
<b>quinolonas</b>	Subunidad A de la DNA girasa (gyrA)	8-21%
		75-94%

## Herramientas utilizadas para la recopilación y análisis los genomas

### GenBank

Es una base de datos fundamental en el campo de la investigación genética y biológica. Desarrollado y mantenido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI),

proporciona acceso a una vasta colección de secuencias de ADN y ARN de diversos organismos. Estas secuencias incluyen información sobre genes, genomas completos, proteínas y más, obtenida de investigaciones científicas y proyectos de secuenciación. El GenBank es una herramienta esencial para el análisis de la estructura, función y evolución de los genes, así como para investigaciones en biología molecular y bioinformática, desempeñando un papel imprescindible en el avance del conocimiento científico y en la comprensión de la diversidad genética entre diferentes especies (NCBI, 2013)

## MEGA 11

MEGA 11 representa una herramienta importante en el ámbito de la investigación molecular y genética evolutiva. Esta herramienta integral combina características de alineación de secuencias, permitiendo tanto un enfoque automático como manual, facilitando así la comparación de secuencias biológicas. Además, MEGA 11 es capaz de inferir la estructura de árboles filogenéticos, brindando una visión visual de las relaciones evolutivas entre diferentes especies. Dentro de su funcionalidad, MEGA 11 proporciona acceso a bases de datos en línea, lo que enriquece la investigación al permitir la exploración y el análisis de datos genéticos relevantes. También, esta herramienta es capaz de estimar tasas de evolución molecular, lo que resulta crucial para comprender cómo las secuencias genéticas han evolucionado con el tiempo (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021).

## ClustalW

ClustalW es un software ampliamente empleado en la investigación genética y bioinformática para realizar alineamientos múltiples de secuencias biológicas, ya sean de ADN, ARN o proteínas. Su función principal es comparar y alinear diversas secuencias, permitiendo identificar tanto similitudes como variaciones, vital para el análisis de relaciones evolutivas y la comprensión de la estructura y función de genes y proteínas. Mediante un enfoque de alineación gradual, ClustalW crea alineamientos progresivos de pares cercanos y, a medida que se incorporan más secuencias, logra generar alineamientos múltiples precisos y cohesivos. De esta manera, esta herramienta se convierte en un recurso esencial que facilita el estudio exhaustivo de secuencias biológicas y sus implicaciones (Fernandez, 2007).

El programa detecta automáticamente y lee seis formatos de entrada de secuencias diferentes: EMBL/SwissProt, NBRF/PIR, Pearson/FASTA, GCG/MSF, GDE y alineaciones en formato CLUSTAL. Los tres últimos formatos permiten utilizar alineaciones más completas para calcular árboles filogenéticos o añadir nuevas secuencias a una alineación existente (Thompson y otros., 1994).

La alineación de perfiles se utiliza para alinear dos alineaciones existentes para añadir secuencias nuevas a una alineación existente. A menudo, sólo unas pocas secuencias provocan alineaciones en el algoritmo progresivo y las segundas pueden eliminarse del proceso y

añadirse al final de la alineación del perfil. Un segundo uso es cuando se tiene una alineación de referencia de alta calidad y el objetivo es mantenerla fija mientras se añaden nuevas secuencias automáticamente. El código fuente completo del paquete se proporciona gratuitamente a los usuarios académicos (Thompson y otros, 1994).

El algoritmo básico de alineación múltiple (Fig. 10) consta de tres etapas principales:

Etapla 1: todos los pares de secuencias se alinean por separado para calcular una matriz de distancia que dé la divergencia de cada par de secuencia.

Etapla 2: se calcula un árbol de guía a partir de la matriz de distancia.

Etapla 3: estas secuencias se alinean progresivamente según el orden de ramificación en el árbol de guía.

## ResFinder

ResFinder es una herramienta de bioinformática crucial que se emplea para detectar genes de resistencia a antibióticos en secuencias genómicas bacterianas. Este recurso desempeña un papel fundamental en la lucha contra la resistencia antimicrobiana al permitir el análisis exhaustivo de secuencias bacterianas y la identificación de genes que confieren resistencia a diversos antibióticos. Su funcionamiento implica comparar las secuencias genómicas desconocidas con una base de datos de genes de resistencia previamente identificados. A través de algoritmos de alineamiento y análisis, se pueden encontrar similitudes entre las secuencias, lo que brinda la capacidad de determinar la posible resistencia de una bacteria a ciertos antibióticos y, por ende, tomar decisiones más informadas en el ámbito clínico y de investigación (Florensa, Sommer Kaas, Lanke Conradsen Clausen, Aytan-Aktug, & Aarestrup, 2022).



El Ecuador ha promovido que se realice el diagnóstico a nivel molecular como prueba diagnóstica en casos sospechosos de pacientes que presenten factores de riesgo, como el VIH, que hayan tenido contacto con otros pacientes que presenten tuberculosis, en niños menores a 5 años, entre otras comorbilidades, donde la identificación resistencia a la rifampicina es parte de su tamizaje, ya que se considera como la piedra angular en el tratamiento de los pacientes. Es necesario tomar en cuenta también la identificación de mutaciones los genes que se encuentren ligadas a la resistencia a otros antibióticos como son la isoniacida y etambutol, ya que pueden ser una opción de tratamiento válida en el caso de resistencia al antibiótico de primera elección (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2018).

Este tipo de información en el país es de gran relevancia y, con el aporte de la identificación con herramientas informáticas diferentes a las que se han utilizado previamente en otros estudios, va a permitir obtener una base de datos sólida para futuras investigaciones con relación a este tipo de genes.

## 5. DISEÑO Y ALCANCE

El diseño de esta investigación es de tipo no experimental y es de tipo transversal. El objetivo de este diseño es obtener información específica en un momento particular, sin intervenir ni modificar las variables o situaciones que se están estudiando.

No experimental: en este caso, no se realizaron intervenciones o tratamientos experimentales en sujetos de estudio, sino que se recopilaron datos a partir de muestras ya existentes, como secuencias genéticas previamente obtenidas de pacientes con tuberculosis.

Tipo transversal: la investigación se llevó a cabo en un solo momento del tiempo, recolectando datos de múltiples cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de Ecuador. Se obtuvo una instantánea de la situación de las mutaciones de interés en un momento específico.

Tomando en cuenta que la investigación tiene un diseño no experimental y es de tipo transversal, el propósito es describir y analizar las mutaciones en genes específicos de resistencia a los antibióticos en cepas de *M. tuberculosis*. Para lograr esto, se utilizaron datos disponibles en el GenBank que contienen secuencias genéticas previamente secuenciadas de cepas de *M. tuberculosis* de pacientes en Ecuador.

Se propone un alcance de tipo descriptivo, el cual se busca obtener una visión instantánea de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* presentes en Ecuador en un momento particular.

## 6. OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de las mutaciones de los genes específicos de resistencia a rifampicina, isoniacida y etambutol que se encuentran presentes en las cepas obtenidas del GenBank de *M. tuberculosis* encontradas en Ecuador (Universidad de Guayaquil, 2022).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia de las mutaciones encontradas en los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *M. tuberculosis* en Ecuador, basándose en el tamaño de la muestra disponible en el GenBank.
- Comparar los genomas disponibles en el GenBank que se encuentran previamente secuenciados de Ecuador, con las secuencias de referencia de *M. tuberculosis* para detectar y analizar las mutaciones presentes en los genes específicos de resistencia a los antibióticos.
- Caracterizar las mutaciones encontradas en términos de su ubicación precisa en los genes de resistencia a los antibióticos, su tipo y su frecuencia en las cepas de *M. tuberculosis* en Ecuador, obtenidas del GenBank.

## 7. DATOS

Tabla 4. Información sobre ensamblajes genómicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

# ENSABLAJE	WGS	BIOSAMPLE	CADENA	TAXONOMÍA	UBICACIÓN
GCA_025916375.1	JANUUU0101.1	SAMN29877851	S0205_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916385.1	JANUUX0101.1	SAMN29877848	S0196_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Chone
GCA_025917215.1	JANUVO0101.1	SAMN29877831	S0001_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025917155.1	JANUVN0101.1	SAMN29877832	S0007_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025917105.1	JANUVM0101.1	SAMN29877833	S0008_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025917075.1	JANUVJ0101.1	SAMN29877836	S0022_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916415.1	JANUUV0101.1	SAMN29877850	S0204_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916475.1	JANUUZ0101.1	SAMN29877846	S0165_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916625.1	JANUVA0101.1	SAMN29877845	S0149_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916495.1	JANUUY0101.1	SAMN29877847	S0194_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	El Empalme
GCA_025916585.1	JANUVB0101.1	SAMN29877844	S0091_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil

GCA_025916485.1	JANUUW0101.1	SAMN29877849	S0202_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	El Empalme
GCA_025917015.1	JANUVK0101.1	SAMN29877835	S0017_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916995.1	JANUVL0101.1	SAMN29877834	S0013_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	El Empalme
GCA_025916905.1	JANUVH0101.1	SAMN29877838	S0039_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916895.1	JANUVI0101.1	SAMN29877837	S0036_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916815.1	JANUVF0101.1	SAMN29877840	S0046_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Babahoyo
GCA_025916805.1	JANUVE0101.1	SAMN29877841	S0059_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916755.1	JANUVG0101.1	SAMN29877839	S0040_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916715.1	JANUVC0101.1	SAMN29877843	S0070_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil
GCA_025916695.1	JANUVD0101.1	SAMN29877842	S0066_Mtb_Ec	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guayaquil

Proyecto: PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter.

## 8. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

### Metodología

Selección de la muestra: recopilación de 21 genomas de *M. tuberculosis* encontrados en Ecuador que hayan sido previamente secuenciados, los cuales se encuentran a disposición del público en el GenBank.

Recopilación de datos: se obtuvieron mediante los datos genómicos completos de las cepas seleccionadas a partir de las secuencias previas. Los datos incluyeron información sobre las secuencias de los genes, las mutaciones presentes y otros marcadores relevantes para la resistencia a los antibióticos.

Análisis bioinformático: se realizó un análisis bioinformático de los datos genómicos para identificar la mutación de los genes específicos de resistencia a antibióticos utilizando ResFinder, que permite buscar patrones de mutaciones comparar secuencias con bases de datos de genes. Para el alineamiento específicamente se utilizó el ClustalW y para la formación de árboles filogenéticos se utilizó el método de máxima parsimonia. Todo esto es parte de la

herramienta MEGA 11 (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021) (Thompson, Higgings, & Gibson, 1994) (Florensa, Kaas, Clausen, Aytan-Aktug, & Aarestrup, 2022).

Análisis estadístico: el modelo estadístico que se aplicó fue el análisis descriptivo de frecuencia, donde se calculó la frecuencia de las mutaciones encontradas en los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *M. tuberculosis* en Ecuador usando el tamaño de la muestra disponible en el GenBank. Esto implica contar el número de cepas que presentan cada tipo de mutación y expresar la frecuencia relativa de cada mutación. También se utilizó como parte del modelo descriptivo la media y la mediana para resumir los resultados, proporcionando una descripción general de la cantidad promedio de las mutaciones. Finalmente, la desviación estándar, que es parte del modelo de análisis descriptivo, permitiendo cuantificar la variabilidad de las mutaciones. En este análisis estadístico se aplicó el lenguaje R en Jupyter Notebook, en el cual se realizarán los cálculos requeridos (Greyrat, 2022).

Interpretación de resultados: se analizaron los resultados obtenidos y se extrajeron conclusiones sobre los genes específicos de resistencia a antibióticos identificados en las cepas de *M. tuberculosis* de Ecuador. Los hallazgos encontrados se discutieron en el contexto de la literatura existente y se propusieron posibles implicaciones clínicas o terapéuticas.

## Resultados

Tabla 5. Cantidad de resistencias encontradas

ANTIBIÓTICO	CANTIDAD DE MUTACIONES
rifampicina	22
isoniacida	21
etambutol	13
pirazinamida	10
estreptomina	10
capreomicina	2
amikacina	2
fluoroquinolona	5
etionamina	3

Proyecto: PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter.

**Interpretación.** El estudio proporcionó datos sobre la resistencia a antibióticos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador. Se identificaron cepas resistentes a varios antibióticos, siendo la rifampicina la más prevalente con 22 mutaciones para su resistencia, seguida de la isoniacida con 21 mutaciones. También se encontraron 13 mutaciones para la resistencia a etambutol, 10 a la pirazinamida, 10 a la estreptomina, 2 a la capreomicina, 2 a la amikacina, 5 fluoroquinolona y 3 etionamina. estos datos proporcionan una visión general de la prevalencia de resistencia a diferentes antibióticos en las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* estudiadas en Ecuador (Anexo 1).

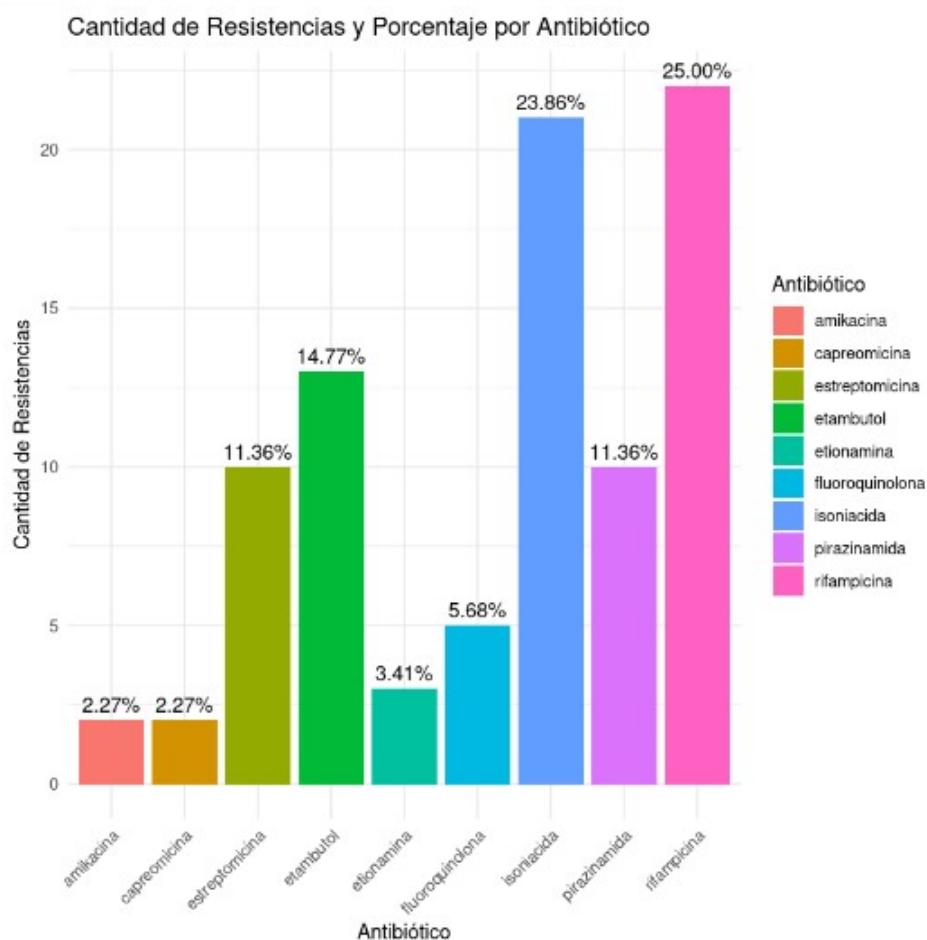


Figura 11. Cantidad de resistencias y porcentaje por antibiótico.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter Notebook.

**Interpretación.** Se observa que la rifampicina presenta la mayor proporción de resistencia, con un 25,00%, 23,86% la isoniacida. Le sigue el etambutol con un 14,77%, y tanto la pirazinamida como la estreptomicina con un 11,36% cada una. En menor medida, se encuentran la capreomicina y la amikacina con un 2,27% de resistencia, y las fluoroquinolonas con un 5,68%. La etionamina muestra un 3,40% de resistencia en las cepas analizadas (Anexo 2)

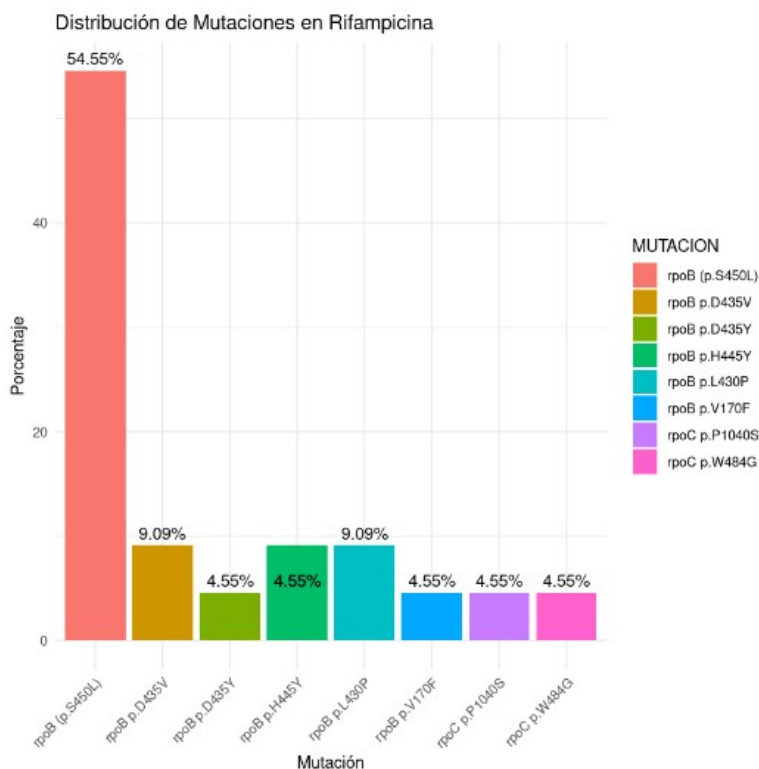


Figura 12. Distribución de mutaciones en rifampicina.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter Notebook.

**Interpretación.** Como se puede observar que la mutación "rpoB (p.S450L)" representa aproximadamente el 54,55% de las resistencias totales, la mutación rpoB p.L430P es el 9,09% y el 4,54% representan a cada uno de los genes rpoB p.V170F, rpoC p.P1040S, rpoB p.H445Y, rpoB p.D435Y, rpoB p.H445Y y rpoC p.W484G (Anexo3).



Figura 13. Árbol filogenético de gen *rpoB*. La mutación más común, llamada p.S450L en el gen *rpoB*, y también la encontramos en otras áreas como “Guayaquil”, “El Empalme,” “Babahoyo”, y “Chone”, el cual se va a distinguir con el color amarillo.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: MEGA11 (método de Máxima Parsimonia en MEGA11).

**Interpretación.** Se infirió la historia evolutiva del gen *rpoB*, utilizando el método de máxima parsimonia (MP). El índice de consistencia es 0.923933 (0.915114), el índice de retención es 0.972985 (0.972985) y el índice compuesto es 0.898973 (0.890392) para todos los sitios y sitios informativos en parsimonia (entre paréntesis). El árbol de MP se obtuvo utilizando el algoritmo de poda-retransplante de subárbol (SPR), con nivel de búsqueda 1, en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 réplicas). Este análisis involucró 22 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 1570 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos en MEGA11 revelaron un árbol filogenético del gen *rpoB* con la cepa JAUVN0101.1 como antepasado común. Este árbol se divide en dos clados principales: el primero, con cepas muy similares entre sí como JANUVO0101.1 y JANUVC0101.1, ambas encontradas en Guayaquil, con una coincidencia de repeticiones del 99%. El segundo clado presenta cepas politómicas, con dos dicotomías notables: JANUVA001.1 y JANUVF0101.1 (en Guayaquil) con un 99% de coincidencia de repeticiones, y JANUVI0101.1 y JANUVJ0101.1 (también en Guayaquil) con un 88% de coincidencia de repeticiones. La cepa de referencia, H37Rv, se posiciona como una rama externa alejada de su antepasado en este árbol filogenético.

En Guayaquil se expresa la mutación del gen rpoB p.S450L, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en las siguientes cepas: JANUUU0101.1, JANUUV0101.1, JANUVI0101.1, JANUVB0101.1, JANUVG0101.1, JANUVA0101.1 y JANUVE0101.1.

En El Empalme se expresa la mutación del gen rpoB p.S450L, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en las siguientes cepas: JANUVY0101.1, JANUVY0101.1, JANUVL0101.1 y JANUVW0101.1.

En Babahoyo se expresa la mutación del gen rpoB p.S450L, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en la siguiente cepa: JANUVF0101.1.

En Chone se expresa la mutación del gen rpoB p.S450L, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en la siguiente cepa: JANUVX0101.1 (Anexo6).

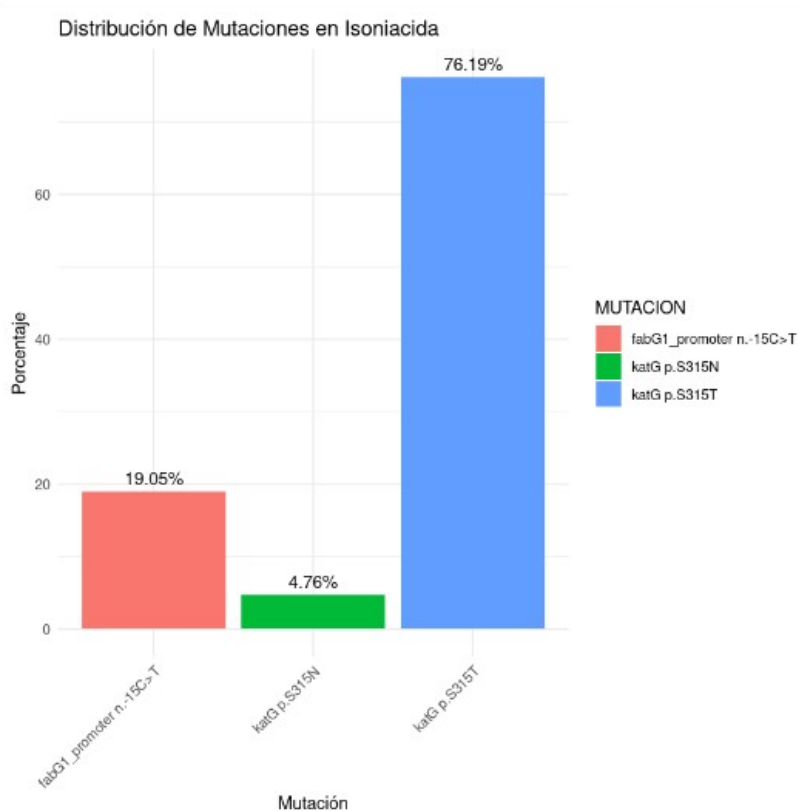


Figura 14: Distribución de mutaciones en isoniacida.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter Notebook.

**Interpretación:** Se identifica que la mutación "katG p.S315N" se encontró en solo una muestra, lo que representa el 4,76%, la mutación "katG p.S315T" el 76,19% del total y la mutación "fabG1\_promoter n.-15C>T" se identificó el 19,05% del total (Anexo 4)

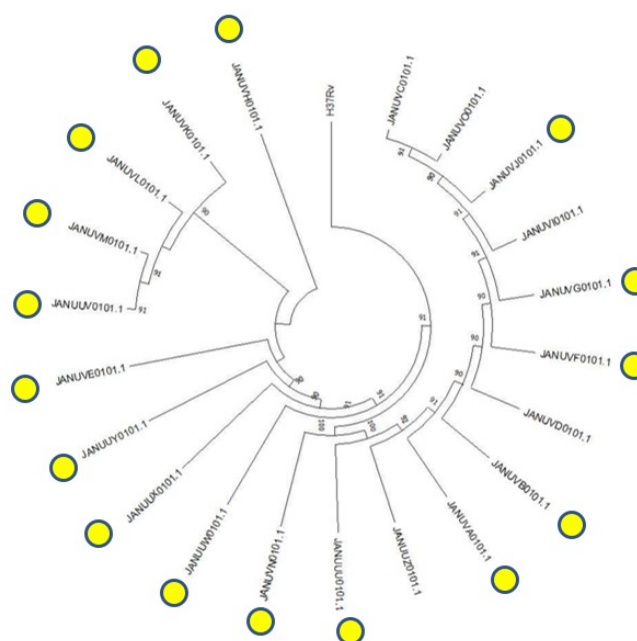


Figura 15: Árbol filogenético de gen katB.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: Mega11 (Método de máxima parsimonia en MEGA11).

Descripción: Árbol filogenético del gen katG. La mutación más común, llamada p.S315T en el katG, y también la encontramos en otras áreas como "Guayaquil" y "El Empalme" el cual se va a distinguir con el color amarillo.

**Interpretación.** Se infirió la historia evolutiva del gen katG, utilizando el método de MP. El índice de consistencia es 1.000000 (1.000000), el índice de retención es 1.000000 (1.000000) y el índice compuesto es 1.000000 (1.000000) para todos los sitios y sitios informativos en parsimonia (entre paréntesis). El árbol de MP se obtuvo utilizando el algoritmo de SPR con nivel de búsqueda 1, en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 réplicas). Este análisis involucró 22 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 1238 posiciones en el conjunto de datos final. El árbol filogenético del gen katG tiene como antepasado común a la cepa JAUVN0101.1 de Guayaquil y se divide en dos grupos principales con el 100% de coincidencia de repeticiones. En el primer grupo, las cepas JANUVC0101.1 - JANUVO0101.1 son muy similares entre sí, con un 91% de coincidencia de repeticiones. En el segundo grupo, hay una dicotomía entre JANUVM0101.1 y JANUVV0101.1, ambas de Guayaquil con un 91% de coincidencia de repeticiones. La cepa de referencia, H37RV, se encuentra alejada de su antepasado en una rama externa.

En Guayaquil se expresa la mutación del gen katG p.S315T, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en las siguientes cepas: JANUVJ0101.1, JANUVG0101.1, JANUVF0101.1, JANUVB0101.1, JANUVA0101.1, JANUUU0101.1, JANUVI0101.1, JANUVK0101.1, JANUVE0101.1, JANUVV0101.1, JANUVM0101.1, JANUVK0101.1 y JANUVH0101.1.

En El Empalme se expresa la mutación del gen katG p.S315T, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en las siguientes cepas: JANUVV0101.1, JANUVY0101.1 y JANUVL0101.1E (Anexo 5).

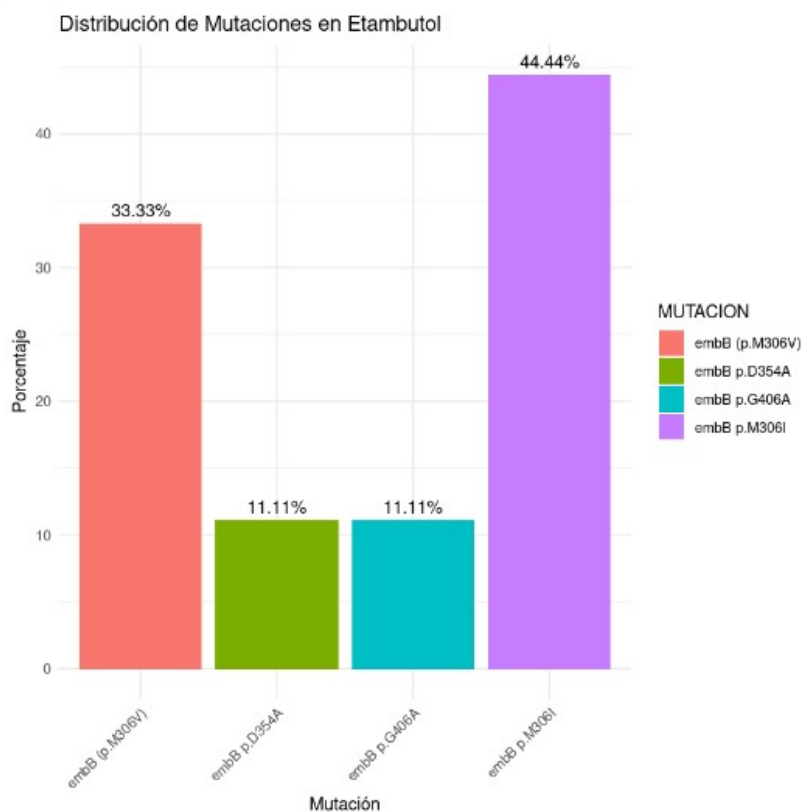


Figura 16: Distribución de mutaciones en etambutol.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter Notebook.

**Interpretación:** Se identificó que el 44,44% de las muestras se encontró el gen embB p.M306I, el 33,33% de los casos, se observó el gen embB p.M306V y el 11,11% respectivamente, pertenecen a los genes embB p.G406A y embB p.D354A (Anexo6).

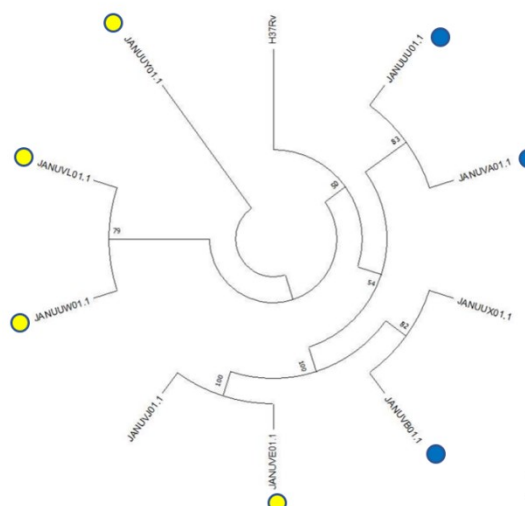


Figura 17: Árbol filogenético de gen emb. La primera mutación más común, llamada "embB p.M306I", la encontramos en otras áreas como "Guayaquil" y "El Empalme" el cual se va a distinguir con el color amarillo. La segunda mutación más común, llamada (embB p.M306V) también la encontramos en otras áreas como "Guayaquil", el cual se va a distinguir con el color azul.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: MEGA11 (método de Máxima Parsimonia en MEGA11).

**Interpretación.** Se infirió la historia evolutiva del gen embB, utilizando el método de MP. El índice de consistencia es 0.929164 (0.902632), el índice de retención es 0.899183 (0.899183) y el índice compuesto es 0.835488 (0.811631) para todos los sitios y sitios informativos en parsimonia (entre paréntesis). El árbol de MP se obtuvo utilizando el algoritmo de SPR con nivel de búsqueda 1, en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 réplicas). Este análisis involucró 10 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 1651 posiciones en el conjunto de datos final. El árbol filogenético del gen embB muestra dos cepas base como antepasados comunes las cuales son: JAUUVJ0101.1 y JAUVE0101.1, de Guayaquil, con un 100% de coincidencia de repeticiones. Estas se dividen en dos grupos principales: el primero con las cepas JAUVB0101.1 y JAUVX0101.1, que son muy similares con un 82% de coincidencia de repeticiones. El segundo grupo, también con un 100% de coincidencia de repeticiones, se divide en dos partes: JAUUU0101.1 y JAUVA0101.1, que comparten similitudes; y H37Rv, que se ubica alejada de su antepasado. Las cepas JAUVY0101.1, JAUUW0101.1 (en El Empalme) y JAUVB0101.1 (en Guayaquil) también están relacionadas, con una dicotomía estrecha debido a su similitud.

En El Empalme se expresa la mutación del gen embB p.M306I, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en las siguientes cepas: JANUVY0101.1, JANUVL0101.1 y JANUVW0101.1

En Guayaquil se expresa la mutación del gen embB p.M306I, la cual presenta mayor porcentaje de incidencia, en la siguiente cepa: JANUVE0101.1

En Guayaquil se expresa la mutación del gen embB p.M306V, la cual ocupa el segundo porcentaje más grande de incidencia, en las siguientes cepas: JANUVB0101.1, JANUVA0101.1 y JANUUU0101.1 (Anexo 7)

## 9. DISCUSIÓN

La presente investigación ofrece una perspectiva crucial sobre la resistencia a los antibióticos en las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador, y la ubicación geográfica desempeña un papel fundamental en esta dinámica. De un total de 21 cepas analizadas, se ha observado que la rifampicina presenta la mayor tasa de resistencia, con un alarmante 25,00%, lo que indica una preocupante alta resistencia a este medicamento esencial en el tratamiento de la tuberculosis. Además, la isoniacida muestra un preocupante 23,86% de resistencia, subrayando la importancia crítica de abordar esta resistencia en la población estudiada. En cuanto al etambutol, se detecta una tasa de resistencia del 14,77%, lo que es igualmente relevante ya que este medicamento es fundamental en la lucha contra la tuberculosis. Por su parte, tanto la pirazinamida como la estreptomina exhiben una resistencia del 11,36% cada una, lo que resalta los desafíos que enfrentan estos fármacos en su eficacia debido a la resistencia bacteriana. Aunque en menor medida, también se ha identificado resistencia a la capreomicina y la amikacina con un 2,27%, y a las fluoroquinolonas con un 5,68%. A pesar de que estas tasas son menores, no deben pasarse por alto, ya que pueden tener importantes implicaciones en el tratamiento de la tuberculosis resistente. Además, la etionamina, con un 3,40% de resistencia en las cepas analizadas, también muestra una proporción significativa de resistencia, lo que enfatiza la necesidad de monitorear la resistencia a múltiples medicamentos en la tuberculosis.

En total, se han identificado 90 mutaciones en los 21 genomas estudiados, y su distribución en los antibióticos isoniacida, rifampicina y etambutol se ha detallado en este estudio.

En lo que respecta a la isoniacida, se identificaron un total de 21 mutaciones diferentes. Entre estas, las mutaciones katG p.S315N y katG p.S315T fueron las más predominantes, con una muestra que contenía la mutación katG p.S315N y 16 muestras que presentaban la mutación katG p.S315T. Además, se observaron 4 muestras que albergaban la mutación fabG1\_promoter n.-15C>T. Estas mutaciones están estrechamente vinculadas con la resistencia a la isoniacida, lo que enfatiza su trascendencia en la generación de cepas resistentes a este antibiótico.

En cuanto a la rifampicina, se identificaron un total de 22 mutaciones diferentes, siendo las más prevalentes rpoB p.S450L, presente en 12 muestras, y rpoB p.D435V, en 2 muestras. Otras mutaciones encontradas en una sola muestra incluyen rpoB p.V170F, rpoC p.P1040S, rpoB p.H445Y, rpoB p.D435Y, rpoB p.H445Y, rpoB p.L430P y rpoC p.W484G. Todas estas mutaciones se asocian con la resistencia a la rifampicina, lo que indica la diversidad de mutaciones que pueden contribuir a la resistencia a este antibiótico crucial.

En el caso del etambutol, se encontraron 9 mutaciones diferentes, siendo las mutaciones embB p.M306V y embB p.M306I las más prevalentes, encontradas en 3 y 4 muestras respectivamente. Además, se observaron 1 muestra con la mutación embB p.G406A y 1 muestra con la mutación embB p.D354A. Estas mutaciones están asociadas con la resistencia al etambutol y pueden limitar la eficacia de este fármaco en el tratamiento de la tuberculosis.

Los datos presentados en este estudio sobre la resistencia a antibióticos en cepas de *M. tuberculosis* en Ecuador revelan múltiples aspectos importantes. La variabilidad en la resistencia a diferentes antibióticos es evidente, con tasas que oscilan desde un mínimo de 2% hasta un máximo de 25%. La identificación de mutaciones específicas y su prevalencia es esencial para una gestión adecuada de la resistencia y para el desarrollo de estrategias de tratamiento más personalizadas y efectivas, lo que, en última instancia, mejoraría los resultados del tratamiento y reduciría la carga de tuberculosis en la población.

En particular, las mutaciones en el gen *rpoB*, asociadas con la resistencia a la rifampicina, presentan una distribución variada, destacando la mutación *rpoB* p.S450L como la más prevalente, seguida de cerca por la mutación *rpoB* p.L430P. Las otras mutaciones individuales, aunque menos frecuentes, también desempeñan un papel importante en la resistencia a la rifampicina.

El análisis filogenético ha proporcionado información sobre las relaciones genéticas entre las cepas en función de su ubicación geográfica. Las subdivisiones en clados específicos, con alta similitud genética dentro de áreas geográficas, sugieren la adaptación local y la evolución diferencial de las cepas en respuesta a factores ambientales y epidemiológicos regionales. Esto destaca la importancia de considerar la geografía como un factor clave en la dinámica de resistencia y en la formulación de estrategias de tratamiento y control; por ejemplo el análisis filogenético reveló que, en Guayaquil, las cepas compartían una fuerte relación genética y posiblemente un ancestro común, indicando adaptación local. En El Empalme, se encontró la mutación p.M306I del gen *embB* en una alta proporción, sugiriendo una adaptación específica en esta área. Babahoyo y Chone mostraron cepas con la mutación p.S450L en el gen *rpoB*, destacando su distribución geográfica. Además, se identificaron mutaciones asociadas con la resistencia a la isoniacida en varias ubicaciones, como "katG p.S315T" en Guayaquil y "El Empalme". Estos hallazgos subrayan la diversidad genética y la adaptación local de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador.

Para avanzar en la comprensión de la dinámica evolutiva y adaptativa de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador, se requiere una investigación más profunda y exhaustiva que integre datos filogenéticos con información clínica y epidemiológica detallada. Un enfoque futuro deseable sería la implementación de estudios longitudinales a nivel nacional que sigan la evolución genética de las cepas a lo largo del tiempo, identificando patrones emergentes y posibles cambios en la resistencia a los medicamentos.

## 10. CONCLUSIÓN

Con base en la discusión de investigación y los objetivos planteados, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Los resultados del estudio indican que existe una preocupante resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis en Ecuador. La rifampicina y la isoniacida, dos de los fármacos clave en el tratamiento, presentan tasas significativas de resistencia, lo que plantea desafíos importantes para el control de la enfermedad.

Se identificaron múltiples mutaciones en los genes *rpoB*, *katG* y *embB*, que están asociadas con la resistencia a la rifampicina, isoniacida y etambutol, respectivamente. Estas mutaciones exhiben una diversidad considerable, lo que sugiere la existencia de diferentes variantes genéticas contribuyendo a la resistencia en la población estudiada.

Se observó que algunas mutaciones específicas, como la mutación "*rpoB* p.S450L" para la rifampicina, la mutación "*katG* p.S315T" para la isoniacida, y la mutación "*embB* p.M306I" para el etambutol, tienen una alta frecuencia en las cepas resistentes. Estas mutaciones específicas parecen ser las principales causas de resistencia a los antibióticos correspondientes.

Se encontraron diferencias en la distribución geográfica de ciertas mutaciones, lo que destaca la influencia de la ubicación geográfica en la diversidad genética y en la resistencia a los antibióticos en Ecuador.

Las mutaciones identificadas tienen una relevancia clínica significativa y pueden influir en la elección de tratamientos efectivos para la tuberculosis. La detección temprana de estas mutaciones es esencial para adaptar las estrategias de tratamiento y gestionar adecuadamente la resistencia.

La variabilidad en las mutaciones y su distribución geográfica destacan la importancia del monitoreo continuo de la resistencia a los antibióticos en cepas de *M. tuberculosis* en Ecuador.

## 11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### Anexo 1

Tabla 1. Cantidad de mutaciones por antibiótico

ANTIBIOTICO	MUTACIÓN	CANTIDAD
amikacina	rrs r.1401A>G	2
capreomicina	rrs (g.1401A>G)	1

<b>capreomicina</b>	rrs r.1401A>G	1
<b>estreptomicina</b>	rpsL p.K88R	1
<b>estreptomicina</b>	rrs r.514A>C	2
<b>estreptomicina</b>	rpsL p.K43R	5
<b>estreptomicina</b>	rrs (g.514A>C)	1
<b>estreptomicina</b>	rrs r.906A>G	1
<b>etambutol</b>	embB (p.M306V)	3
<b>etambutol</b>	embB p.M306I	4
<b>etambutol</b>	embB p.G406A	1
<b>etambutol</b>	embB p.D354A	1
<b>etionamina</b>	ethR p.A95T	1
<b>etionamina</b>	fabG1_promoter n.-15C>T	4
<b>etionamina</b>	ethR p.F110L	2
<b>fluoroquinolon a</b>	gyrA p.A90V	3
<b>fluoroquinolon a</b>	gyrA p.D94N	2
<b>isoniacida</b>	katG p.S315N	1
<b>isoniacida</b>	katG p.S315T	16
<b>isoniacida</b>	fabG1_promoter n.-15C>T	4
<b>kanamicina</b>	rrs (g.1401A>G)	1
<b>kanamicina</b>	rrs r.1401A>G	1
<b>pirazinamida</b>	pncA p.H43P	1
<b>pirazinamida</b>	pncA p.H82R	3
<b>pirazinamida</b>	pncA p.H51R	2
<b>pirazinamida</b>	pncA p.D49A	1
<b>pirazinamida</b>	pncA p.K96Q	1
<b>pirazinamida</b>	pncA p.A46V	1
<b>pirazinamida</b>	pncA p.G108R	1
<b>rifampicina</b>	rpoB p.D435V	2
<b>rifampicina</b>	rpoB (p.S450L)	12
<b>rifampicina</b>	rpoB p.V170F	1
<b>rifampicina</b>	rpoC p.P1040S	1
<b>rifampicina</b>	rpoB p.H445Y	1
<b>rifampicina</b>	rpoB p.D435Y	1
<b>rifampicina</b>	rpoB p.H445Y	1
<b>rifampicina</b>	rpoB p.L430P	2
<b>rifampicina</b>	rpoC p.W484G	1

Proyecto: PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter.

Tabla 2. Porcentaje de resistencia a antibióticos

ANTIBIÓTICO	PORCENTAJE DE RESISTENCIAS
rifampicina	25,00%
isoniacida	23,86%
etambutol	14,77%
pirazinamida	11,36%
estreptomicina	11,36%
capreomicina	2,27%
amikacina	2,27%
fluoroquinolona	5,6%
etionamina	3,4%

Proyecto: PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter.

### Anexo 3

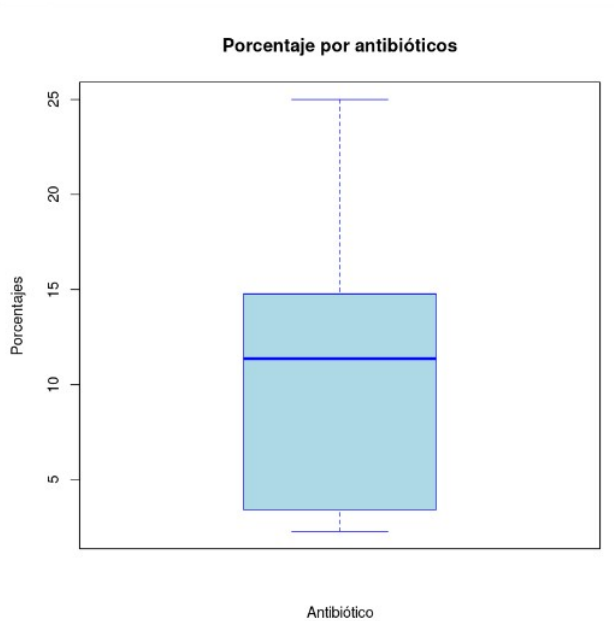


Figura 1. Gráfico de caja de porcentaje resistencias por antibiótico.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter Notebook.

## Anexo 4

Tabla 3. Porcentaje de mutaciones rpoB presentes en las cepas.

ANTIBIOTICO	MUTACIÓN	CANTIDAD	PORCENTAJE
rifampicina	rpoB p.S450L	12	54,55%
rifampicina	rpoB p.D435V	2	9,09%
rifampicina	rpoB p.L430P	2	9,09%
rifampicina	rpoB p.V170F	1	4,55%
rifampicina	rpoC p.P1040S	1	4,55%
rifampicina	rpoB p.H445Y	1	4,55%
rifampicina	rpoB p.D435Y	1	4,55%
rifampicina	rpoB p.H445Y	1	4,55%
rifampicina	rpoC p.W484G	1	4,55%

Proyecto: PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter.

## Anexo 5



Figura 2. Mapa de distribución geográfica de la mutación más frecuente de la rifampicina. *rpoB* p.S450L se señala en color amarillo.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

## Anexo 6

Tabla 4. Tabla de porcentaje de mutaciones *katG* presentes en las cepas.

ANTIBIOTICO	MUTACIÓN	CANTIDAD	PORCENTAJE
isoniacida	<i>katG</i> p.S315T	16	76,19%
isoniacida	<i>fabG1_promoter</i> n.-15C>T	4	19,05%
isoniacida	<i>katG</i> p.S315N	1	4,76%

Proyecto: PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter.

## Anexo 7



Figura 3. Mapa de distribución geográfica de la mutación más frecuente. katG p.S315T se señala en color amarillo.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

## Anexo 8

Tabla 5. Porcentaje de mutaciones embB presentes en las cepas.

ANTIBIOTICO	MUTACIÓN	CANTIDAD	PORCENTAJE
etambutol	embB p.M306I	4	44,44%
etambutol	embB p.M306V	3	33,33%
etambutol	embB p.G406A	1	11,11%
etambutol	embB p.D354A	1	11,11%

Proyecto: PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas

Herramienta: Lenguaje R en Jupyter.

## Anexo 9



Figura 4. Mapa de distribución geográfica de la mutación más frecuente en etambutol. *embB* p.M306I se señala en color amarillo y la segunda más frecuente, *embB* p.M306V, en color azul.

Fuente: Proyecto PRJNA827129 GenBank.

Elaborado por: Nicole Oleas.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### Bibliografía

- Cavusoglu, C., Hilmioglu, S., Guneri, S., & Bilgic, A. (2002). Caracterización de mutaciones *rpoN* en aislados clínicos resistentes a Rifampicina de *Mycobacterium tuberculosis* en Turquía. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Cuevas, B., & Zenteno, R. (2009). Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *ELSEVIER*.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2018). Prevención, diagnóstico, tratamiento y control de la tuberculosis. Guía de Práctica Clínica. Quito: Dirección Nacional de Normatización. Fernandez, J. (22 de Septiembre de 2007). *ClustalW, el 'abuelo' de los alineamientos múltiples, llega a 2.0*. Obtenido de <https://www.madrimasd.org/blogs/bioinformatica/2007/09/22/74453#:~:text=CLUSTAL%20permiti%C3%B3%20agilizar%20la%20tarea,fue%20usado%20durante%20varios%20a%C3%B1os>.
- Florensa, A. F., Sommer Kaas, R., Lanken Conradsen Clausen, P., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. (2022). National Library of Medicine. *Microb Genom*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35072601/>

- Fontalvo, D., & Gomez, D. (2015). Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Scielo*.
- Franco, G., & León, M. (2017). Detección de genes asociados a resistencia para isoniácida y rifampicina en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador. *Revista científica digital INSPILIP*.
- Garzón, D., García, M., Mora, C., Granda, J., León, M., Franco, G., . . . H, J. (2020). Estructura poblacional y diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador. *Scientific Reports*.
- Garzón, D., Zurita, J., Mora, C., Franco, G., León, M., Granda, J., . . . H, J. (2019). Prevalencia, farmacoresistencia y diversidad genotípica de la familia *Mycobacterium tuberculosis* Beijing en Ecuador. *PubMed*.
- Jordán, R., & Valledor, A. (2014). Guías de recomendaciones de prevención de infecciones en pacientes que reciben modificadores de la respuesta biológica. Sociedad Argentina de Infectología .
- López, G., & Oca, A. M. (2012). López Ávalos GG, Prado Montes de Oca E. (2012). Classic and New Diagnostic . *Pubmed*.
- Minh, N. N., Bac, N. V., Ha, C. H., Ha, C. H., Cuong, N. H., Mai, C. T., & Le, T. H. (2012). Características moleculares de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniazida aisladas en Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (22 de Junio de 2023). Ministerio de Salud Pública. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/diagnostico-y-tratamientooportunos-acciones-para-poner-fin-a-la-tuberculosis>
- Morey, G., Fernandez, D. A., & Berná, L. (2022). Comparative genomics of drugresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador. *Pubmed*.
- Murray, R. (2013). MICROBIOLOGIA MEDICA (7ª ED.). Barcelona: ELSERVIER.
- Navarra, C. U. (31 de Julio de 2023). Clínica Universitaria Navarra. Obtenido de <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/mycobacterium>
- Navas Elorza, E., & Moreno Guillén, S. (2010). Tuberculosis multirresistente y extremadamente resistente. *Revista NombreDeLaRevista, Vol. 12(3)*
- NCBI. (4 de Enero de 2013). National Library of Medicine. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- NIH. (22 de Junio de 2023). *National Library of Medicine*. Obtenido de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Organización Panamericana de la Salud (7 de Julio de 2023). Organización Panamericana de la Salud. Obtenido de [www.paho.org](http://www.paho.org)
- Organización Mundial de la Salud. (2022). Informe Global de Tuberculosis. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

- Organización Mundial de la Salud. (7 de Julio de 2023). Informe Mundial sobre la Tuberculosis 2018. Obtenido de [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en)
- Organización Mundial de la Salud. (21 de Abril de 2023). Tuberculosis. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- Peñata, A., Perez, C., Bustamante, J., Ospina, S., & Castaño, T. (2022). Distribución y frecuencia de potenciales mutaciones asociadas con la resistencia a rifampicina en el gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* detectadas mediante un método molecular automatizado. *Revista de la Facultad de Medicina*.
- Rodriguez, J., Llerena, C., Argoty, L., Guerra, J., Couvin, D., Rstogi, N., & Murcia, M. (2020). Estructura poblacional de aislados clínicos multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en Colombia. *ELSEVIER*.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., ... Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
- Sanchez, J., Nicola, E., & Morey, G. (2022). Determinación de la mutación S315T del gen *katG* en aislados resistentes a Isoniacida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-RFLP. *Scielo*.
- Sirgel, F. A., Warren, R. M., Streicher, E. M., Victor, T. C., Helden, P. D., & Böttger, E. C. (2019). *embB306* Mutaciones como indicadores moleculares para predecir la susceptibilidad al etambutol en *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemeoterapy*.
- Suthum, K., Samosornsuk, W., & Samosornsuk, S. (2020). Caracterización de *katG*, *inhA*, *rpoB* y *pncA* en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes con riesgo de MDR-TB en Tailandia. *The Journal of Infection in Developing Countries*.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Análisis de Genética Evolutiva Molecular Versión 11. *Molecular Biology and Evolution*, 3022–3027.
- Vergara, A. (2019). Evaluación y comparación de métodos de ensamblaje y binning a partir de datos metagenómicos reales. *Universidad Oberta de Catalunya*.
- Woodman, M., Haeusler, I. L., & Grandjean, L. (2019). Epidemiología genética de la tuberculosis: una perspectiva latinoamericana. *genes*.
- Zurita, J., Espinel, N., Barba, P., Ortega, D., Rojas, Y., & Alcocer, I. (2019). Diversidad genética y farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador. *ingenta*.