



Universidad Autónoma de Chiriquí

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Escuela de Biología

Título:

**Genotipificación de aislados del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía, provincia de Chiriquí**

Autor:

**Sara Patricia Miranda Rodríguez C.I.P: 4-807-856**

**Asesor de tesis:**

Luis González, Mgtr

**Co-asesores:**

Rogelio Santanach, Dr.

Giselle Urriola, Mgtr.

Consultores:

Fermín Acosta, PhD.

Amador Goodridge, PhD.

**Trabajo de graduación para optar por el título de Licenciatura en Biología con énfasis en Microbiología**

David, Chiriquí

INDICASAT-AIP, Ciudad del Saber, Panamá República de Panamá

Año 2022

## DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

A mi padre Eimer Miranda y mi madre Rita de Miranda quienes se lo merecen completamente por todo el esfuerzo que han invertido en mi por amor y profundo cariño, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Eimer Miranda y Eimir Miranda por todo su apoyo constantemente. A mi abuela Ovelia Villarreal por estar conmigo siempre dándome su tierno cariño.

Esta tesis se las he dedicado con mucho amor y sentimiento para agradecerles todo el esfuerzo que han hecho por mí, por su amor incondicional y por siempre mantenerse a mi lado apoyándome y guiándome por el buen camino. Esta meta la he logrado por ustedes y para ustedes.

Con cariño

Sara Miranda

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero, quiero agradecerle profundamente a Jehová Dios por brindarme salud, protección y sabiduría en todo el trascurso de la carrera y sobre todo en la etapa final para desarrollar este trabajo de investigación; por regalarme fuerza y determinación en los momentos difíciles, gracias a eso y a su apego espiritual he podido lograr esta meta tan deseada.

### **A mis consultores e instituciones involucradas:**

Agradezco a mis asesores el Dr. Fermín Acosta y el Dr. Amador Goodridge por confiar en mí, y brindarme todo su apoyo y conocimiento, me siento afortunada de haberlos conocido y seguir teniéndolos como una guía y fuente de inspiración. Gracias por animarme constantemente, motivarme, ayudarme a realizar lo mejor posible cada técnica y a perfeccionar siempre cada procedimiento; estoy inmensamente agradecida con ambos por formarme científicamente. También, quiero agradecerle al resto del equipo del laboratorio por tener la paciencia en enseñarme todo lo que involucraba estar en el laboratorio.

De igual manera quiero agradecerle al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP) por abrirme las puertas de sus instalaciones y permitirme realizar este trabajo de investigación, y por brindarme su disposición de todos los medios de laboratorio, equipamiento y espacio necesario para la ejecución de las actividades de investigación propuesta. Agradecerles a mis asesores anteriormente mencionados, el Dr. Fermín Acosta y el Dr. Amador Goodridge por llevar a cabo esta tesis financiada con fondos obtenidos de Capital Semilla del Programa de Inserción de Becarios 2021, Convocatoria Pública de Fomento a la Investigación y Desarrollo (FID) 2020 (PFID-FID-2021-247), Internal Grant de INDICASAT-AIP, EraNet-LAC TRANS-TB-TRANS, Sistema Nacional de Investigadores (SNI) No. 22-2020 de la Secretaria Nacional de Ciencia,

Tecnología e Innovación (SENACYT) de Panamá que ha permitido tener todos los insumos necesarios para ejecutar esta investigación. Otra institución de la cual estoy muy agradecida es la Fundación Benéfica Louis y Marthe Deveaux por brindarme su apoyo económico durante toda mi pasantía en INDICASAT-AIP. Las ayudas recibidas me permitieron subsidiar todos los gastos que involucra realizar una tesis en la Ciudad de Panamá.

**A mis asesores y profesores:**

Quiero agradecerles a mis asesores por parte de la UNACHI que siempre estuvieron conmigo para asesorarme y guiarme en todo momento durante la carrera. Agradezco a los profesores Luis González y Giselle Urriola por su disponibilidad, ayuda y orientación en mi desarrollo académico. Gracias al profesor Rogelio Santanach por su apoyo incondicional desde el primer día, por brindarme su conocimiento, guía y asesoramiento para el desarrollo del proyecto de investigación, fortalecer e impulsar el desarrollo de mi conocimiento. Además, agradecer a los demás profesores de la UNACHI que de una forma u otra han contribuido a formarme académicamente.

**A mi familia:**

Es muy importante para mí darle las gracias a toda mi familia, principalmente a mis padres: Eimer Miranda y Rita de Miranda, a mis hermanos Eimer Miranda y Eimir Miranda por su profundo amor y apoyo totalmente incondicional en todos los aspectos: espiritual, moral, emocional, sentimental y económico, siempre los llevaré en mi corazón por darme todo siempre y apoyarme en todos los aspectos de mi vida, por criarme de la mejor manera posible y ayudarme a ser una mujer fuerte, inteligente y que se propone lo que quiere a pesar de los obstáculos.

Consecuentemente, le agradezco a mis abuelitas Ovelia Villareal y Genara Martínez, además de mis tías Iris Miranda y Rosario Miranda por brindarme todo su apoyo, amor y creer siempre en mí, por el apoyo moral y emocional a pesar de la distancia.

También les tengo un profundo agradecimiento a mi familia Pinto Miranda. A mis tíos: Moisés Pinto y mi tía Velkys Miranda, a mis dos primos: Luis Eduardo y Katherine Pinto, por brindarme un espacio en su hogar y todas las comodidades para poder terminar la tesis sin ningún obstáculo. Estaré siempre agradecida y muy feliz por tratarme con tanto cariño y atención desde que llegué a su hogar.

De la misma manera quiero agradecerle al resto de mi familia Miranda Rodríguez, por todo su amor y apoyo incondicional.

A todos les expreso mi amor y gratitud por ser parte de este proceso y hacer posible la culminación de este trabajo.

¡Muchas Gracias!

ATTE: Sara Miranda

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	X
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO I MARCO INTRODUCTORIO.....	14
OBJETIVOS.....	15
HIPÓTESIS.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO.....	18
IMPORTANCIA DE LA MICROBIOLOGÍA.....	19
GENERALIDADES.....	19
TIPOS DE MICROORGANISMOS.....	20
ENFERMEDADES INFECCIOSAS CAUSADA POR MICOORGANIMOS.....	20
TUBERCULOSIS.....	21
ORIGEN E HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS.....	22
ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA TB.....	25
CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y GENÓMICAS DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	28
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	34
EPIDEMIOLOGÍA Y CASUÍSTICA DE LA TUBERCULOSIS.....	48
A NIVEL MUNDIAL.....	48
PANAMÁ.....	49
PROVINCIA DE CHIRIQUÍ.....	53
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
EXTRACCIÓN DE ADN.....	61
CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	63
INTEGRIDAD DEL ADN.....	63
PCR-ALELO ESPECIFICA (ASO-PCR).....	64
POST-PCR.....	65
ANÁLISIS DE FRAGMENTOS.....	65
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	67
RESULTADOS.....	68
DISCUSIÓN.....	72
CAPÍTULO V CONSIDERACIONES FINALES.....	87
CONCLUSIONES.....	88
RECOMENDACIONES.....	88
BIBLIOGRAFÍA.....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1. TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN DE LAS <i>M. TUBERCULOSIS</i> . DESCRIPCIÓN DE ACUERDO AL GRUPO Y NOMBRE CIENTÍFICO. BERGEY'S MANUAL (1984).....	30
TABLA N°2. LECTURA DE BAAR .....	35
TABLA N°3. MEDICAMENTOS DE PRIMERA LÍNEA, MODO DE ACCIÓN, POTENCIA Y DOSIS (MINSA-OMS, 2017). .....	45
TABLA N°4. CLASIFICACIÓN DE LA TB DROGORESISTENTE (TB-DR) PARA EL MANEJO CLÍNICO DEL PACIENTE CON DIAGNÓSTICO DE TB DROGORESISTENTE, MINSA, PANAMÁ. FUENTE: (MINSA Y OPS, 2021). .....	46
TABLA N°5. LINAJES DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> REPORTADOS EN PANAMÁ.....	52
TABLA N°6. ENFERMEDADES INMUNOPREVENIBLES PEDIÁTRICAS EN EL HMIJDO. ....	56
TABLA N°7. VALORES INDICATIVOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL MATERIAL DE ADN. ....	63
TABLA N°8. ALELOS SNP ESPECÍFICOS Y DISEÑO DE LA PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS <i>M. TUBERCULOSIS</i> DE ALTA TRANSMISIÓN. ....	64
TABLA N°9. MEZCLAS DE REACCIÓN Y CONDICIONES PARA CADA PCR .....	65
TABLA N°10. RESISTENCIA DE LOS AISLADOS <i>M. TUBERCULOSIS</i> OBTENIDAS EN EL HOSPITAL MATERNO INFANTIL JOSÉ DOMINGO DE OBALDÍA, CHIRIQUÍ (N°85). ....	69
TABLA N°11. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> EXTRAÍDA MEDIANTE EL MÉTODO CTAB.....	70
TABLA N°12. RESUMEN DE RESULTADOS DE LAS TRES ASO-PCRS APLICADAS SOBRE LA COLECCIÓN DE 85 AISLADOS DE DEL COMPLEJO <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO UNIVERSAL ENRAIZADO QUE MUESTRA LOS TRES DOMINIOS DE LA VIDA.....	20
<b>FIGURA 2.</b> MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	26
<b>FIGURA 3.</b> MODELO DE LA PARED CELULAR MICOBACTERIANA.....	27
<b>FIGURA 4.</b> MAPA CIRCULAR DEL GENOMA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV .....	29
<b>FIGURA 5.</b> FILOGENIA ACTUALIZADA DEL COMPLEJO <i>M. TUBERCULOSIS</i> . ....	32
<b>FIGURA 6.</b> TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> EN FORMA DE BASTONES .....	36
<b>FIGURA 7.</b> TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> EN FORMA DE CORDONES .....	36
<b>FIGURA 8.</b> CULTIVO DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> EN MEDIO LÖWENSTEIN-JENSEN .....	37
<b>FIGURA 9.</b> ESTIMACIÓN DE LA TASA DE INCIDENCIA DE TB A NIVEL MUNDIAL (OPS, 2020).....	48
<b>FIGURA 10.</b> MAPA DE PANAMÁ, CON SUS PROVINCIAS Y COMARCAS. ....	49
<b>FIGURA 11.</b> MAPA DE LA PROVINCIA DE CHIRIQUÍ CON LAS ZONAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO: BOCAS DELTORO Y LA COMARCA NGÄBE-BUGLÉ.....	59
<b>FIGURA 12.</b> DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DONDE INDICA EL FLUJO DETRABAJO LLEVADO A CABO EN LAS DISTINTAS FASES Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	60
<b>FIGURA 13.</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE CLUSTERA (LINAJE 2 GENOTIPO BEIJING)...	70
<b>FIGURA 14.</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE CLUSTERB (LINAJE 4 GENOTIPO HAARLEM). .....	71
<b>FIGURA 15.</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE CLUSTERB (LINAJE 4 GENOTIPO HAARLEM). .....	71
<b>FIGURA 16.</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE CLUSTERC (LINAJE 4 GENOTIPO LAM) .....	71
<b>FIGURA 17.</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE CLUSTERC (linaje 4 genotipo LAM).....	72

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>GRÁFICA N°1.</b> INCIDENCIA DE TB EN LAS PROVINCIAS Y COMARCAS DE PANAMÁ.....	51
<b>GRÁFICA N°2.</b> INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS EN LOS DISTRITOS DE LA PROVINCIA DE CHIRIQUÍ 2021, TASAPOR 100, 000 HABITANTES.....	54
<b>GRÁFICA N°3.</b> TASA DE INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS POR AÑO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	55
<b>GRÁFICA N°4.</b> NÚMERO DE AISLAMIENTOS DE CEPAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> ANALIZADAS POR AÑO.....	68

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa de problemática global causada por el patógeno *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Se considera como una enfermedad de alta prioridad por su capacidad patogénica, facilidad de propagación y diseminación; así como causar alta morbilidad y mortalidad en algunos entornos a nivel global (McArthur DB.,2019).

En Panamá, la TB supone un reto y desafío a nivel de salud pública, sobre todo en las provincias y comarcas donde los números de casos y la tasa de incidencia de TB son elevados. Como es el caso de la provincia de Chiriquí, Colón, Panamá y Comarcas Guna Yala y Ngäbe-Buglé. En la provincia de Chiriquí, El Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía apoya el diagnóstico de los casos de TB provenientes de la Comarca Ngäbe-Buglé y Bocas del toro, siendo el hospital central más capacitado para recibir los pacientes con síntomas, darles el diagnóstico mediante pruebas microbiológicas y tratamiento antituberculoso. El HMIJDO facilita el aislamiento microbiológico de la cepa bacteriana *M. tuberculosis*, lo que supone una ventaja para realizar caracterización y genotipado de cepas implicados en los casos de TB. La metodología utilizada para este tipo de estudio se basó en aplicar la ASO-PCR, un método específico basada en análisis molecular y genómica diseñadas para rastrear cepas de mayor transmisión o problemática implicados en los casos de TB, útil y sencillo para realizar un análisis de cepas de *M. tuberculosis* tanto retrospectivo y prospectivamente.

Los resultados obtenidos constaron de un análisis sencillo y discriminativo para las 85 cepas de *M. tuberculosis*, donde se encontraron cepas A del linaje 2, genotipo Beijing (3.5 %), cepas B (2.4%) linaje 4, genotipo Haarlem y cepas C (5.8 %) del linaje 4, genotipo LAM. De estas cepas se hallaron resistencia fármacos como a Rifampicina e Isoniacida y cepas MDR. En este estudio también describió la presencia de posibles cepas mixtas, lo que representa un desafío para su análisis, ya que es necesario realizar un subcultivo de la cepa en placas de cultivo y posterior de conteo y análisis de las colonias individuales para separar las colonias y realizar genotipado de las cepas individuales (Acosta, F., et al., 2022).

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a globally problematic infectious disease caused by the pathogen *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*). It is considered a high priority disease because of its pathogenic capacity, ease of spread and dissemination; as well as causing high morbidity and mortality in some settings globally (McArthur DB.,2019). In Panama, TB poses a challenge and challenge at the public health level, especially in provinces and counties where the number of cases and the incidence rate of TB are high. This is the case of the provinces of Chiriquí, Colon, Panama and the Guna Yala and Ngäbe-Bugle Comarcas. In the province of Chiriquí, the José Domingo de Obaldía Maternity and Children's Hospital supports the diagnosis of TB cases from the Ngäbe-Buglé and Bocas del Toro Comarca, being the central hospital best able to receive patients with symptoms, diagnose them through microbiological tests and provide anti-TB treatment. The HMIJDO facilitates the microbiological isolation of the bacterial strain *M. tuberculosis*, which is an advantage for the characterization and genotyping of strains implicated in TB cases. The methodology used for this type of study was based on the application of ASO-PCR, a specific method based on molecular analysis and genomics designed to track strains of higher transmission or problematic involved in TB cases, useful and simple to perform an analysis of *M. tuberculosis* strains both retrospectively and prospectively. The results obtained consisted of a simple and discriminative analysis for the 85 strains of *M. tuberculosis*, where strains A of lineage 2, Beijing genotype (3.5 %), strains B (2.4 %) lineage 4, Haarlem genotype and strains C (5.8 %) of lineage 4, LAM genotype were found. Of these strains, drug resistance to Rifampicin and Isoniazid and MDR strains were found. This study also described the presence of possible mixed strains, which represents a challenge for its analysis, since it is necessary to perform a subculture of the strain in culture plates and subsequent counting and analysis of individual colonies to separate the colonies and perform genotyping of individual strains (Acosta, F., et al., 2022).

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), agente causal de la TB en humanos, siendo en la actualidad la principal causa de muerte en el mundo, cobrándose cerca de 4000 vidas al día (OMS,2020). En las últimas décadas, los estudios evolutivos han mejorado mucho nuestro conocimiento sobre la historia del complejo de *M. tuberculosis* y han destacado su larga evolución conjunta con los humanos por tener capacidad para permanecer latente dentro de este huésped. El éxito que tiene esta bacteria para provocar la enfermedad se debe a su mecanismo de infección y el desarrollo de su patología en la forma pulmonar de la TB, puesto que los pulmones son el principal objetivo de esta bacteria; dependen de cuatro pasos sucesivos: la fagocitosis de los bacilos, su multiplicación intracelular, la fase latente contenida de la infección y finalmente la infección pulmonar activa (Bañuls, A. L., Sanou, A., et al. 2015).

Panamá es uno de los países que representa altas tasas de incidencia (39.9 casos /100.000 habts.) de TB, y que su epidemiología varía entre las provincias y comarcas. La provincia de Chiriquí se ve afectada por los casos de TB en cuanto al reto y limitaciones en el diagnóstico, seguimiento de casos, tecnología y equipos para brindar la debida atención en a los pacientes. La limitada información respecto a los genotipos de cepas circulante en la provincia de Chiriquí y de las regiones próximas como Bocas del Toro y la Comarca Ngäbe-Buglé. Por tanto, fue propicia realizar un estudio de caracterización genotípica de las cepas *M. tuberculosis* obtenidas en la provincia de Chiriquí, y poder caracterizar dichas cepas, generar información útil para tratar los casos de TB y las cepas implicadas. encuentra en la lista de provincias con mayor tasa de incidencia de TB, con un 25.3% de incidencia sobre la Tasa por 100,000 habitantes de Panamá.

Nuestro objetivo fue caracterizar las cepas aisladas de *M. tuberculosis* del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía en la provincia de Chiriquí del 2017, 2019 y 2021 mediante técnicas moleculares/genómica. Esto supuso la aplicar técnicas moleculares para la extracción de ADN basada en solventes orgánicos/CTAB y posterior caracterización de *M. tuberculosis* mediante la ASO-PCRs específicas a partir de las muestras de los cultivos microbiológicos. En esta investigación se contó con 85 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en los años 2017, 2019 y 2021 provenientes del HMIJDO de Chiriquí.

Las cepas provenientes del HMIJD fueron inactivadas mediante métodos estándares de nivel de bioseguridad 3 y fueron preparadas y enviadas al laboratorio de Centro de Biología Molecular y Celular del INDICASAT-AIP, para realizar el proceso de extracción de ADN y genotipificación.

Uno de los objetivos principales es aplicar las tres ASO-PCR específicas (PCR A, B y C) diseñadas previamente para rastrear cepas de mayor transmisión con es la cepa A, B y C de *M. tuberculosis* en la provincia de Panamá y Colón con la finalidad de encontrar la persistencia de la circulación estas cepas a partir del análisis de retrospectiva de una colección de cepas del HMIJDO en la provincia de Chiriquí.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO INTRODUCTORIO**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **HIPÓTESIS**

**H0:** Si algunas cepas de *M. tuberculosis* son más eficientemente transmitidas, entonces deberá haber una diferencia en el número de muestras con cepas en las diferentes regiones.

**H1:** Si algunas cepas de *M. tuberculosis* no son más eficientemente transmitidas, entonces deberá haber una diferencia en el número de muestras con cepas en las diferentes regiones.

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar aislados del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía en la provincia de Chiriquí del 2017, 2019 y 2021 mediante técnicas moleculares y de genotipificación.

### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

1. Determinar las diferentes cepas de *M. tuberculosis* en la provincia de Chiriquí mediante análisis molecular y genómico.
2. Identificar cepas de alta transmisión en la provincia de Chiriquí mediante el uso de ASO-PCRs específica.

## JUSTIFICACIÓN

Esta tesis se dirige al estudio retrospectivo mediante el análisis de una colección de cepas del complejo *M. tuberculosis*, colectados en el HMIJDO de la provincia de Chiriquí con la finalidad de identificar cepas con mayor prevalencia y problemática en la provincia de Chiriquí, son las mismas cepas que se encuentran en el resto del país, con el fin de actualizar la información sobre la situación problemática de los casos de TB en la provincia con datos de incidencia en torno a 25.3 por 100,000 habitantes.. El estudio pretende poner el manifiesto las cepas circulantes, investigar y desarrollar conocimientos sobre la problemática de la TB en Chiriquí. En este caso, a través de esta tesis de grado se busca abordar los casos de TB colectados en la provincia de Chiriquí aplicando las técnicas de ASO-PCR previamente establecida en Panamá, que ayudará a identificar la transmisión de cepas de mayor riesgo y o transmisión descrita previamente en otras provincias de Panamá (Panamá y Colón). (Domínguez, J., Acosta, F., Pérez- Lago, *et al.* 2019). Los resultados de cada actividad sirven como línea de bases sobre las principales cepas circulantes en la provincia de Chiriquí y su relación de transmisión en otros entornos. Por lo que este estudio tiene el objetivo de disminuir todos estos problemas mediante la aplicación de técnicas eficaces utilizando PCR específica para comprender el origen y diseminación del complejo *M. tuberculosis*, causante de la TB, en la provincia de Chiriquí. Los resultados obtenidos serán de gran importancia para ser utilizados en posteriores estudios en nuestro país que puedan contribuir al mejoramiento de la salud en la población de la provincia de Chiriquí y en el resto del país. Las técnicas que serán empleadas en este estudio representan un bajo costo de aplicación, que resulta fácil en comparación con otras técnicas. Estos puntos mencionados son importantes puesto que es la metodología que se utilizará para ejecutar este estudio, además que representa la única opción para caracterizar la genética del complejo *M. tuberculosis* en Chiriquí y posteriormente mantener la vigilancia ya que la herramienta es

flexible y dinámica la cual se modifica y se adapta a la realidad de cada momento en las necesidades del entorno poblacional. Una vez que se identifican estas cepas, sus “huellas digitales” se pueden utilizar como referencia para monitorear de cerca su aparición en poblaciones donde permanecen sin ser detectadas (Kremer, K., Glynn, J. R., Lillebaek, T., et al. 2004).

**CAPÍTULO II**  
**MARCO TEÓRICO**

# 1- IMPORTANCIA DE LA MICROBIOLOGÍA

## GENERALIDADES

La microbiología es una de las ciencias (rama que integra la biología) que ha aportado en gran manera en entendimiento y al desarrollo de las enfermedades infecciosas. Históricamente, la microbiología ha ayudado al desarrollo de la medicina, descubrimientos de patógenos o agentes causales de la enfermedad, ya sea de bacteria, virus u hongos siendo relevantes para entender el origen de la enfermedad. Como, por ejemplo, la enfermedad de la TB causada por *M. tuberculosis* descrito por Robert Koch en 1882, han contribuido a mejorar el diagnóstico, control y al desarrollo de fármacos para el tratamiento (Borrego J., 2018).

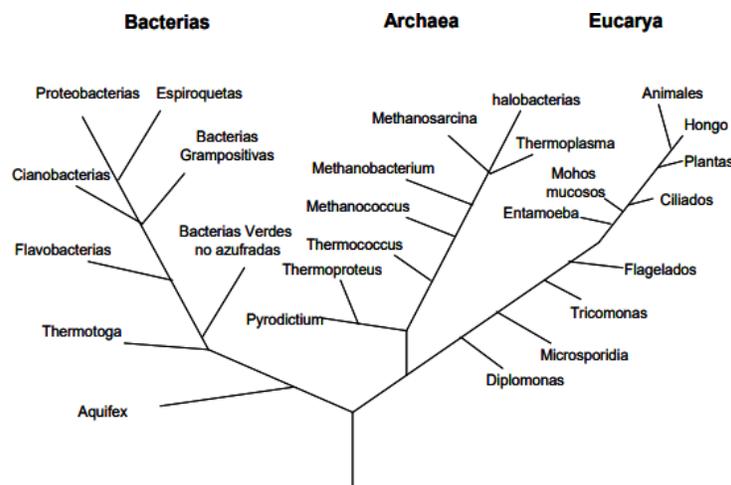
En este sentido, en los últimos años se ha dado a conocer la importancia de la Microbiología, a pesar de que ya era una ciencia existente, finalmente ha emergido el amplio conocimiento que puede abordar y las innumerables aplicaciones que se le puede dar, entre ellas se destaca el poder que tiene de minimizar muchas enfermedades mortales y contagiosas (Stres, B. y Kronegger, L., 2019).

Para seguir siendo una ciencia fuerte, de gran demanda en la identificación y diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas causada por Microorganismos como los Virus, hongos, mohos, parásitos y bacterias, la Microbiología ha introducido en su metodología técnicas moleculares para abarcar más variedad de campos y mantener argumentos completamente sensibles y confiables (Stres, B. y Kronegger, L., 2019). Surgiendo la denominada, microbiología molecular. Aplicada para la hibridación de la detección identificación de microorganismos y caracterización epidemiológica de microorganismos previamente

identificados por métodos tradicionales, además de la caracterización de microorganismos, relaciones existentes entre genotipos y estudios de factores de virulencia (Angarita, 2017).

## 1.1 TIPOS DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos se clasifican en dos categorías: procariotas y eucariotas. En la primera están las Archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios, en esta clasificación no se encuentran los virus, viroides y priones a pesar de que son también microorganismos puesto que no se asemejan a las características de vida como el resto de los microorganismos (G.J. Olsen y C. R. Woese)



**Figura 1.** Árbol filogenético universal enraizado que muestra los tres dominios de la vida. Adaptado de G.J. Olsen y C. R. Woese. “Ribosomal RNA: A key to Phylogeny”.

## 1.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS CAUSADA POR MICROORGANISMOS

Los microorganismos mencionados anteriormente como Bacterias, virus, hongos, parásitos, entre otros, son los encargados de provocar diversas enfermedades en el ser humano directa

e indirectamente, pero cabe recalcar que existe una relación entre humanos y microorganismos, tanto benéfica como perjudicial. Este último caso se le atribuye al entorno ambiental (ambiente exterior e interior) y a las diferentes formas de interacción entre los microorganismos y el hospedero susceptible.

Dentro de dichos aspectos que favorecen la susceptibilidad del huésped son los aspectos sociales de los cuales se destacan la falta de educación, vivienda y empleo, nivel socioeconómico bajo, poca higiene personal y ambiental, escasez de agua, entre muchos más que posibilitan la acción patogénica de microorganismos y vectores (Martínez Abreu J. 2014) Como consecuencia, en los últimos años ha surgido la aparición de enfermedades emergentes y reemergentes (COVID-19, influenza, tuberculosis) lo que conlleva a la circulación de nuevos patógenos que favorece la propagación transmisión de las infecciones lo que su vez, desencadena epidemias o pandemias a nivel mundial.

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), actualmente las enfermedades de mayor problemática a nivel global son la TB (*Mycobacterium tuberculosis*), Coronavirus (Sars-CoV-2), VIH/SIDA, siendo, éstas altamente transmisibles, implicada en la aparición de casos o brotes, lo que supone un reto para su control y erradicación a nivel global (OPS, 2022). Por tanto, generar conocimientos en el abordaje de alguno de estas enfermedades infecciosas es de gran interés para mitigar la transmisión y propagación de casos.

## **2. TUBERCULOSIS**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa de problemática global causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). La tuberculosis se considera como una enfermedad de alta prioridad por su capacidad patogénica, facilidad de propagación y

diseminación; así como causar alta morbilidad y mortalidad en algunos entornos a nivel global (McArthur DB.,2019). La tuberculosis es un patógeno obligado en humanos debido a que su interdependencia surge por los factores biológicos, sociales y ambientales en que se relaciona al humano. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad ataca a más de 4, 000 personas, perdiendo la vida a causa de esta enfermedad y cerca de 30, 000 personas a nivel mundial enferman. Se estima que una cuarta parte de la población mundial está infectada y son portadores del microorganismo infeccioso que causa la TB (OMS, 2021).

## **2.1. AGENTE CAUSAL**

La bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es el microorganismo causal de la enfermedad de la TB. Una bacteria que forma parte del grupo de Complejo *M. tuberculosis*, entre los que podemos encontrar diferentes especies según huésped de infección: *Mycobacterium bovis* (ganados bovinos), *Mycobacterium caprae* (cabras), *Mycobacterium microti* (roedores), entre otros (Dorronsoro, I., & Torroba, L., 2007).

## **2.2. ORIGEN E HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS**

La existencia de la bacteria *M. tuberculosis* se data aproximadamente de más de 70, 000 años, existen registros del origen del género *Mycobacterium* desde la época a.C. (Barberis, I., Bragazzi, NL, *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta la edad media donde se tiene certeza del agente infeccioso y la enfermedad que produce, este gran conocimiento para la ciencia fue gracias al científico alemán Robert Koch.

Durante el XVIII-XIX, Robert Koch, pudo aislar el bacilo de la TB, la teoría afirma que, durante sus experimentos, aplicó técnicas microbiológicas como el uso de la tinción, en aquel tiempo utilizó la tinción de azul de metileno; que aún es actualmente usada en los laboratorios de microbiología para identificar la bacteria, morfológicamente la caracterizó como largos y cortos “Bacteridien” que parecían moverse “en un movimiento independiente, lentamente oscilante”. Posteriormente utilizó suero animal para cultivar y aislar la bacteria, siendo este método el principio de las técnicas más importantes en la historia de la bacteriología: los medios sólidos (agar) para aislar bacterias y la forma de teñirlas (Moreno Altamirano, I., 2004).

Debido a este impresionante descubrimiento surge la investigación por esta bacteria a tal grado que existe una rama de la bacteriología denominada micobacteriología, encargada del estudio las Micobacterias, específicamente *M. tuberculosis* o del “Bacilo de Koch” (BK) haciendo referencia al científico Robert Koch quien lo describió por primera vez.

### **2.3 TRANSMISIÓN E INFECCIÓN DE LA TUBERCULOSIS**

El mecanismo de infección de *M. tuberculosis* es por la vía respiratoria, al ser un patógeno respiratorio su vía de transmisión ocurre de persona a persona mediante la inhalación de núcleos de gotas en aerosoles que contienen las bacterias.

Estos núcleos infecciosos expulsados por el reservorio humano pueden generarse en aerosol de saliva o mucosidad, clasificándose en dos tipos: Flügge o núcleos de Wells, implicadas en la transmisión de la infección micobacteriana. Su tamaño varía ente (0.5-10  $\mu\text{m}$ ) y su carga bacilar va a depender si el reservorio presenta una TB activa o tuberculosis pulmonar grave, con una unidad bacilar característica, es decir, cada gota

lleva en sí de uno (1) a tres (3) bacilos TB infecciosos (Murillo-Godínez, G., 2009).

La infección de la TB puede desencadenar de acuerdo al sistema inmunológico, de tal manera que la unidad bacilar (2 a 3 bacilos por núcleo de gota) puede afectar rápidamente al humano si este presenta un bajo sistema inmunológico o padece de otras comorbilidades degenerativas o infecciosas como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), primera causa de muerte en las Américas. La coinfección VIH/TB, diabetes u otras infecciones adquiridas por trasplante de hospitalarios, conlleva a la predisposición de los pacientes aumentando la progresión de la enfermedad TB. (Plata-Casas, L., *et al.*, 2018).

Por otro lado, las personas sanas no están exento de contagiarse, es más con una dosis infectiva mínima (DIM) con 10 o <10 de bacilos por inhalación pueden adquirir TB (DataBio, 2012). La progresión de la enfermedad va a depender de los factores de riesgos. Reportes indican que del total de las personas que adquieren la TB, un 5% a 10% podrían desarrollar la TB, en algunos casos son eliminados por el huésped o permanecen latente (Rodríguez D, Juan C., 2012). Esto sugiere que el desarrollo de la enfermedad va a depender de los factores de riesgo y la predisposición de la persona frente al agente.

El modo de transmisión de la TB, puede darse por factores que favorecen la infección y propagación de las bacterias, factores biológicos como el hablar, toser, estornudar y respirar, siendo más rápidamente el contagio de TB, puesto que resiste y se mantiene en perfecto estado en el medio ambiente, aproximadamente 30 minutos en el aire en suspensión (Murillo-Godínez, G., 2009). Además de factores biológicos de riesgo como coinfecciones con otros Microorganismos, por ejemplo, personas con TB y VIH/SIDA, y actualmente como consecuencia de la Pandemia existen casos de TB con COVID-19 (TB-COVID) (Song, W. M., *et al.*, 2021). También son factores de riesgo las comorbilidades

como diabetes mellitus y adicciones como el consumo de drogas y alcoholismo. Los factores físicos y ambientales facilitan la transmisión de la TB, como, por ejemplo, el modo de transmisión, el número y la susceptibilidad de las personas (coinfecciones, comorbilidades, sistema inmunológico), la frecuencia y la proximidad de las interacciones entre las personas infecciosas y susceptibles (contacto estrecho, cercano o lejano); haciendo que la infección sea o no exitosa (Mathema, B., *et al*, 2017).

Se sabe que la pobreza impulsa el aumento en las tasas de TB, de acuerdo al informe del 2021 del Panorama Social de América Latina, la pobreza y la pobreza extrema aumentó por sexto año consecutivo, de forma más detallada, el aumento representa el 13,1% de la población en 2020 al 13,8% en 2021, lo que representa a 86 millones de personas en pobreza extrema (CEPAL, 2022). La desigualdad social conduce a que las zonas que se caracterizan por la pobreza, acceso a sistemas de salud limitada conduce aparición y aumento de casos de TB (Turner, RD., *et al.*, 2017).

En los países de alta carga de TB, el porcentaje de los casos de reinfección y coinfección son elevados (poner porcentajes, cuan elevado es), la razón se debe al mayor riesgo de exposición, aunque también están asociado la falta del tratamiento o tratamientos empíricos, la resistencia a los medicamentos, la vulnerabilidad e inmunidad del huésped, el riesgo social de la población. ((Afshar, B.,2019). Gadoev, J., 2017).

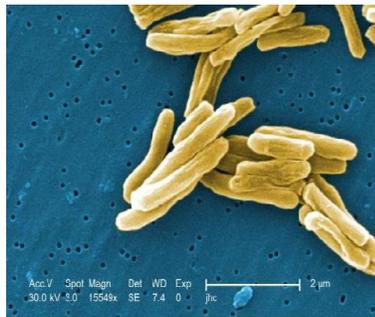
## **2.4 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA TB**

### **2.4.1. CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE CAUSAL**

La bacteria *M. tuberculosis*, es una bacteria resistente, aerobios estrictos sin motilidad

que no producen endosporas, toxinas, ni cápsulas (DataBio, 2012). El tamaño de *M. tuberculosis* varía aproximadamente entre 0.2-0.7 x 1-10 micras ( $\mu\text{m}$ ) (Figura 2.) (DataBio, 2012). Con una morfología de bacilos delgados, comúnmente llamados bastones, rectos o semi curvos. En otras formas se puede presentar la forma de ramificaciones con un crecimiento filamentososo conocido como cordones (Figura 7.).

Esta característica se debe a la formación o agrupación de la bacteria, y puede atribuirse a diferentes aspectos, como el crecimiento en etapas tempranas, una relación entre la virulencia y el fenotipo de *M. tuberculosis* (Rojas J., *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Micrografía electrónica de barrido de *M. tuberculosis*. (Fuente: CDC)

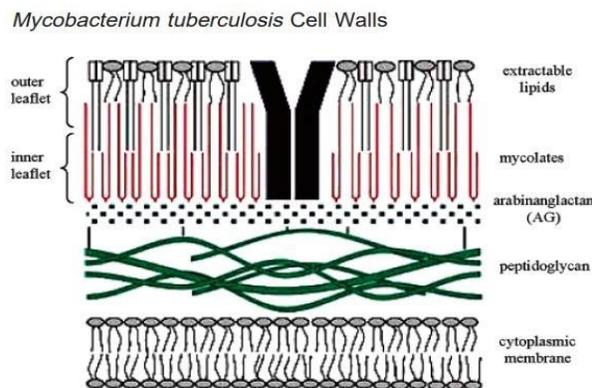
#### **2.4.2. PARED CELULAR DE LA MICOBACTERIA**

Las micobacterias se destacan por su alto contenido de compuestos de lípidos, polisacáridos (Lipoarabinomanano y arabinogalactano) y ácidos micólicos en su pared celular. Esta característica le confiere la denominación como bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), ya que, esta capa de lípidos y ácidos micólicos le aportan impermeabilidad y resistencia durante la decoloración con agentes químicos como Alcohol-Ácido.

Durante la ejecución de dicho proceso químico, la característica BAAR se pone en acción al momento de teñir la micobacteria, donde solo se puede utilizar sustancias penetrantes para poder observarla y caracterizarla. Las características particulares de la bacteria no consideran ni Gram-positiva ni Gram-negativa (Fu, L. M., & Fu-Liu, C. S., 2002).

Se tiene certeza de la diferencia de la pared celular que tiene *M. tuberculosis* con el resto de las bacterias, Puesto que es más gruesa, hidrofóbica, cerosa, y rica en ácidos micólicos/micolatos (Figura 3). La característica hidrofóbica se les atribuye a los altos contenidos lípidos, que le confiere esa impermeabilidad y resistencia frente a muchas condiciones físicas y químicas, además que en su conjunto dan origen al grosor de la micomembrana (Maitra, A., *et al.*, 2019).

La envoltura principal de *M. tuberculosis* y el resto de las bacterias, es la capa de peptidoglicano. Brinda la función de rigidez y estabilidad osmótica de forma óptima y constante. Además, aporta función de unión covalente con el arabinogalactano a la membrana bacteriana (Vincent AT., *et al.*, 2018). Estudios indican que en la membrana externa se encuentran la tercera capa compuesta por los ácidos micólicos (Vincent AT., *et al.*, 2018). Son ácidos grasos de cadena larga propia de las micobacterias y que le aportan vitalidad para la supervivencia a los miembros del género *Mycobacterium* (Marrakchi, H., *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Modelo de la pared celular micobacteriana. En la figura se describe las características de la doble capa de la membrana (externa e interna) y las moléculas presentes en la pared celular de *M. tuberculosis*.

La capa de la membrana externa está compuesta principalmente de glucano y proteínas, con solo una pequeña cantidad de lípidos. La micomembrana corresponde a la barrera de permeabilidad. La pared celular es extraordinariamente gruesa y hermética, constituida por estructuras unidas de peptidoglicano, arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos, formando una micomembrana hidrofóbica de bicapa lipídica (Fuente: Hong, X., & Hopfinger, A. J, 2004).

Finalmente, la cuarta capa de la pared celular externa de las micobacterias, está formada por lípidos, es decir, que en su membrana externa contiene una amplia variedad de lípidos, lipoglicanos y proteínas; además contiene monomicolato de trehalosa, dimicolato de trehalosa,, dimicocerosato de ftiocerol, glicolípidos fenólicos, glicolípidos a base de fenolftiocerol, todos ellos forman un conjugado de resistencia gracias a la micomembrana externa que forma un esqueleto de ácidos grasos (Vincent AT., *et al.*, 2018).

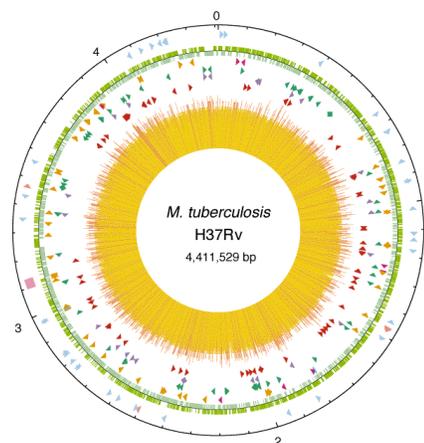
## **2.5. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y GENÓMICAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

### **2.5.1. TAMAÑO GENÓMICO**

El análisis de la secuencia del genoma completo de *M. tuberculosis* se realizó en el año 1995, a partir de la cepa H37RV. Desde entonces, hasta la actualidad, es la cepa mejor caracterizada, con un genoma de 4.411.529 pares de bases (pb) (Figura 4.) Su genoma se caracteriza por tener alrededor de 4.000 genes, además de un contenido muy alto de guanina y citosina (65.6%) que se ven reflejados en el contenido sesgado de aminoácidos de las

proteínas. (Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J. *et al.*, 1998).

Las características genéticas de las *M. tuberculosis* se diferencian del resto de las bacterias, debido a su tamaño genético que representa. Por ejemplo, después de la *Escherichia coli* con 4.639.221 pb es la segunda secuencia genómica bacteriana más grande descrita actualmente. Las *M. tuberculosis* tienen la capacidad de codificación genética para la producción de enzimas involucradas en la lipogénesis y la lipólisis, además de proteínas ricas en glicina con estructuras repetitivas que funcionan como fuente de variación antigénica que está involucrada en la adquisición de patogenicidad y resistencia a antibióticos (Fontalvo Rivera, *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Mapa circular del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. El círculo exterior muestra la escala en Mega base (Mb), con 0 representando el origen de la replicación. El primer anillo desde el exterior indica las posiciones de los genes de ARN estables (los ARNt son azules, otros son rosas) y la región de repetición directa (cubo rosa); el segundo anillo hacia adentro muestra la secuencia de codificación por cadena (sentido horario, verde oscuro; sentido antihorario, verde claro); el tercer anillo representa ADN repetitivo (secuencias de inserción, naranja; familia 13E12 REP, rosa oscuro; profago, azul); el cuarto anillo muestra las posiciones de los miembros de la familia EPI (verde); el quinto anillo muestra los miembros de la familia PE (púrpura, excluyendo PGRS); y el sexto anillo muestra las posiciones de las secuencias PGRS (rojo oscuro). El histograma (centro) representa el contenido de G + C, con <65 % de G + C en amarillo y >65 % de G + C en rojo. La figura fue generada con software de DNASTAR. (Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J. *et al.*, 1998).

## 2.5.2 TAXONOMÍA Y LINAJES

A nivel de taxonomía, *M. tuberculosis* pertenece a las bacterias del orden Actinomycetales, de la familia de *Mycobacteriaceae*, además de la *M. tuberculosis* se ubican en esta taxonomía otras 7 especies de Micobacterias: (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipeddi*, *Mcanneti* y *M. mungi*), que en conjunto se denominan el complejo *M. tuberculosis* (MTBC) (Sanou, *et al.*, 2015).

**Tabla N° 1.** Taxonomía y clasificación de las *M. tuberculosis*. Descripción de acuerdo al grupo y nombre científico. Bergey's Manual (1984).

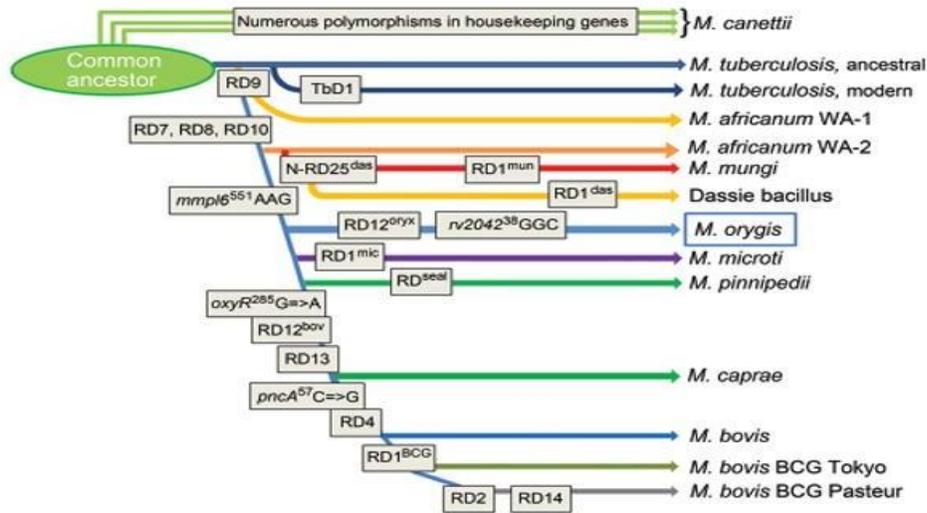
Taxonomía	Clasificación
Dominio	Bacteria
Phyllum	BXIV Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Actinomycetales
Suborden	Corynebacterineae
Familia	Mycobacteriaceae
Género	<i>Mycobacterium</i>
Especie	<i>M. tuberculosis</i>

*M. tuberculosis*, es el microorganismo más extendido a nivel mundial que comprende una gran diversidad de linajes cuyas cepas están extendidas globalmente demostrando la variabilidad y estructura de la genética de la población de *M. tuberculosis* (Gagneux, S., 2006).

En total existen siete linajes bien caracterizados de esta bacteria: Linaje 1 (Indo Oceánico), linaje 2 (Este de Asia), linaje 3 (India y África Oriental), linaje 4 (Euroamericano), linaje 5 (África Occidental 1), linaje 6 (África Occidental 2), linaje 7. Cada linaje está denominado acorde a su primer reporte y distribución geográfica, sin embargo, esta bacteria tiene alta transmisibilidad y pueden distribuirse a nivel mundial y variar considerablemente entre poblaciones y regiones (Chimusa, E., 2014).

En los últimos años, algunos linajes han evolucionado significativamente, de tal manera que por sus características genómicas se han clasificado en linajes antiguos o ancestrales y linajes modernos, por ejemplo, cepas de linaje Beijing ancestral y moderna.

En América, el linaje de mayor distribución geográfica es el linaje 4 (Euro Americano) siendo representativos en mayor frecuencia de casos de TB reportados (, Harleem, LAM,) (Gagneux, S., 2006). En Asia del Este, el linaje 2 (Beijing) es el genotipo más reportado actualmente en esta región, donde se ha llegado a reportar hasta un 50 a 70% de los casos. Estudios indican que las cepas de linaje Beijing, poseen características de mayor transmisión, virulencia y resistencia, lo que supone un reto en el control y vigilancia de los casos de TB. A pesar de que su origen geográfico es Asia donde representa alrededor del 50% de los casos reportados, a nivel global llega a representar hasta el 13% de los casos de TB a nivel global (Parwati, I., van Crevel, R., & van Soolingen, D., 2010).



**Figura 5.** Filogenia actualizada del complejo *M. tuberculosis*. Agrupación de las principales especies de micobacterias basadas de acuerdo a sus genes o regiones conservadas (Van Ingen, *et al.*, 2012).

La filogenia de *M. tuberculosis* se caracteriza por la formación del grupo de especies de micobacterias denominadas “el complejo *Mycobacterium tuberculosis*”; que provocan enfermedades infecciosas tanto en los humanos como en animales, siendo esta, una de sus principales diferencias, la patogenicidad del hospedador y por sus tropismos y fenotipos distinguibles. Se han descrito que las características que tienen todas las especies de este complejo se deben a la similitud del 99,9 % a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ARNr 16S presentes en todas las micobacterias lo que las hace estar filogenéticamente en este complejo (Bouakaze, C., *et al.*, 2010).

## 2.6 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS

Entre los cuadros clínicos más comunes de la TB pulmonar ocurre cuando con la emanación e inflamación granulomatosa con daño tisular, caseificación, vasculitis y fibrosis (Bloom, B, 2017). Además, se puede tener una combinación de cavitación, fibrosis o infiltrados

nodulares. Hunter R. L. (2011).

Según lo anterior, como consecuencia de la enfermedad, aunque la persona se recupere tendrá complicaciones y ciertos factores de riesgo, como la insuficiencia respiratoria a largo plazo, disfunción pulmonar y hasta reducir la calidad de vida si la persona no mantiene una vida saludable (Ravimohan, S., 2018).

Por lo general la TB se puede manifestar o desarrollar en dos maneras, como TB pulmonar (más común) o extrapulmonar y que de acuerdo a sus características o signos clínicos se pueden diferenciar:

- TB pulmonar: Afecta solamente a los pulmones y es la forma más frecuente infección a nivel mundial. Este tipo de TB se caracteriza por la formación de granulomas tuberculosos que tras al avanzar la enfermedad forma un un núcleo de necrosis caseosa que puede clasificarse dando por terminado el crecimiento bacteriano o bien puede crecer y aumentar la lesión granulomatosa y dar origen a una diseminación bacteriana a órganos y tejidos (Kumate, *et al.*, 2008)
- TB extrapulmonar: Afecta otras partes del cuerpo, como el cerebro, los riñones y lacolumna vertebral, entre otras zonas del cuerpo, desarrollando la TB ganglionar, pleural, urogenital, osteoarticular, meníngea y miliar; estas dos últimas son consideradas las de mayor gravedad.

### **2.6.1 SINTOMATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS**

Los síntomas de la TB se clasifican en dos tipos, asintomático y sintomático. En el caso de los asintomáticos, va a depender del sistema inmunológico del paciente, puesto que entra en acción la inmunidad innata y adquirida para bloquear y eliminar la infección causada por la *M. tuberculosis* (Bloom, B, 2017). Las células del sistema inmunológico se desarrollan de dos a ocho semanas después de la infección para evitar la replicación y propagación de dicho microorganismo, pero no asegura una total protección debido a que la bacteria puede

permanecer latente y/o progresar de manera silenciosa

En los casos de pacientes sintomáticos, la sintomatología inicia con síntomas ligeros, signos de fatiga, astenia y pérdida de peso, a medida que avanza la enfermedad los síntomas son más severos, como la tos constante, expectoraciones sanguinolentas, dolores en el pecho, fiebre vespertina y nocturna y anorexia; de tal manera que ya las pruebas microbiológicas salen positivas como la baciloscopia (Bloom, B, 2017) (Morán L., 2001). Cuando los síntomas son visibles la enfermedad progresa, las micobacterias se replican y se propagan en un órgano en específico (pulmonar) o se dispersan por todo el cuerpo lo que se conoce como TB extrapulmonar.

## **2.7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

### **2.7.1. MICROBIOLÓGICOS**

Las técnicas microbiológicas forman parte de uno de los principales métodos para evaluar la presencia de *M. tuberculosis*, diagnóstico, así como, sirve de apoyo para evaluar el resultado del tratamiento de la TB.

#### **2.7.2 BACILOSCOPIA**

La baciloscopia es una técnica microbiológica específica para detectar bacterias con morfología bacilar, ampliamente utilizada en la detección del complejo *M. tuberculosis*. En otras palabras, esta técnica revela la presencia de bacilos del género *Mycobacterium* para conocer la presencia de la bacteria, más no para identificar la especie. Sin embargo, es la técnica más utilizada en la mayoría de los laboratorios microbiológicos para los pacientes sospechosos de TB para conocer si son bacilos positivos (ORAS – CONHU, 2018).

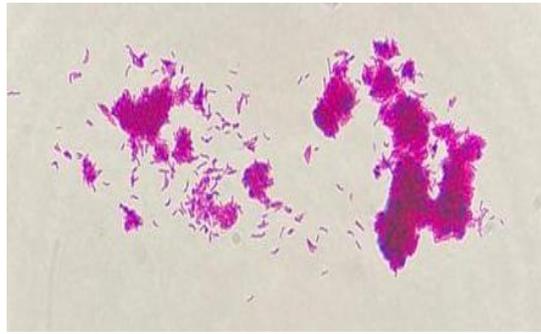
Esta técnica consiste en obtener el esputo del paciente ya sea por inducción de esputo,

lavado gástrico, lavado bronquial u otras muestras, que son procesadas para luego realizar la técnica, iniciando con la técnica de Zielh Neelsen (ZN), utilizando colorante Fucsina fenicada al 0,3%, decolorante Ácido clorhídrico al 3% en alcohol etílico o ácido sulfúrico al 25%, el colorante de contraste azul de metileno al 0,1%, éstas son las coloraciones estándar por su valor económico y resultado factible. Los resultados de este procedimiento evidencian las características morfológicas del bacilo de la TB. Al colocar la muestra en el microscopio es posible reconocer a los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) como un bastoncito rojo fucsia o fluorescente sobre una coloración de fondo azul que facilita su visualización, más las medidas del bacilo, con un tamaño entre 0.2-0.7 x 1-10 micras ( $\mu\text{m}$ ).

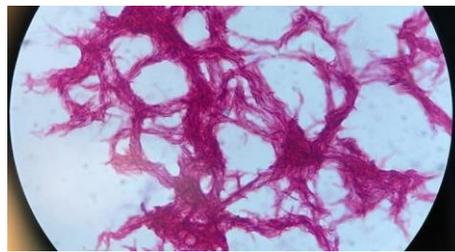
Para poder ver claramente esta micobacteria en el microscopio se debe tener técnica, aparte de los materiales: portaobjetos y aceite de inmersión básicamente. La técnica se basa en colocar la gota del aceite de inmersión adecuadamente y luego poder enfocar hasta 100X cuidadosamente para no dañar la muestra. Los resultados se observan claramente al microscopio con 5.000 bacilos/ml por campo, por lo que se considera positiva considera positiva la baciloscopia con más de 5 bacilos por 100 campos (ORAS – CONHU, 2018). La lectura se realiza de la siguiente manera:

**Tabla N°2.** Lectura de BAAR

+++	MÁS DE 10 BAAR X CAMPO
++	1-10 BAAR x campo
+	1-10 BAAR x 10 campos
	Número de BAAR en 100 campos (1-10)



**Figura 6.** Tinción de Ziehl-Neelsen de *M. tuberculosis* en forma de bastones (Fuente: Patel P., Laboratorio Regional de TB de la Provincia de Colón., Panamá, 2022).



**Figura 7.** Tinción de Ziehl-Neelsen de *M. tuberculosis* en forma de cordones (Cordon factor) (Fuente: Patel P., Laboratorio Regional de TB de la Provincia de Colón., Panamá, 2022).

### 2.7.3. CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Esta prueba microbiológica de característica diagnóstica, conocida como el “estándar de oro”; es ampliamente utilizada por ser más sensible y catalogada como la prueba de referencia (PARISACA MAMANI, *et al.*, 2015).

El grado de positividad está en un rango entre 100-1,000 bacterias/ml, de 50-100 veces más sensible que la microscopia. Esto se debe al hecho de *M. tuberculosis* forma colonias claramente visibles y distinguibles en un periodo de 7 días (cultivo rápido) y más de 7 días son las que requieren más tiempo (cultivo lento).

Lo factible del cultivo bacteriológico de muchas especies de *Mycobacterium* es por su adaptación. Resulta fácilmente al crecimiento en sustratos muy simples, utilizando

amoníaco o aminoácidos como fuentes de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono en presencia de sales minerales.

La temperatura óptima de crecimiento varía ampliamente según la especie desde 25 °C a más de 40 °C, permitiendo favorablemente el crecimiento de la micobacteria. Las micobacterias suelen ser bastante exigentes y requirieren medios ricos y fresco los medios más utilizados son:

**Löwenstein-Jensen:** basado en un medio sólido con huevo que depende tan solo de la concentración de verde de malaquita. se caracteriza por tener un color verde opaco y pálido, es especialmente práctico para el aislamiento, cultivo y diferenciación de micobacterias. Se considera positivo una vez crezcan un mínimo de 10 a 100 bacilos/ml, brindando un 90% de probabilidad + en el diagnóstico,



**Figura 8.** Cultivo de *M. tuberculosis* en medio Löwenstein-Jensen (LJ). (Fuente: Patel P., Laboratorio Regional de TB de la Provincia de Colón., Panamá, 2022). Crecimiento de colonias micobacterianas en condiciones de temperatura de 37°C, aproximadamente con un crecimiento denso de 4 semanas en el medio sólido LJ.

- **7H10 medio sólidos con agar:** Contiene varias sales inorgánicas que proporcionan sustancias esenciales para el crecimiento de micobacterias, también contiene albúmina, su función es la protección de los bacilos tuberculosos contra agentes tóxicos y, por consiguiente, mejora su recuperación en el aislamiento primario. La

inhibición parcial de bacterias contaminantes se logra mediante la presencia del colorante verde malaquita.

- **MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube):** Es un medio de cultivo fluorométrico basado en un 7H9 de Middlebrook con un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona. Bajo la luz ultravioleta el crecimiento se aprecia mediante la visualización de un brillo fluorescente anaranjado en la superficie y en el fondo del tubo como consecuencia de una depleción de O<sub>2</sub>. Es un medio sencillo que permite la lectura manual simultánea del cultivo, aunque actualmente existe el método completamente automatizado capaz de detectar el crecimiento de micobacterias en el cultivo.

Además, permite realizar una evaluación automatizada para identificar la resistencia, por ejemplo, el BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc.) permite obtener resultados rápidos de pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas que se caracteriza por tiempos de detección incluso cortos. Todos los medios son incubados en la temperatura estándar de 35-37°C debido a que la mayoría de las especies tienen un buen crecimiento en dicha temperatura. Seguidamente, la lectura general como seguimiento del crecimiento es a los 3-5 días de la siembra y posteriormente, 2 veces a la semana durante las 4 primeras semanas, seguida de una lectura semanal hasta el final de la incubación. Este último paso resulta fácil una vez que se observan las colonias, aparte del crecimiento característico, éstas, producen pigmentos carotenoides en relación con la exposición a la luz: fotocromógenas si la producción depende de la luz o escotocromógenas si es independiente de la misma. (Fernández de Vega, F. *et al.*, 2005).

## 2.8 TÉCNICAS MOLECULARES DE EXTRACCIÓN DE ADN

- **Extracción por columna**

Este tipo de extracción de ADN se efectúa en presencia de ciertas sales haciendo que los ácidos nucleicos quedan retenidos por adsorción en columnas de sílice, ante la presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas.

Posteriormente, las columnas se lavan con soluciones salinas que eliminan las partículas que no se han unido y finalmente los ácidos nucleicos son diluidos y resuspendidos con agua o una solución con una baja concentración de sales.

Este método de extracción es utilizado ya que las columnas giratorias a base de sílice pueden extraer el ADN purificado de forma óptima y sencilla ya que comercialmente existen kits con esta metodología de extracción como los de las empresas de QIAGEN DNeasy, Kit de purificación de ADN de microbioma PureLink o el paquete RTPPhatogen KIT (Invitak 1040500300, Alemania) ambos utilizados para la purificación del ADN micobacteriano (Thompson Bonilla MR, *et al.*, 2014)

Sin embargo, esta metodología cuenta con ciertas problemáticas. Una de ellas es el tiempo de extracción de ADN, dura aproximadamente dos horas lo que resulta costoso al momento de extraer gran cantidad de ADN de muchas muestras de cualquier organismo (Gomez, D. I., *et al* 2011), (Mantzana-Oikonomaki, V., Maan, M. y Sabino-Pinto, J., 2021).

- **Solventes**

Existe una gran cantidad de solventes para la extracción de ADN, como lo es Bromuro

de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés), fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, ente otros.

Al ver el potencial de los solventes para la extracción del ADN, se elaboró el método CTAB por Doyle & Doyle (1987) y Doyle & Doyle (1990), que en un principio se aplicó en la extracción de ADN para plantas y que ahora es ampliamente utilizado en la extracción de ADN de diversos microorganismos.

El método consiste en agregar el solvente para dar lugar a dos fases

- 1- Fase acuosa: Ubicada en la parte superior que contiene los ácidos nucleicos
- 2- Fase orgánica: Contiene las proteínas y lípidos disueltos.

Para mayor funcionalidad se utiliza este solvente, CTAB, precalentado a una temperatura de 65°C actuando como Buffer en el proceso de extracción del ADN. Dando como resultado final mayor concentración y pureza que los kits comerciales, de acuerdo a diversas comparaciones que se realizan en los métodos de extracción, el método por CTAB muestra significativamente mejores resultados (Iglesias. *et al.*, 2003).

- **Automatizado.**

En este método los equipos automatizados se basan en un proceso más sencillo, consiste en colocar las muestras lisadas se mezclan con esferas magnéticas con capacidad de unirse a los ácidos nucleicos. Tras una serie de lavados para conseguir la máxima purificación del material genético las esferas son retiradas de la solución mediante un separador magnético.

Un ejemplo de equipo automatizado es el Sistema de extracción y purificación automatizado KingFisher, MagCore Plus II RBC BIOSCIENCE (Taiwan), TACO, entre otros.

- **Chelex**

Este método de extracción consiste en utilizar Chelex-100 (resina quelante), para obtener ADN en bloques de parafina. Su empleo en la extracción de ADN genómico se debe al

relativo éxito que ha tenido en la detección molecular de diferentes especies de bacterias y en estudios virológicos (De Armas, 2006).

## **2.9 HERRAMIENTAS MOLECULARES Y GENÓMICAS**

El estudio de la TB resulta actualmente más fácil debido a la aplicación de la epidemiología, específicamente, la epidemiología molecular y genómica para entender la bacteria a nivel de genotipos y de estructura genes. Estas técnicas favorecen la comparación de secuencias de ácidos nucleicos de 2 o más aislamientos respecto a una referencia o grupo clonal ancestral permitiendo detectar la taxonomía del microorganismo problema (P. Coll, D. García de Viedma, 2018). Las herramientas de epidemiología molecular basadas en espoligotipos, RFLP o MIRU han evolucionado y que de acuerdo a su capacidad de discriminación nos han ayudado a mejorar nuestro entendimiento en la comprensión de la TB. Es por ello que actualmente se consideran estas herramientas de epidemiología molecular como una gran llave capaz de abrir grandes descubrimientos y que han permitido progresar en nuevas investigaciones conocimientos de la transmisión y mecanismos de este patógeno tubérculo, en entornos socio-epidemiológicos cada vez más complejos P. Coll, D. García de Viedma, 2018).

### **2.9.1. MIRU-VNTR**

Las “Unidades repetidas intercaladas micobacterianas-repeticiones en tándem de número variable” (MIRU-VNTR), una técnica que se basa en PCR dirigidas a 24 locis. Actualmente es la técnica de referencia para de la epidemiología molecular aplicada por ser rápida, relativamente sencilla desde un punto de vista técnico, muy reproducible y discriminativa.

MIRU-VNTR presenta la característica de funcionar como minisatélite utilizando las repeticiones en tándem de 46 a 101 bp de la bacteria, encontrándose unos 41 MIRU dispersas por el cromosoma. La genotipificación de esta bacteria ocurre cuando los 24 loci de *M. tuberculosis* son señalados con los marcadores específicos durante el proceso de la PCR. Estos marcadores son de conocimiento público y fácilmente exportables de las bases de datos globales que permiten comparar cepas a nivel mundial, de tal manera que el genotipado se realiza de forma específica para cada locus de *M. tuberculosis* (Supply P, *et al.*, 2006).

Una vez se cuentan con la cepa de *M. tuberculosis*, los iniciadores utilizados son marcados con un fluorocromo, permitiendo detectar cadenas de transmisión, de igual manera se determina el tamaño del fragmento amplificado mediante electroforesis capilar. Los resultados obtenidos destacan las hipótesis filogenéticas y la discriminación a nivel de cepa específica de *M. tuberculosis* (P. Coll, D. García de Viedma, 2018).

## **2.9 .2. ASO-PCR**

La PCR alelos específicos (ASO-PCR) es una técnica que pretende simplificar la vigilancia epidemiológica de los casos de TB. Su diseño se caracteriza por ser una herramienta sencilla y fácil manejo e interpretación de resultados siendo muy útil en la vigilancia epidemiológica de la TB.

El diseño de la metodología consiste en la detección de polimorfismos específicos (SNPs) de la cepa que se quieren vigilar y que han sido identificados mediante análisis de secuenciación de genoma completo (WGS), luego filtrar en la base de datos universales de SNPs funcionando como marcadores de la cepa (Pérez-Lago, L., *et al.*, 2014). De tal manera, que, son altamente discriminativos; su identificación mediante PCRs sencillas implica la detección inequívoca de la cepa vigilada. Ofreciendo precisión eficiencia en el

tiempo; la respuesta para el análisis completo incluye el análisis de las muestras, tomar las alícuotas, PCR, electroforesis y análisis de patrones. (Pérez-Lago, L., Herranz, M., *et al.* 2016).

La ASO-PCR, es aplicada gracias a su simplicidad, es fácilmente transferible, pudiéndose aplicar directamente in situ en el entorno clínico donde las cepas se transmiten activamente. La utilidad y versatilidad de este tipo de PCRs, ha sido demostrada mediante análisis de colecciones de forma retrospectiva para la actualizar la situación de cepas problemáticas que se transmiten eficientemente en una población (Perez-Lago L, Comas I, *et al.*, 2014).

En definitiva, la ASO-PCR al ser tan específica permite identificar cepa problema de *M. tuberculosis*, dando como resultado la detección y vigilancia epidemiológica de la propagación de las cepas altamente transmisibles específicas.

La aplicación de esta metodología en dos provincias de Panamá (Panamá y Colón) ha resultado de gran ayuda para estudios de cepas Cepa A, B y C prevalentes descritas en estas dos provincias y permitiendo hacer estudio prospectivo de TB. Un modelo de vigilancia epidemiológica que pretende seguir la transmisión de cepas más problemática o de alto riesgo y conocer la circulación de las cepas a nivel poblacional (Acosta, F., *et al.*, 2021).

La utilidad de la ASO-PCR ha permitido realizar análisis de colección de cepas retrospectivos en países de alta carga de TB como Guinea Ecuatorial. Entornos que supone un reto de diagnóstico, y, falta de capacidad en los laboratorios, falta de programas y estudios retrospectivos y prospectivos de la epidemiología de la TB La utilidad de la herramienta revelo nuevos datos en la identificación de cepas prevalentes y de mayor riesgo de TB. Alerta de la presencia de cepas de *M. tuberculosis* de mayor transmisión y

éxito en la población.

En definitiva, los resultados permitieron rastrear las cepas problemáticas, determinar la presencia de una cepa de brote, incluso permitió ilustrar el predominio de cepas MDR (Pérez-Lago, *et al.* 2017).

### **3 TRATAMIENTO**

La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos es una complicación sumada al momento de tratarlos casos de TB, esto supone un reto en el diagnóstico y tratamiento a nivel de salud pública. (ONU, 2016).

Se considera TB resistente a múltiples fármacos o multidrogosresistentes (MDR), a aquellas cepas resistentes al menos a isoniazida y la rifampicina (OMS, 2020). La gran problemática se debe a que estos antimicrobianos son de primera línea, los principales y ampliamente utilizados para tratar la TB.

El tratamiento microbiológico de la enfermedad de TB requiere múltiples medicamentos; de forma general estos antibióticos son sensibles, eficaces y en la mayoría de los casos se reportan exitosos. Cumpliendo con sus bases bacteriológicas de la asociación de fármacos evitando la selección de *M. tuberculosis* resistentes y la necesidad de tratamientos prolongados para eliminar todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento metabólico (Boldú, J., 2007).

La variedad de fármacos antituberculosos de primera y segunda línea están propuestos para adaptarse al paciente, el tipo de cepa resistente y el número determinado de población bacilar. Los medicamentos de primera línea lo conforman la Rifampicina y la Isoniacida que son los de más alto espectro bactericida, posteriormente la pirazinamida, etambutol y estreptomina.

En Panamá, el programa antituberculoso realiza el tratamiento de acuerdo a la norma entre el MINSA y la OPAT:

**Tabla N°3.** Medicamentos de primera línea, modo de acción, potencia y dosis (MINSA-OMS, 2017).

Medicamento de primera línea	Modo de acción	Potencia	Dosis recomendada (mg/kg peso)	
			Diaria	Máxima (mg)
<b>Isoniacida (H)</b>	Bactericida	Alta	5 (4 - 6)	300
<b>Rifampicina (R)</b>	Bactericida	Alta	10 (8 - 12)	600
<b>Pirazinamida (Z)</b>	Bactericida	Alta	25 (20 - 30)	2000
<b>Etambutol (E)</b>	Bacteriostático	Alta	15 (15 - 20)	1600
<b>Estreptomina (S)</b>	Bactericida	Alta	15 (12 - 18)	1000

### 3.1 DROGORESISTENCIA

La drogoresistencia o resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de que tienen los microorganismos, a soportar los efectos antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos) (OPS, 2021).

Los antimicrobianos cumplen la función de eliminar o controlar el microorganismo, pero, dichos microorganismos como las bacterias, virus, hongos y los parásitos cambian y se adaptan a lo largo del tiempo; como consecuencia dejan de responder a los medicamentos los cuales se vuelven ineficaces contra el microorganismo dando origen a la drogoresistencia (OMS, 2020).

La drogoresistencia es una problemática de la salud pública que atenta con el bienestar del paciente. Es una de las 10 principales amenazas que afectan a la humanidad causando

muerres, además de otras complicaciones como discapacidad, prolongación de la enfermedad, altos costos financieros en otros medicamentos y largas estancias en los hospitales. Todos estos factores favorecen la propagación del patógeno, pero aún, determina la aparición de patógenos farmacorresistentes (OMS, 2020).

La aparición de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos es un problema que va en aumento. En el año 2018, se reportó medio millón de casos de casos de TB resistente a la rifampicina (TB-RR) y TB multirresistente (TB-MDR) que comprende la resistencia de rifampicina e isoniacida (OMS, 2020).

**Tabla N°4.** Clasificación de la TB Drogoresistente (TB-DR) para el manejo clínico del paciente con diagnóstico de TB drogoresistente, MINSA, Panamá. Fuente: (MINSA y OPS, 2021).

CLASIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
<b>Mono Resistencia (TB-MR)</b>	Presencia de cepas infectantes de <i>M. tuberculosis</i> resistente in vitro a un medicamento antituberculoso de primera línea (MPL). *
<b>Multidrogoresistente (TB-MDR)</b>	Es la presencia de cepas infectantes de <i>M. tuberculosis</i> resistentes in vitro al menos a Isoniacida y Rifampicina.
<b>Pre-Extensamente Resistente (Pre-XDR)</b>	Es la presencia de cepas infectantes de <i>M. tuberculosis</i> resistente in vitro a Isoniacida y Rifampicina (TB-MDR) con resistencia adicional a una Fluoroquinolona
<b>Extensamente Resistente (TB-XDR)</b>	Cepas infectantes de <i>M. tuberculosis</i> resistentes in vitro a Isoniacida y Rifampicina (MDR); a una Fluoroquinolona (FQ) y adicional al menos a un medicamento del Grupo A como Bedaquilina y Linezolid.
<b>Poli Resistencia (TB-PR)</b>	Cepas infectantes de <i>M. tuberculosis</i> resistente in vitro a más de un medicamento antituberculoso de primera línea y que no presentan resistencia a Isoniacida y a Rifampicina simultáneamente.
<b>Pansensible</b>	No tiene resistencia a ningún fármaco

\*Los fármacos de primera línea son la Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol, Estreptomina.

La problemática de aparición de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes es notable, la OMS junto con las directrices de Enfermedades Tropicales han lanzado el programa ShORRT (regímenes cortos totalmente orales para la TB resistente a la rifampicina) con el objetivo de promover la investigación y evaluar parámetros de eficacia, seguridad, viabilidad, aceptabilidad, costo y el impacto de la calidad de vida relacionada con la salud de aquellos pacientes con TB-MDR (TDR, 2020).

En este sentido, las nuevas actualizaciones de la OMS en el año 2020, sobre las pautas de tratamiento de la TB resistente a los medicamentos, también promueve la investigación científica, operativa y de ensayos controlados aleatorios que se dirijan al bienestar del paciente y cumplir con el propósito de “Fin a la TB, salvemos vidas” (OMS, 2022). Para lograrlo se necesita el compromiso de los gobiernos nacionales, el sector privado, los socios técnicos, la sociedad civil y las agencias de financiación (Mirzayev, F., 2021)

### **3.2 PREVENCIÓN**

La vacuna antituberculosa ha ayudado de cierto modo a la prevención de la TB en menores de edad. Una vacuna que se denomina vacuna de Bacillus Calmette-Guerin (BCG) que, desde su fabricación, en 1921, hasta la actualidad sigue siendo la única vacuna autorizada por la OMS que tiene una eficacia (Fatima, S., *et al.*, 2020).

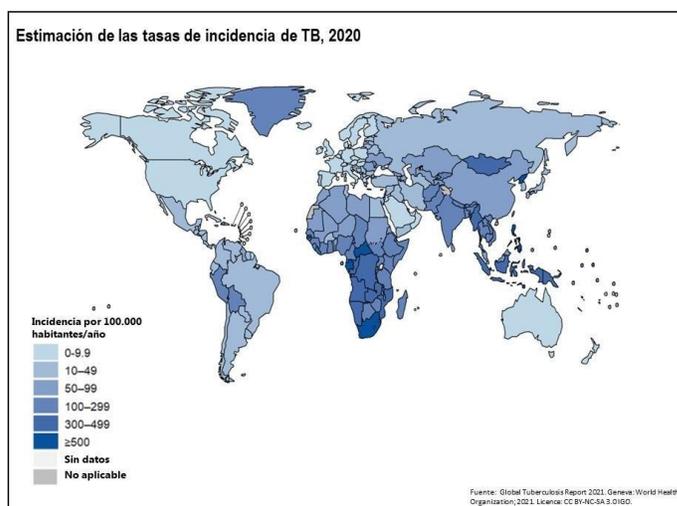
Esta vacuna forma parte del Programa Ampliado de Inmunización (PAI) de la Organización Mundial de la Salud y se ubica en la lista de medicamentos esenciales de la OMS. Sin embargo, tras múltiples estudios se busca un nuevo remplazo de esta vacuna, ya que solo es

eficaz para TB pediátrica, pero, su protección es altamente variable y deficiente en todas las edades contra la TB pulmonar (Mangtani, P., *et al.*, 2014).

## 4- EPIDEMIOLOGÍA Y CASUÍSTICA DE LA TUBERCULOSIS

### 4.1. TUBERCULOSIS A NIVEL GLOBAL

El informe de la OMS del año 2019, estiman que 10 millones de personas se enfermaron de TB, con un estimado de 1.4 millones de muertes por esta infección. Las cifras de la estratificadas indican mayor número de casos de TB respecto a otras regiones. En este sentido las américas representa un alto número casos infecciosos por TB, con cifras de 289.000 casos de TB y 22.900 casos de muertes. En el tiempo, las tasas de notificación de casos no han variado en los últimos ocho años: en el 2019, se notificaron 23,4 casos de TB por cada 100 000 habitantes, comparado con 23,5 en el 2011. Los datos preliminares del 2020 apuntan a una disminución en la notificación de casos debido a la COVID-19 y van a requerir un análisis diferente al realizado en años anteriores (OPS, 2020).



**Figura 9.** Estimación de la tasa de incidencia de TB a nivel mundial (OPS, 2020)

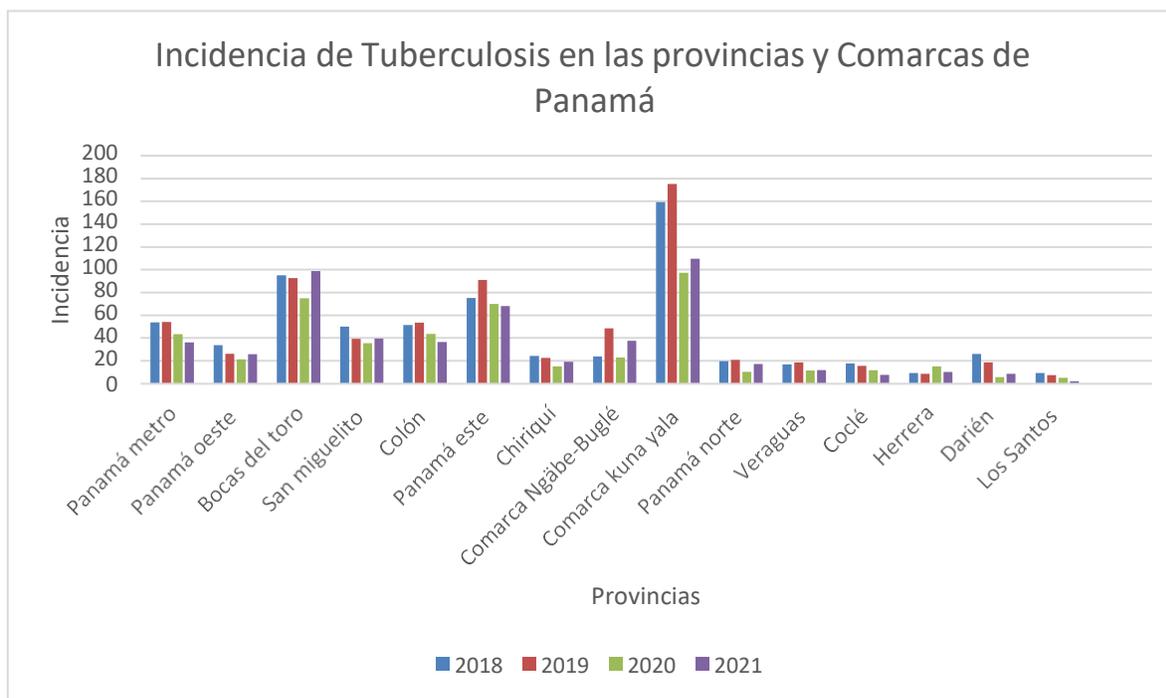


Por otro lado, Costa Rica, es uno de los países de América central que tiene casos de TB relativamente bajos. Desde el año 2016 hasta la actualidad sus reportes por TB son escasos, con una tasa de incidencia de 0,57 / 100 000 habitantes, dando como resultado una baja mortalidad por esta enfermedad infecciosa. Dentro de los pocos casos reportados, la mortalidad por TB en Costa Rica es atribuido a los casos de coinfección por TB y VIH/SIDA, lo que demuestra que esta problemática de coinfección sucede en todos los países a nivel mundial, hasta en los países con mayor control de esta enfermedad infecciosa (Mata-Azofeifa, *et al.*, 2020).

En el caso de Panamá, la TB es una problemática de salud pública, aunque en los últimos años las tasas de incidencia han bajado en la región seguimos entre los países con una incidencia de media a alta (20.0-39.9 por 100, 000 habitantes) (Figura 9.) comparado con otros países de la región, por ejemplo, Costa Rica, previamente mencionado.

Panamá se encuentra en constante crecimiento en la región. De acuerdo al instituto Nacional de Estadísticas (INEC), en el segundo trimestre de 2021, Producto Interno Bruto Trimestral (PIBT), presentó un incremento de 40.4%. Aunque el país se encuentra en constante mejora como el la industrias o comercial, el sector de Salud supone un reto en el abordaje de diferentes enfermedades infecciosas que aquejan la salud pública, debido a la falta de atención en insumos, tecnología y equipos para brindar la debida atención en cuanto a consultas y hospitalización (Tarajia, M., & Goodridge, A., 2014).

**Gráfica N° 1.** Incidencia de TB en las provincias y Comarcas de Panamá.



El abordaje de la TB supone un reto en Panamá, una minoría de organizaciones son las que se unen para evaluar, divulgar y tomar medidas contra esta problemática. De las cuales se destacan instituciones como Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP), Organización Panameña Antituberculosa (OPAT), Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, la Caja De Seguro Social y Ministerio de Salud de Panamá.

Actualmente, el Ministerio de Salud en Panamá avanza con Control de la TB, en grandes ciudades con el apoyo de OPS/OMS. Esta estrategia consiste en abarcar las principales ciudades más transitables y con mayor flujo social (OPS, 2017). En el caso de Panamá, aquellas ciudades son la provincia de Panamá, Colón y Chiriquí.

El objetivo de esta iniciativa es brindar asesoría técnica en cuanto al análisis de información de la salud, tanto a nivel central como local; debido a que en Panamá aún no se cuenta con un manejo establecido contra la TB, ni mucho menos se cuenta con el

personal de salud suficiente y capacitado para tratar los casos de infecciones y casos de diagnóstico. (OPS, 2021). Y es que desde la construcción del canal se incrementaron las enfermedades infecciosas, que posteriormente fueron tratadas y erradicadas, pero, la TB no fue una de ellas, puesto que los casos nunca dejaron de sumarse.

De acuerdo a la historia epidemiológica, en Panamá, el número de muertes causadas por la TB en el período de 1920 a 1930 ha fluctuado entre 375 y 280 anualmente, con un promedio de 338 muertes en aquellos años (OPS, 1933). Haciendo una comparación, actualmente las cifras han aumentado, en el año 2019 se detectaron más de 1,800 casos nuevos de TB para una tasa general de 42.9/100,000 habitantes (MINSA, 2017).

En la misma literatura del MINSA, justifica que, en Panamá, la mayor incidencia de TB se encuentra en las áreas menos favorecidas, con las peores viviendas, la peor nutrición y el mayor grado de analfabetismo (MINSA, 2017).

**Tabla N°5.** Linajes de *M. tuberculosis* reportados en Panamá.

Autor	Año de aislados	Provincia	N° de aislados	Resistencia (%)	Linaje (%)	Genotipos
Rosas S., <i>et al</i> 2013	2002 2004	Nacional	231	RI (29,0) RR (30,7) SM (22,1) EMB (8,2) PAS (0,9) MDR (0)	L4	LAM-L4 (68)
Lanzas F, <i>et al</i> 2013	2001 2010	Nacional	97	MDR (68)	L2 L4	LAM-L4 (58) Haarlem-L4 (13) Beijing
Sambrano D., <i>etal</i> 2014	2005	Panamá	62		L2 L4	LAM-L4 Haarlem-L4 Beijing
Domínguez J., <i>etal</i> 2019	2015	Panamá Colón	94	RI (2,1%) RR (4,3%) MDR (1,1%)	L2 (7,4) L4 (87%)	Beijing (25,5) Haarlem (1,9) LAM (3,9) H37R V
Acosta F. <i>et al</i> 2020	2018-2020	Colón	110	RR (4,8)	L2	Beijing (44.1)

### **4.3. PROVINCIA DE CHIRIQUÍ**

La provincia de Chiriquí presenta importantes desafíos en el control de la TB en la región. En el año 2021 presentó una incidencia elevada, considerable, con un 31.35% de incidencia sobre la Tasa por 100,000 habitantes de Panamá (MINSA).

Chiriquí, actualmente cuenta con 466.957 habitantes, convirtiéndose en una de las provincias más desarrolladas de Panamá y que está en un creciente aumento y movimiento migratorio, tanto nacional como internacional. Esto se debe a que Chiriquí cuenta con el segundo punto de entrada al país más importante, ubicado en paso canoas, frontera de Panamá con Costa Rica.

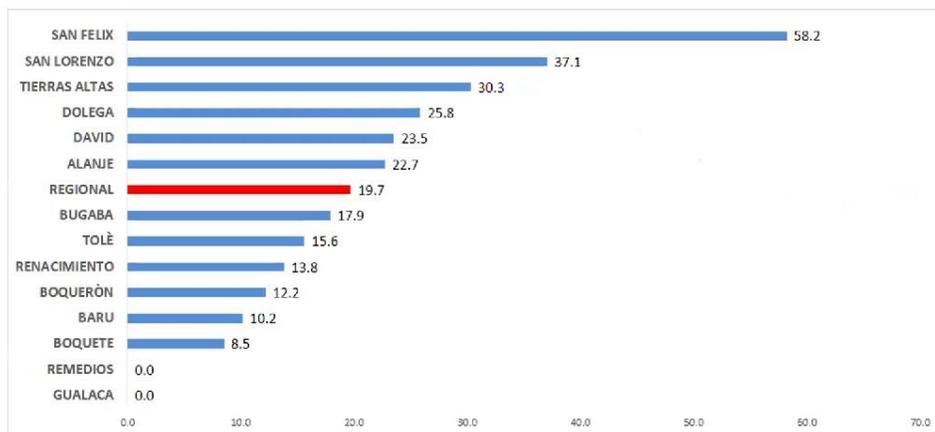
Por otro lado, los movimientos nacionales son realizados por los miembros de las comunidades comarcales y zonas retiradas de difícil acceso que tienen ciertas características que la hacen susceptible a la TB. Es decir que tienen altos niveles de pobreza, bajos recursos e ingresos, zonas de difícil acceso y por lo tanto no tienen acceso a centros de salud cercanos y como consecuencia tampoco tienen acceso al diagnóstico clínico, microbiológico y molecular de la TB y mucho menos al tratamiento antituberculoso.

El Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía de Chiriquí es el que recibe los casos de TB provenientes de la Comarca Ngäbe-Buglé y Bocas del Toro, siendo el hospital central más capacitado para recibir los pacientes con síntomas, darles el diagnóstico mediante pruebas microbiológicas y tratamiento antituberculoso.

De acuerdo a los registros de incidencia de TB, en la provincia, desde el año 2015 consecutivamente hasta el año 2021 se mantuvo una tendencia de aproximadamente 100 pacientes por media, de cada año, reportados con TB. En el 2021, se confirmó que

aproximadamente existen 2 casos nuevos de contagios por cada semana epidemiológica en la provincia de Chiriquí.

**Gráfica N2°** Incidencia de tuberculosis en los distritos de la provincia de Chiriquí 2021, tasa por 100, 000 habitantes.



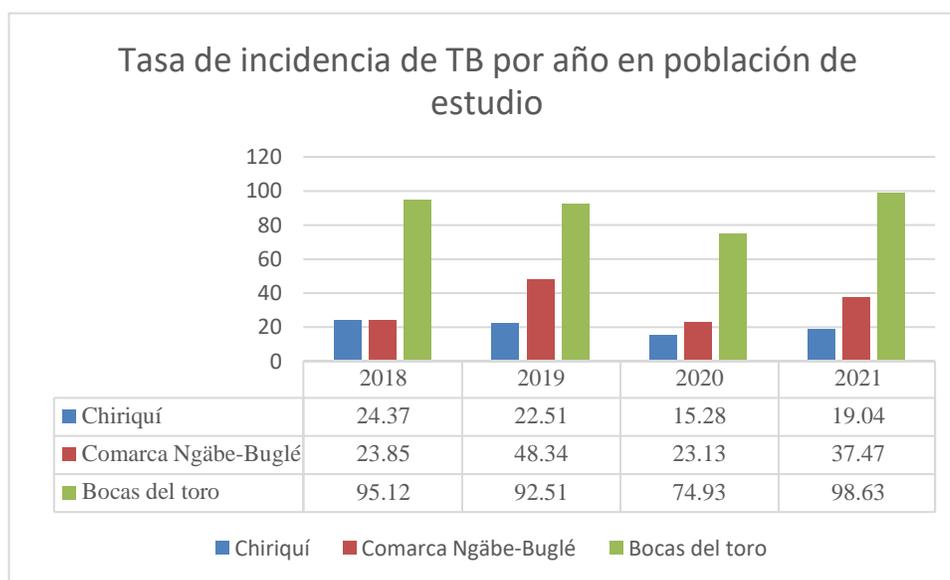
Las zonas con gran cantidad de reportes, son aquellas que están cerca del distrito de David, que comprenden San feliz, San lorenzo (por su cercanía con las comarcas), Tierras altas, Dolega, David, Alanje, Bugaba, Tolé y Renacimiento, y con menor porcentaje de incidencia se encuentra Boquerón, Barú y Boquete (Gráfica N°2.) (Castillo, R., 2022).

La región más afectada la liderizan las comarcas, donde el hospital recibe la mayoría de los casos. Sin embargo, no solo en Panamá se ve esta condición de pobreza y vulnerabilidad en los pueblos indígenas, sino en toda América donde los pueblos indígenas tienen tasas de pobreza considerablemente mayores que el resto de la población. (CEPAL, 2022).

En los últimos años la región de Bocas del toro a tenido tasas de incidencia de TB más altas. Esto se debe a la falta de atención de salud pública que recibe esta provincia no solamente en temas de enfermedades infecciosas sino en todas las condiciones

socioeconómicas poco desarrolladas y difícil acceso que caracteriza a esta provincia (Gráfica N°3).

**Gráfica N 3°** Tasa de incidencia de Tuberculosis por año en la población de estudio.



Tasa de incidencia de la TB durante los últimos cuatro años (2018, 2019, 2020 y 2021) de la población de estudio en esta investigación, que comprende la provincia de Chiriquí, Bocas del Toro y la Comarca Ngäbe Buglé.

En Chiriquí, el porcentaje de casos de 60% representa nivel de pediatría en llamativo por el número de casos reportados (Tabla N°6) lo que representan el grupo de riesgo considerable en la región. Esto se debe a que los determinantes sociales, como las condiciones socioeconómicas de la población, y por los factores de riesgo individuales lo hacen más susceptible.

En el 2021, el Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía (HMIJDO) registró en su boletín de vigilancia epidemiológica las enfermedades inmunoprevenibles, donde se notificó que la TB es la enfermedad infectocontagiosa más frecuente y con mayores casos positivos de TB en menores de edad (HMIJDO, 2021).

**Tabla N°6.** Enfermedades inmunoprevenibles pediátricas en el HMIJDO. Actualizado hasta el 30 de septiembre 2021.

<b>Enfermedades inmunoprevenibles y vigilancias del programa ampliado de inmunizaciones confirmados</b>		
Tuberculosis	26	15 (60 %) Comarcas 8 (32%) Chiriquí 2 (8%) Bocas del toro
Hepatitis B congénita	18	
Hepatitis B	11	
Tosferina	2	

Existen registro de otras enfermedades infecciosas que empeoran la situación de la TB en la provincia Chiricana, como es el caso doble infección por paciente de TB junto con VIH. Se ha visto que desde el año 2014 existe una tendencia con una media del 20% de los casos de TB con esta coinfección que ha ido en aumento al pasar los años, tanto así que, para el año 2021 se registraron 20 casos de coinfección en la provincia de Chiriquí, desglosando los datos, 18 casos son de las zonas urbanas, uno en San Félix y uno en Boquete (Castillo, R., 2022).

**CAPÍTULO III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## **METODOLOGÍA**

### **DESCRIPCIÓN DE ESTUDIO:**

#### **DISEÑO**

Este estudio se basó en un diseño experimental retrospectivo aplicado en la provincia de Chiriquí, donde hace falta mucho por hacer para entender la transmisión de TB y los genotipos existentes en la provincia. Este estudio se basó en identificar las cepas de *M. tuberculosis* más prevalentes o problemáticas, utilizando la metodología de basada PCR alelo específicas (ASO-PCR), diseñada específicamente para identificar y vigilar cepas con mayor riesgo de TB. Una herramienta que una vez diseñada, simplifica su aplicación y análisis de resultados en la identificación de cepas.

La ASO-PCR fue diseñada para rastrear cepas de mayor prevalencia en la provincia de Panamá y Colón, un método alternativo sencillo adaptado a nuestro país que no posee un programa de epidemiología molecular y genómica sistemático. (Domínguez, J., Acosta, F., *et al*, 2019). Por último, se aplicó un diseño de análisis descriptivo para la interpretación y discusión de los resultados obtenidos de la extracción del ADN y la amplificación de dicho ADN mediante la ASO-PCR.

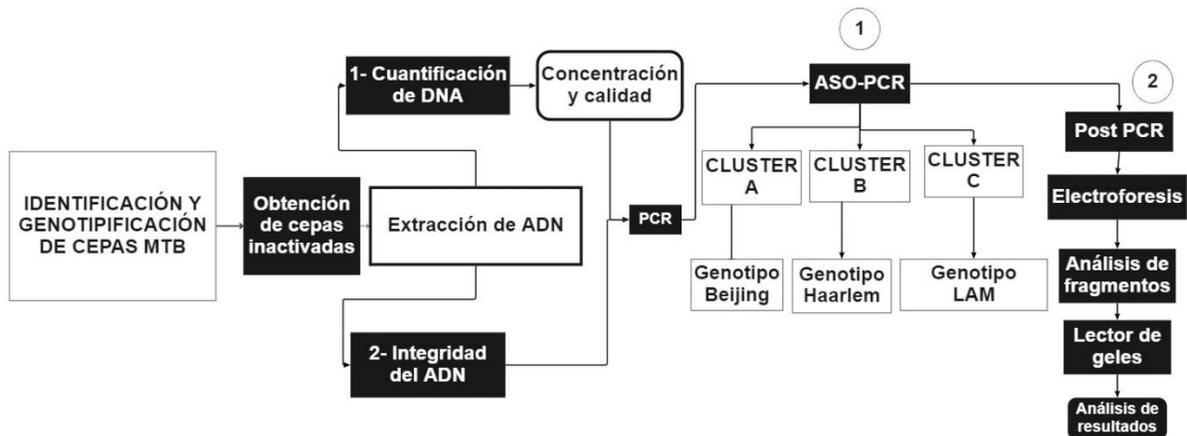
#### **POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA**

El Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía (HMIJDO) ubicada en la ciudad de David, Chiriquí, recibe la mayoría de los casos de pacientes con síntomas y complicaciones de TB de toda la población chiricana, incluyendo otras regiones como Bocas del Toro y la comarca Ngäbe-Buglé. Como se indica en la gráfica N°3 en el año 2021, las tres regiones mencionadas reportaron una tasa de incidencia de 19.04 por 100, 000 habitantes en Chiriquí,



*M. tuberculosis* aisladas en los casos de TB provenientes de la provincia de Chiriquí, Bocas del toro y la Comarca Ngäbe-Buglé.

## FLUJO DE TRABAJO



**Figura 12.** Diagrama de flujo para el procesamiento de muestras donde indica el flujo de trabajo llevado a cabo en las distintas fases y análisis de resultados. El procesamiento de las muestras para su análisis da inicio con la identificación de cepas de *M. tuberculosis* en el HMIJDO.

### 1- Cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes del Hospital Materno Infantil José Domingo de Obaldía.

De acuerdo al nivel de Bioseguridad 3, la colección de cepas de *M. tuberculosis*, fueron desarchivadas e inactivadas en buffer de lisis, incubadas a 95°C por 20 minutos por el personal técnico del laboratorio del HMIJDO. Las muestras inactivadas fueron enviadas al INDICASAT-AIP para su posterior análisis en al área de Bioseguridad 2. El número de aislados y las pruebas de sensibilidad fueron realizadas (en su momento) mediante método Genotype Hain.

## **2- Genotipificación**

La genotipificación completa de las cepas de *M. tuberculosis* se llevó a cabo en el Centro de biología celular y molecular de enfermedades (CBCME) del INDICASAT-AIP, que incluye los siguientes espacios

- 1- Extracción de ADN y cuantificación del material genético en nivel de Bioseguridad 2.
- 2- PRE-PCR y POST-PCR= Implementación de las mezclas de reactivos para las tres ASO-PCRs (clústeres A, B y C) y posterior análisis de productos de PCR por electroforesis en área de post PCR.

### **A. EXTRACCIÓN DE ADN**

Se utilizó la técnica de extracción de ADN Ethylhexadecyldimethylammonium bromide (**CTAB**) que consiste en el agregado de solventes orgánicos.

La metodología consta de realizar toda la extracción en el mismo tubo de tapa rosca

La extracción de DNA fue realizada mediante los siguientes procedimientos que constaban de 2 días:

#### **I Fase**

1. Descongelar muestras
2. Hacer spin por 30 segundos a 1000 rpm
3. Poner en el termobloque las muestras a 95° X 15 minutos
4. Añadir 50 µl de solución de Lisozima (Sigma- Aldrich, Estados Unidos) a cada tubo.
5. Hacer vortex para que los pellets queden completamente resuspendidos.
6. Incubar 1 h. a 37°C en termobloque de Área 2.

7. Añadir 70 µl de Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% + Añadir 3 µl de Proteinasa K (Sigma- Aldrich, Estados Unidos) Realizar vortex brevemente.
8. Incubar en termobloque por 10 min. a 65°.
9. Añadir 100 µl de Cloruro de sodio (NaCl) 5M (molar) y mezclar bien invirtiendo los tubos.
10. Añadir 80 µl de Bromuro de cetiltrimetilamonio CTAB/NaCl, precalentado a 65°C (se calientan alícuotas en el termobloque). Hacer vortex hasta obtener una solución lechosa e incubar por 10 min. a 65°C.
11. Añadir 800 µl de cloroformo/isoamílico. Realizar vortex por 10 seg. cada tubo.
12. Marcar los tubos con una señal hacia fuera para poder luego recuperar el pellet y centrifugar por 5 min. a 13, 000 rpm a 25°C.
13. Transferir cuidadosamente el sobrenadante (sin tocar la capa intermedia) a un nuevo tubo. Si se mueve el tubo o si el sobrenadante es turbio, hacer una nueva extracción desde el cloroformo/isoamílico. Rotular bien los tubos y evitar que sean borradas durante el proceso.
14. Añadir 500 µl de la solución de isopropanol. Realizar vortex a los tubos e incubar a -70°C durante 2h o a -20°C toda la noche

## **II Fase**

1. Retirar los tubos del congelador e inmediatamente centrifugar 15 min. a 13,000 g.
2. Retirar cuidadosamente el sobrenadante. Invertir los tubos sobre papel de filtro hasta que se sequen y lavar con 1ml de etanol 70% frío. Centrifugar por 5 min. a 13,000 rpm.
3. Decantar el sobrenadante y secar los tubos, invirtiéndolos sobre papel de filtro, hasta que estén secos.
4. Resuspender el pellet de ADN en 100 µl de AGUA e incubar 1h a 37°C en termobloque.

## B. CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación del ADN de *M. tuberculosis* se determinó evaluando la calidad y la cantidad del ADN utilizando el equipo NanoDrop™ 2000, Thermo fisher Scientific, utilizando los estándares y manual del fabricante (Thermo fisher Scientific, 2010) como se describe la **tabla N°7**.

La metodología consta de tomar 1 µl de la muestra de ADN y colocarla a en la celda de lectura para pedir la concentración en ng/ µl y la absorbancia 260/280.

**Tabla N°7.** Valores indicativos de concentración y pureza del material de ADN.

Características	Concentración (ng/µl)	Absorbancia (260/280 nm)
Máximo	15,000	3.0
Aceptable	2	1.6
Mínimo	0.01	0.01

## C. INTEGRIDAD DEL ADN

La integridad del ADN fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa con una concentración al 1% y tinción con bromuro de etidio. Para cargar la muestra de ADN con un volumen de 2 µl en cada uno de los pocillos del gel de agarosa; estas se mezclaron con 3 µl de Buffer o tinte de carga: Blue/Orange Loading Dye, 6X de Promega y para la escalera se utilizó un patrón marcador de peso molecular de 1 KB DNA Ladder de Promega. Finalmente, las electroforesis, corrieron a 100V durante una hora y fueron visualizadas en un Transiluminador ultravioleta de CHEMIDOC.

Fórmula utilizada para la preparación de la agarosa:

Agarosa al 1%: Pesar 1g de agarosa y este se disuelve en 100 mL de buffer TBE 1X

#### D. PCR-ALELO ESPECIFICA (ASO-PCR)

La caracterización genotípica de aislados de *M. tuberculosis* se realizó utilizando la metodología de la ASO-PCR, la cual se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritos por Domínguez, J., Acosta, F., *et al*, 2019).

**Tabla N°8.** Alelos SNP específicos y diseño de la PCR para la identificación de cepas *M. tuberculosis* de alta transmisión.

Clúster	SNP por clúster	Posición	SNP	Gen	Secuencia del cebador (5' a 3')	Con. De mezcla	Cepa objetivo	Tamaño del fragmento de PCR (bp)
Grupo A, Beijing	SNP1	204386	G>A	<i>Rv0173</i>	Fw-Rv0173: GCTACCGAAAAATGCCACCG Rv-Rv0173: GAGCACCCGATTGAGGACT	2 2	Cepa no A	400
	SNP2	518748	G>A	<i>Rv0430</i>	Fw-Rv0430: CGATATGGACAGCGCCATGA Rv-Rv0430: TCACCTCGAAGCCAAGGC	6 6	Cepa A	308
	SNP3	3479530	G>A	<i>Rv3111</i>	Fw-Rv3111: TGGAAATGGAAGCGTTGACC Rv-Rv3111: ACGAACGGCACCGAAGTAA	5 5	Cepa no A	228
Grupo B, Haarlem	SNP1	261991	G>A	<i>Rv0218</i>	Fw-Rv0218: CACCTGGAGCGGGCGTA Rv-Rv0218: GCGTTGCAATGTCGAACATT	2 2	Cepa B	297
	SNP2	825060	C>T	<i>Rv0732</i>	Fw-Rv0732: TGCCCTACATCACCGCC Rv-Rv0732: GATGTCCAGCGAGCAACC	2 2	Cepa no B	209
	SNP3	2425513	G>T	<i>RV2163c</i>	Fw-RV2163: CATCGAGCACGGGTTGAG Rv-RV2163: GGCCTTGATAATGCGTGGG	2 2	Cepa no B	406
	SNP4	568395	G>T	<i>Rv0479c</i>	Fw-Rv0479: GCATCCTTCGGTGTGGC Rv-Rv0479: GGATCGTGAGCTTTATCTGCATT	2 2	Cepa B	127
Grupo C, LAM	SNP1	516278	G>T	<i>Rv0427c</i>	Fw-Rv0427: CGCACGTTTCCGAACCC Rv-Rv0427: CGATCTGGGCGTCCATCA	2 2	Cepa no C	207
	SNP2	781859	T>C	<i>Rv0682</i>	Fw-Rv0682: ACAACCTGCAGGAGCACTC Rv-Rv0682: CCCTGCGTATCCAGCGAA	6 6	Cepa no C	103
	SNP3	1802486	G>T	<i>Rv1601</i>	Fw-Rv1601: ACGCCAGCTTCGACCTC Rv-Rv1601: AACGATTCTGAACACGTGCA	2 2	Cepa C	307
	SNP4	4403893	T>C	<i>Rv3915</i>	Fw-Rv3915: AAGGACGGATGGCAGCC Rv-Rv3915: GAGAATGCCTTCGGCGATG	6 6	Cepa C	413

**Tabla 9. Mezclas de reacción y condiciones para cada PCR (A, B y C)**

Reactivo	Volumen por reacción, $\mu\text{L}$		
	Cepa A	Cepa B	Cepa C
HotStarTaq polimerasa, 5 U/ $\mu\text{L}$ diluido 1:10	1.25	1.25	1.25
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	0.4	0.3	0.4
Búffer de PCR, 10 $\mu\text{L}$ con 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5	2.5	2.5
Solución Q, 5 $\mu\text{L}$	5.0	5.0	5.0
Mezcla de cebadores, 10 $\mu\text{L}$	2.5	2.5	2.5
dNTP, 10 mM	0.2	0.2	0.2
H <sub>2</sub> O	10.65	10.75	10.7
Diana de ADN		2.5 $\mu\text{L}$ para cada uno	
Volumen de reacción final de 25 $\mu\text{L}$			

**Nota:** \*dNTPs, desoxinucleótidos; MgCl<sub>2</sub>, Cloruro de magnesio de magnesio. Las condiciones de PCR para cada cepa fueron las siguientes: 95° C durante 15 min, seguido de 27 ciclos de 95°C durante 1 min, recocado (64°C para Cluster A y 60 °C tanto para Cluster B como C durante 1 min) y 72°C durante 10 min.

### **E. POST-PCR**

La Post-PCR consiste del procedimiento de la electroforesis:

Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % en 100 ml de Buffer TBE, con tinción de bromuro de etidio (6  $\mu\text{L}$ ). Una vez el gel solidificado se carga la muestra de ADN con un volumen de 12  $\mu\text{L}$  en cada uno de los pocillos del gel de agarosa; estas se mezclaron con 4  $\mu\text{L}$  de Buffer o tinte de carga: Blue/Orange Loading Dye, 6X de Promega. Los tamaños de los amplicones se estimaron por comparación con marcadores de peso molecular de la escalera de ADN de 100 pb, PROMEGA

Finalmente, las electroforesis, corrieron a 95V durante una hora y media y fueron visualizadas en un Transiluminador ultravioleta de CHEMIDOC.

## **3. ANÁLISIS DE FRAGMENTOS**

El análisis de fragmentos se realizó después de la electroforesis, constaba de tomar el gel de

agarosa y colocarlo en el Transiluminador (CHEMIDOC), en la bandeja lectora del gel #2 que tiene la especificidad para revelar gel de agarosa con tinte de Bromuro de etidio. Una vez realizada la lectura se muestra en la pantalla el gel con las bandas reflejadas.

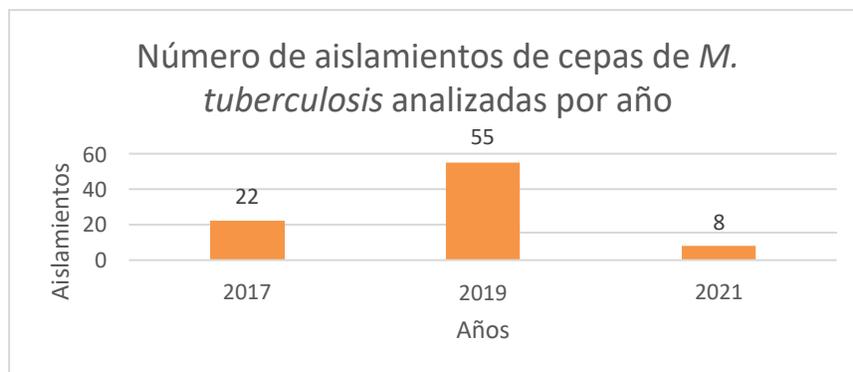
El análisis se lleva a cabo comparando el tamaño de la banda con el control positivo de cada Cluster (Cluster A, Cluster B y Cluster C) además del control negativo la cepa H37RV y así determinar el tipo de cepa. El tamaño de la banda se corroboraba con la escalera de 100 bp (Promega).

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## Colección de cepas del complejo *M. tuberculosis* analizadas por año

En este estudio tuvimos acceso a una colección de 85 cepas de *M. tuberculosis*, las cuales se desglosan en tres años: Obtuvimos 22 cepas del año 2017, 55 cepas del 2019 y por último 8 cepas del año 2021, (Gráfica N° 4)

**Gráfica N°4.** Número de aislamientos de cepas de *M. tuberculosis* analizadas por año.



A todas estas cepas, de los tres años mencionados se le realizó el examen microbiológico de susceptibilidad a fármacos dando como resultados:

### **Determinación de la presencia de drogoresistencia de las 85 cepas de *M. tuberculosis*.**

Se encontró que de los 85 aislados, 2 corresponden a cepas Monoresistente, que se desglosan de la siguiente manera:

- 1 cepa Monoresistente a Rifampicina
- 1 cepa Monoresistente a Isoniacida

Estas dos cepas son aisladas y obtenidas de la Provincia de Chiriquí.

De los 12 aislados de la Comarca Ngäbe-Buglé y los 9 aislados de Bocas del toro no se encontraron cepas monoresistente, lo que quiere decir que estos números dependientes de la región corresponden a cepas sensibles a los fármacos antituberculosos.

Por otro lado, la identificación de cepas multidrogoresistente dio como resultado que de los 85 aislados, solo 3 cepas corresponden a MDR (resistentes tanto a rifampicina como

isoniacida) que están distribuidas en los 58 aislados de la provincia de Chiriquí. Mientras que en la Comarca Ngäbe-Buglé y Bocas del toro no se identificaron cepas.

Finalmente, de estos 85 aliados totales, se destinó una categoría denominada “Datos no disponibles”. En este apartado se señalan 6 aislamientos obtenidos que se le hicieron las pruebas de resistencia a fármacos, pero, por motivos de problemas técnicos en el formulario de inscripción no se ve reflejado la provincia a la que pertenece el paciente.

**Tabla N°10.** Resistencia de los aislados *M. tuberculosis* obtenidas en el Hospital materno infantil José domingo de Obaldía, Chiriquí (N°85).

Región	N° de aislados	Monoresistente	MDR	Sensible
<b>Chiriquí</b>	58	2 (R-R, R-I)	3	53
<b>Comarca Ngäbe-Buglé</b>	12	0	0	12
<b>Bocas del toro</b>	9	0	0	9
<b>Datos no disponibles</b>	6	0	0	5

**Nota:** R-R (resistente Rifampicina), R-I (resistente Isoniacida), MDR (Multidrogoresistente)

\* Datos no disponible: Datos no llenados en el formulario del paciente, por ejemplo, la región donde reside.

### **Obtención de ADN bacteriano**

Los resultados de la extracción de ADN bacteriano mediante método de extracción CTAB fue evaluado mediante Nanodrop 200 con la cuantificación y concentración del material genético, como se indica en la tabla N°11.

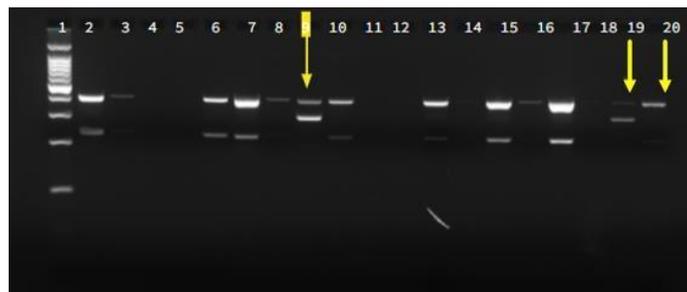
**Tabla N°11.** Cuantificación de ADN de *M. tuberculosis extraída* mediante el método CTAB.

	Concentración de ADN ng/μl	Absorbancia 260/280 nm
<b>PROMEDIO</b>	30.5	1.66
<b>MÁXIMO</b>	180.2	3.0
<b>MÍNIMO</b>	0.01	0.01

### Resultados de las tres ASO-PCR

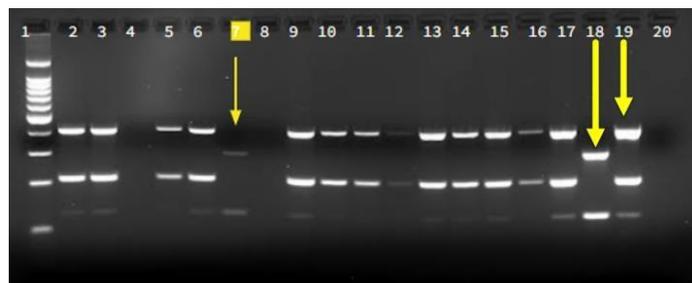
En esta sección se presenta los resultados de las tres PCR aplicadas, ASO-PCR A, B y C. La colección de los 85 aislados fueron interrogados con las tres PCRs para identificar y caracterizar los genotipos más prevalentes (linaje 2 y 4) descrito previamente como problemáticas en Panamá y Colón. De los 85 asilamientos recibidos en los 3 años anteriormente mencionados, se pudieron caracterizar genotípicamente 10 de estas cepas, clasificadas como Cluster.

### Resultados de cepas A de *M. tuberculosis* genotipo Beijing (linaje 2)

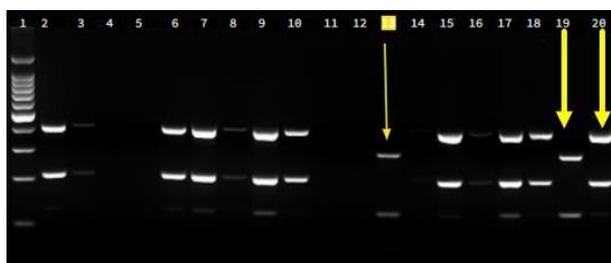


**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster A (linaje2 genotipo Beijing). El pocillo 1 representa la escalera/marcador de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 9 indica la presencia de la cepa A, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).

## Resultados de cepas B y C de *M. tuberculosis* linaje 4



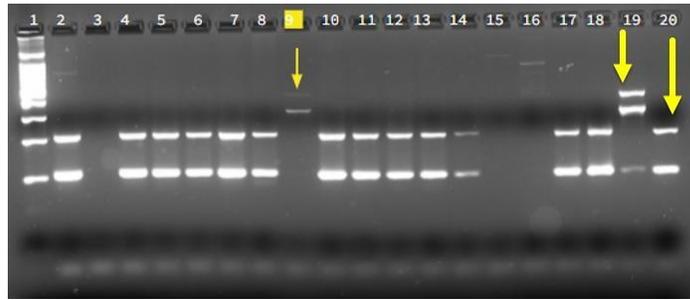
**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster B (linaje 4 genotipo Haarlem). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 17 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 7 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 18 y 19 representan los controles utilizados (Pocillo 18: control positivo y pocillo 19 el control negativo). Por último, el pocillo 20 se le agregó agua como control de contaminación.



**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster B (linaje 4 genotipo Haarlem). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 13 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster C (linaje 4 genotipo LAM). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 9 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).



**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de la cepa de Cluster C (linaje 4 genotipo LAM). El pocillo 1 representa la escalera de peso molecular de 100 pb PROMEGA, el pocillo 2 al 18 representan las muestras de ADN amplificadas, la flecha del pocillo 9 indica la presencia de la cepa B, el pocillo 19 y 20 representan los controles utilizados (Pocillo 19: control positivo y pocillo 20 el control negativo).

### Resumen de los resultados de la ASO-PCR obtenidos

**Tabla N°12.** Resumen de resultados de las tres ASO-PCRs aplicadas sobre la colección de 85 aislados de del complejo *M. tuberculosis*.

ASO-PCR	Cepa, N° (%)	No Cepa N°, (%)	Procedencia
<b>Cepa-A (Beijing)</b>	3 (3.5) *	82 (96.4)	2 (Chiriquí) 1 (Bocas del toro)
<b>Cepa-B (Haarlem)</b>	2 (2.3)	83 (97.6)	Chiriquí
<b>Cepa-C (LAM)</b>	5 (5.8) **	<b>80 (94.1)</b>	Chiriquí

LAM: Latin America Mediterraneo, \*Dentro del total de estas tres **CEPAS A** identificadas, dos muestras son mixtas. \*\* Del total de las **CEPA C**, dos muestras son mixtas.

La transmisión de la TB es un tema global que requiere ser atendido en todo su aspecto. El abordaje de los distintos genotipos implicadas en los casos de TB ayuda a conocer la transmisión de las cepas más prevalente o activas. En este sentido, la aplicación de las herramientas de epidemiología molecular ha resultado útil para tales escenarios. Por ejemplo, la aplicación de la MIRU-VNTR, Espoligotipado o RFLP que permite caracterizar Cluster y genotipos de cepas implicado en los casos de TB (Coll, P., & García de Viedma, D., 2018). Estas herramientas que desde su aplicación a finales de 1990 han ayudado en gran manera identificar brote de cepas, caracterizar cepas de alto riesgo, MDR o cepas de alta transición (van Embden JD., *et al.*, 1993), (Kamerbeek J., *etal al.*, 1997), (van Soolingen D., *et al* 1999). En Panamá, la limitada información sobre epidemiología molecular y genómica sobre la transmisión de cepas de *M. tuberculosis* es de interés en el abordaje. El uso de herramientas de vigilancia epidemiológica como la PCR alelo específicas, ASO-PCR simplifica los pasos en la identificación de cepas de alta transmisión o de mayor riesgo.

La provincia de Chiriquí tiene ciertas características notables como la migración constante por ser una provincia con muchos sitios turísticos lo que aumenta el flujo migratorio, aparte de eso cuenta con regiones de bajos recursos socioeconómicas, zona de difícil acceso que la hacen susceptible a los casos de infección por TB y otros patógenos de importancia de salud pública como por ejemplo malaria y VIH/SIDA.

Al tener en cuenta estas problemáticas de salud pública, los pacientes con síntomas de TB son referidos al hospital público más cercano que cuenta con los insumos básicos o necesarios para atenderlos. En este escenario el HMIJDO, tiene la capacidad de realizar diagnósticos, pruebas moleculares y abordar tratamiento de los pacientes con TB. La aplicación de pruebas moleculares y diagnóstico mediante cultivo bacteriano permite el aislamiento de las cepas *M. tuberculosis* implicadas en los casos de TB. Este procedimiento facilita generar colecciones

de cepas de importancia epidemiológica y genómicos al momento de realizar análisis en mayor profundidad.

Con la necesidad de conocer la transmisión de cepas problemáticas o prevalentes del complejo *M. tuberculosis* dirigimos nuestro enfoque en el abordaje de análisis retrospectivo de una colección cepas colectadas en el HMIJDO, provincia de Chiriquí. La colección de 85 cepas del HMIJDO representa aproximadamente el 10% del total de los casos entre las tres regiones nivel del total de los casos de TB que recibe el hospital HMIJDO entre las 3 regiones (Bocas del Toro, Comarca Ngäbe-Buglé y Chiriquí).

De todos los casos reportados de TB durante los años 2017, 2019 y 2021, tuvimos acceso a 85 aislados repartidos entre las tres regiones como la provincia de Chiriquí Bocas del toro y la Comarca Ngäbe Buglé:

## **1- ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE ADN DE BACTERIANO**

Análisis de moleculares basadas en ADN requiere de máxima calidad e integridad del ADN al momento de aplicar algún método de extracción para este fin. La cantidad y calidad de ADN influye en los posteriores resultados (Downstream) durante el análisis de los resultados. En esta primera etapa nuestro punto de partida fue obtener la mayor cantidad de ADN posible utilizando método de extracción de CTAB. Se sabe que las técnicas de extracción de ADN son muy diversas y sobre todo adaptadas al tipo de microorganismos (bacterias, hongos o virus) que se deseé estudiar.

Se aplicó el método de extracción de ADN CTAB basado en solventes orgánicos, debido a que ofrece excelentes resultados y bajo costo (Huang, X., *et al.*, 2018). Tiene la capacidad de analizar Micobacterias que se caracterizan por su resistencia a nivel de membrana, proteínas y lípidos, (Wilson K., (2001).

El método de extracción aplicada en este estudio, permitió completar el objetivo en la extracción de ADN genómico de alta calidad en un tiempo estimado de 2 días, ya que decidimos dejar precipitando las muestras toda la noche para obtener mejor resultado, se analizaron un total de 85 cepas bacterianas, un número relativamente alto, es por ello que a pesar de ser una buena técnica para la extracción de ADN de micobacterias es remplazada por técnicas automatizadas (Tan, SC y Yiap, BC, 2009).

Por lo general las técnicas automatizadas tienen costo elevados y al tener esta característica decidimos utilizar una metodología más económica, de alto rendimiento y capaz de extraer el ADN micobacteriano que es lo que nos ofrece CTAB, por lo que fue aplicada en nuestra metodología.

Nuestro análisis de cuantitativo de ADN arrojó un promedio aproximado de 30 ng/ml y una absorbancia de 1.60 nm. Estos valores fueron aceptables durante la medición de acuerdo a los valores óptimos indicadas en el manual del equipo (Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers, 2010). Además, contrasta con estudio realizado por Amaro, A., et al, 2008 destaca una comparación entre diversas técnicas de extracción y que el método de extracción por CTAB demostró tener mejor rendimiento durante el análisis de ADN

En nuestro estudio, el valor mínimo durante la cuantificación de ADN fue de 0.01 ng/ml, estos valores bajos se debieron a la poca cantidad de cultivo o colonias de bacterias procesadas durante la extracción. Es notorio mencionar que la cantidad de ADN a extraer dependerá de la cantidad del material inicial de trabajo, por lo que es necesario almacenar una cantidad de material necesario de cultivos que pudieran ser de potencial estudio en posteriores estudios como es el caso de subcultivo, extracción de DNA, análisis de genoma completo y otros ensayos que pudieran ser de interés. Se sabe que mediante la PCR se puede obtener resultados con bajo número de copias (aproximadamente desde un mínimo de 1 ng/ul

ADN) por lo que su nivel de rendimiento dependerá la técnica utilizada (Serrato A., et al., SF).

Es de resaltar que las relaciones Absorbancias inferiores (260/280 nm) o menores a 1.0 indican probablemente la presencia de residuos orgánicos presentes, remoción inadecuada de agentes químicos utilizados durante la extracción por solventes. Además, resultado de muestras almacenadas por largos periodos de tiempo lo que disminuye el rendimiento a la integridad y el rendimiento de ADN (Chen, W. et al., 2018). En nuestro estudio, es indicativo que las muestras con baja cantidad o calidad de ADN fueron una limitante para el análisis de integridad genómico de ADN a nivel de electroforesis, un factor que era de esperarse por la baja cantidad del material y de cepas archivadas/almacenadas por largos periodos (Baoutina, A., et al., 2019)

Panamá no cuenta con un sistema de genotipado sistemático de casos de TB para caracterizar cepas de *M. tuberculosis* implicadas en la transmisión. En este sentido, análisis de genotipos de cepas de *M. tuberculosis* ofrece una oportunidad y desafío para generar nuevos conocimientos sobre este tema en la Provincia de Chiriquí. Estudios previos descritos en Panamá ha ayudado a generar datos útiles para los estudios sobre la transmisión y circulación de cepas en la población panameña. Se han aplicado herramientas y/o métodos capaces de genotipificar cepas de *M. tuberculosis*, por ejemplo, el uso de PCR de doble elemento repetitivo (DRE-PCR), (GTG)5-PCR (Rosas, S., et al., 2013), Secuenciación del genoma completo (Lanzas, F., et al., 2013), la aplicación de MIRU-VNTR y Spoligotyping (Sambrano, D., et al., 2014) y finalmente el diseño y aplicación de ASO-PCR (Domínguez J, Acosta F, et al. 2019) que es la herramienta más actual aplicada de forma eficaz, rápida, sencilla y de bajo costo.

Con el interés de implementar o utilizar una herramienta con características sencillas y que aporte información durante el análisis de genotipificación, nuestro análisis se basó en la aplicación de ASO-PCR específicas sobre las cepas archivadas en el HMIJDO. Una estrategia de análisis que ha sido útil para el análisis de muestras prospectivas implementada en la provincia de Panamá y Colón (Domínguez J, Acosta F, et al. 2019). Los datos sobre la transmisión y distribución de cepas *M. tuberculosis* y TB-MDR dentro de Panamá siguen siendo escasos, por lo que la herramienta ASO-PC puede cubrir esta limitación existente a nivel de estudios epidemiología de la TB. Además, en inducir al diagnóstico, abordar regiones o zonas específicas de Panamá, para mejorar el programa de vigilancia epidemiológica (Domínguez, J., Acosta, F., et al., 2019) (Pérez-lago, et al. 2015).

Al tener el conocimiento de lo anteriormente mencionado es que decidimos aplicar una metodología innovadora y diseñada específicamente para el análisis genotípico de *M. tuberculosis*.

## **2- IDENTIFICACIÓN DE CEPAS PREVALENTE MEDIANTE PCR ALELO ESPECIFICAS**

La PCR alelos específicos (ASO-PCR) es una técnica que pretende simplificar la vigilancia epidemiológica de los casos de TB. En este caso, dirigimos esfuerzos en su aplicación a los aislados de *M. tuberculosis* obtenidas en la provincia de Chiriquí (Panamá) con la finalidad de abordar otros entornos del país, proveer nuevos datos para mejorar la comprensión de la transmisión de la TB mediante el uso del método evaluado y diseñado previamente en Panamá y Colón (Domínguez, J., Acosta, F., et al., 2019). Con el objetivo de identificar la presencia de cepas de *M. tuberculosis* prevalentes y activa en la provincia de Chiriquí, aplicamos tres PCR específicas para identificar Cluster A (cepa linaje2, Beijing prevalente),

Cepa B (linaje4, Haarlem prevalente) y C (linaje4, LAM cepa de transmisión activa). Este estudio retrospectivo basada en PCR específicas se adapta a condiciones con recursos limitados de biología molecular y genómica, sin sistemas de vigilancia epidemiológicas, escasas condiciones de insumos y equipos en los laboratorios de centros de salud y hospitales como los que se ubican en la provincia de Chiriquí, por lo cual decidimos utilizar la ASO-PCR, diseñada para condiciones básicas de biología molecular y genética.

## **2.1. TRANSMISIÓN DE CEPAS A DE *M. TUBERCULOSIS* GENOTIPO**

### **BEIJING (LINAJE 2)**

La primera ASO-PCR aplicada tiene la capacidad de caracterizar genotípicamente cepas de *M. tuberculosis* del Linaje 2 genotipo Beijing. Este linaje geográficamente se distribuye por toda Asia, pero característicamente el genotipo bacteriano Beijing es considerado actualmente uno de los linajes más prevalentes de *M. tuberculosis* siendo reportado en diversos países en todo el mundo (Mokrousov I, 2016). Es de interés de estudio debido a que su prevalencia se debe a su alta trasmisibilidad y virulencia hasta el punto dispersarse por toda Latino América con gran adaptación a dicha población (Mokrousov I, 2016).

De acuerdo con Cerezo-Cortés, este genotipo Beijing tiene la capacidad de introducirse en un país de forma rápida, establecerse y adaptarse a la población a tal grado de coevolucionar con la población que infecta. En consecuencia, de este mecanismo, el genotipo se transmite con el tiempo a las poblaciones vecinas de cualquier país (Cerezo-Cortés, *et al.*, 2019).

Existen diversos países de latino América, con múltiples reportes de este genotipo bacteriano. Un estudio realizado en Perú brinda información de la prevalencia de esta cepa Beijing siendo la cepa de transmisión activa dentro de Perú y muestran su preocupación tal como (Mokrousov I, 2016) sobre la transmisión transnacional (Iwamoto, T., *et al.*, 2012).

En nuestro estudio pudimos destacar la presencia de 3 cepas correspondiente al genotipo Beijing, que representado el 3.5% del total de las muestras analizadas (n: 85). Un bajo porcentaje de genotipos en la colección si lo comparamos con la provincia de Colón, donde el genotipo Beijing llega a representar hasta 44.1% de los casos de TB en la provincia. Estudio realizado en San Luis Potosí (México) describen hallazgos similares de genotipo Beijing con una baja frecuencia del 1,3%, sugiriendo que los eventos de transmisión ocurrieron de forma independientes limita al área metropolitana de la capital (López-Rocha, *et al.*).

En nuestro estudio pudimos destacar la presencia de 3 cepas correspondiente al genotipo Beijing, que representado el 3.5% del total de las muestras analizadas (n: 85). Un bajo porcentaje de genotipos en la colección si lo comparamos con la provincia de Colón, donde el genotipo Beijing llega a representar hasta 44.1% de los casos de TB en la provincia. Estudio realizado en San Luis Potosí (México) describen hallazgos similares de genotipo Beijing con una baja frecuencia del 1,3%, sugiriendo que los eventos de transmisión ocurrieron de forma independientes limita al área metropolitana de la capital (López-Rocha, *et al.*).

En el caso de la provincia de Colón, la provincia es catalogada como una región de lento crecimiento a pesar de poseer un puertos y zonas de interconexión marítimo que atrae y atrae los migrantes de diferentes partes del mundo. A diferencia de Colón, la provincia de Chiriquí se ubica en el otro extremo, considerándose una “provincia del interior” que se

caracteriza por las condiciones de vida socio-económicas marcadamente distintas como las actividades de agricultura, agronomía y turismo, siendo un punto importante que destaca el por qué esta cepa no es predominante en Chiriquí. Aun así, sigue siendo una alarma para evaluar la epidemiología de la TB en Chiriquí, investigar a estos pacientes de genotipo Beijing y conocer su contacto con la población de Panamá y Colón y, evaluar si es un caso de transmisión independiente como ha ocurrido en otros entornos (López-Rocha, et al.,)

La importancia de realizar este análisis epidemiológico dirigido a los pocos pacientes identificados genotípicamente con la cepa Beijing en la provincia de Chiriquí romper cadenas de transmisión de TB (persistente), reducir la aparición de casos y proveer datos que sirvan de base en la mejora y fortalecimiento de diagnóstico de TB en la región. La aparición de los genotipos Beijing predispone al aumento de casos de TB cuando la transmisión es persistente. Estudio realizado por Pérez-Lago y colaboradores, describen el aumento extensivo/rápido de la cepa Beijing en isla de Gran Canaria, España, luego de ser reportada por primera vez (1992), después de la aparición del primer caso, la cepa Beijing se extendió por las islas vecinas alcanzando una alta representatividad en ellas (11-32%) y que actualmente representa el 21% de todos los aislados en la isla de Gran Canarias .A demás, dada a la ventaja que ofrece la ASO-PCR, permitió realizar análisis prospectivo y retrospectivo para el seguimiento de la transmisión de cepas de *M. tuberculosis* Beijing( Pérez-Lago, *et al.*, 2019).

## **2.2 TRANSMISIÓN DE CEPAS B Y C DE *M. TUBERCULOSIS* LINAJE 4**

La segunda ASO-PCRs aplicada tiene la capacidad de caracterizar genotípicamente cepas B de transmisión prevalente y cepa C de *M. tuberculosis* de transmisión activa del Linaje 4. Nuestro estudio permitió identificar 2 cepa B (Haarlem), representado el 2.3 %, mientras que la cepa C (LAM) fue del el 5.8 % del total de 85 muestras analizadas. Estos resultados

demuestran que los genotipos de las cepas B y C se transmiten en baja frecuencia en la zona occidental. Esto sugiere la presencia de otras cepas y genotipos que pudieran estar implicadas en los casos de TB. La aplicación de técnicas epidemiológicas como la MIRU-VNTR provee información precisa para identificar Cluster dominante en la población por lo que, sería útil aplicar para descifrar la proporción de Cluster y genotipos dominantes lo que facilitaría determinar cepas de transmisión prevalentes y activas de los aislados provenientes en la provincia de Chiriquí.

En otros países se confirma la amplia distribución de estos dos genotipos en Latino América, por ejemplo, en Colombia se destacan el genotipo Haarlem (25,8 %) y LAM (54,8 %) (García D, Astudillo M., 2019). En otros países como Brasil estos dos genotipos son encontrados con mayor porcentaje de prevalencia, la proporción es distribuida de tal manera que LAM (60,3%) y Haarlem (7,9%) son considerados los genotipos más comunes identificadas en Brasil y toda Latino América (Verza, M., *et al.*, 2020).

Por otro lado, en Chile el Linaje 4 representa el 88,21% de todos los genotipos desglosados en LAM (40,61%), T (34,06%) y Haarlem (13,54%). Algo parecido a la estructura epidemiológica de *M. tuberculosis* del resto de países Latinoamericanos Lagos, J., *et al.*, 2016). De acuerdo a lo mencionado por Demay C., confirma que los genotipos Haarlem y LAM del Linaje 4 son los miembros más comúnmente observados en América del Sur, América Central y el Caribe aparte de estar distribuidos en Europa y África Central (Demay C., *et al.*, 2012) Teniendo en cuenta esto es lógico a ver encontrado en mayor proporción el genotipo Haarlem y LAM en este estudio, por lo que se puede tener certeza de que el linaje 4 está distribuido en toda América y nivel mundial; y que todos los aislados analizados en diversos estudios incluyendo este se van a detectar los genotipos Haarlem y LAM.

### **3. NO IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PREVALENTE DEL A, B Y C**

En cuanto al resto de las muestras que no se clasificaron en Cluster A, Cluster B y Cluster C, la razón es atribuida a que los amplicones visualizados en el gel eran distintos al control positivo del Cluster A para identificar cepas de dicho Cluster del L2-genotipo Beijing, y así mismo, los amplicones eran diferentes a cepas del Cluster B para identificar L4-genotipo Haarlem y cepas del Cluster C para L4-genotipo LAM por lo que no se pudieron identificar el genotipo de *M. tuberculosis*, por lo tanto, tampoco se conoce el linaje, Pero existe la seguridad que son cepas de la especie de *M. tuberculosis* ya que sus amplificaciones eran iguales a la cepas modelo H37Rv.

No se pudo determinar la identidad genotípica de estas cepas ya que el análisis se hizo especialmente para 3 cepas de mayor prevalencia descrito previamente en Colón y Panamá, responsables de los casos de TB (Domínguez J., Acosta F., *et al.*, 2019). Dando como resultado que la provincia de Chiriquí posee poca información genotipos de casos de TB, al igual que el resto de las provincias de Panamá. Por lo que, importante realizar genotipado basadas en MIRU-VNTR y descifrar la epidemiología de la TB en Chiriquí.

Haciendo un análisis descriptivo y una comparativa con los resultados obtenidos, éstos concuerdan con los datos epidemiológicos a nivel mundial, pues encontramos cepas pertenecientes al linaje 4 Euro-Americano distribuido ampliamente en América, y reportado en América latina como en México, Brasil, Perú, Ecuador, etc. Y en América central como Colombia, Costa Rica etc. Y reportado en Panamá y ahora, en la provincia de Chiriquí Pero, de acuerdo a la hipótesis planteada, con los resultados obtenidos rechazamos la hipótesis nula de que la epidemiología de la TB de la provincia de Chiriquí es igual que el resto de la República de Panamá, por el contrario se acepta la hipótesis alterna, puesto que con los

resultados obtenidos se demuestra que la epidemiología de la provincia de Chiriqués diferente que el resto de las provincias de Panamá, dichos resultados, indican que no tenemos las mismas cantidades de cepas de linajes reportados como para considerar que la epidemiología es igual, como lo es el registro de la cepa Beijing en la provincia de Panamá y Colón.

Sin embargo, los resultados plasmados en esta investigación son de gran interés ya que permite: 1) identificar la transmisión de cepas de *M. tuberculosis* implicados en los casos de TB Chiriquí con el resto de las provincias de Panamá, 2), que sienta las bases para futuras investigaciones de genotipos y análisis de genomas de las cepas en mayor profundidad y 3), nuestro hallazgo provee nuevo conocimiento para entender la epidemiología de la TB en la provincia de Chiriquí y el resto de las provincias de Panamá. Además, proporciona datos para las instituciones tomadoras de decisiones con la finalidad de mejorar y fortalecer el diagnóstico, tratamiento y vigilancia de la TB en la región.

En esta investigación se refleja notablemente la importancia de realizar genotipado de cepas, de realizar colección de aislados de cepas para estudio presentes y futuras para realizar estudios sistemáticos de casos de TB debido a que permite seguir en el tiempo las fortalezas y debilidades en el programa de control de los casos de TB de alta transmisión, sin la microbiología no habríamos podido ejecutar tal investigación, ya que de las metodologías y técnicas microbiológicas pudimos adquirir la bacteria mediante cultivo *M. tuberculosis* y biobanco de cepas.

La razón de la presencia de TB en Panamá y sus provincias, aún no concreta, sin embargo, existen muchas razones lógicas, si retomamos el principio de la República de Panamá, nos daremos cuenta que con la construcción del canal de Panamá se desencadenó principalmente por el flujo migratorio más grande de nuestro país, con la llegada de trabajadores extranjeros,

aparte de eso, la desencadenante ola de enfermedades infecciosas como el dengue, fiebre amarilla, etc., (Rosas, S., *et al.*, 2013). Una de las enfermedades más mortíferas registradas desde esa época fue la TB. Desde aquel entonces no se ha podido controlar esta enfermedad infecciosa prevenible y curable. Por periodos se ha mantenido controlada, pero en los últimos años, hasta la actualidad se ha visto el aumento de esta enfermedad, durante el año 2019 y 2020 por inicio y perduración de la pandemia se vio opacada, pero gracias a las investigaciones realizadas por diversas entidades como INDICASAT-AIP, OPAT, MINSA, CSS, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud; dieron a conocer la gravedad y problemática que está pasando el país con los altos casos de infecciones por TB, nuevos casos de TB, y sobre todo los casos de MDR que de manera complicada llevan a la muerte si no es tratable el paciente.

En cuanto a las razones actuales, la principal causa de la prevalencia de la TB, se les atribuye a las condiciones socio-ambientales y la calidad de vida de las personas. En el caso de Chiriquí, esta provincia cuenta con zonas desatendidas, la causa es por el difícil acceso a estas regiones, como consecuencia se limitan los estudios, los suministros básicos de alimentación provocando desnutrición, la limitación del agua potable que le impiden tener una buena higiene personal y ambiental puede predisponer al aumento de otras micobacterias que son aquellas especies de *Mycobacterium* no tuberculosas causantes de tuberculosis pulmonar (López, A., Acosta, F., 2021).

La zona más característica con los puntos previamente mencionados, son la Comarca y las zonas aledañas a esta. La Comarca Ngäbe Buglé cuenta con una población de 213, 860 habitantes, toda esta población no recibe los beneficios de salud necesarios, no se cuenta con un complejo médico moderno, el centro de salud de esta zona no cuenta con los equipamientos necesarios para diagnosticar la TB, no cuentan con pruebas microbiológicas

ni diagnóstico por PCR, es por ellos que solo unos cuantos de esta población tiene las facilidades de viajar al HMIJDO para recibir la atención médica y diagnóstico confiable.

Nuestro estudio demuestra que, de las 85 muestras analizadas, solo 12 correspondían a la Comarca, pero esto no indica que hay unos pocos casos de TB en esa población, si hacemos una comparación con la información actualizada por parte del HMIJDO, nos damos cuenta que la TB es la principal causa de ingresos al Hospital por parte de todas las edades. Pero, si nos enfocamos en la población infantil, estos son los más afectados.

También existe otra problemática, que es la falta de medicamentos o fármacos específicos para cada paciente, lo cual corresponde un tema de gran importancia, tanto que es considerado una problemática en Chiriquí, el resto del País panameño y el mundo entero debido a que la falta de tratamiento o el mal uso de ellos aumentan las posibilidades de cepas drogoresistente.

En nuestro estudio pudimos identificar de 5 cepas con drogoresistencia que se desglosan en 2 cepas Monoresistente a Rifampicina e Isoniacida, y 3 cepas MDR. La casuística se divide en dos partes, 1- la falta de medicamentos condicionados a cada paciente, 2-la discontinuidad que le da el paciente al programa antituberculoso. Como es notable, esto se suma a las dificultades presentes para erradicar los casos de TB, por lo que es de suma importancia abordar esta problemática y así conocer cuáles cepas de M. tuberculosis son MDR.

Anteriormente la provincia de Chiriquí no había sido objeto de estudio como otras provincias de Panamá con respecto al análisis epidemiológico de la TB, es por ello que la información brindada en esta investigación es de gran importancia tanto para la provincia, el país como a nivel nacional ya que aporta conocimiento actualizada de la bacteria y sus características microbiológicas y las medidas en que se debe diagnosticar haciendo un llamado sobre las

instalaciones de salud que aún no tenemos, aparte, sabemos de forma preliminar los linajes y genotipos que circulan y que aún falta por conocer.

Finalmente, como es parte del proceso investigativo, surgieron ciertas limitaciones en el trascurso de este estudio como las cepas limitadas proporcionadas por el HMIJDO a causa de la pandemia por COVID-19 que detuvo el flujo de trabajo en el área de microbiología para la detección de TB y complicar la logística de envío de cepas. Además, durante la investigación nos percatamos el bajo contenido de muestras que limitaban repetir tanto el análisis molecular como el genómico.

Para finalizar, durante el análisis de la ASO-PCR detectamos cepas mixtas, es decir que un paciente contiene una infección que involucran más de una cepa o la coexistencia de variantes por más de un genotipo y como consecuencia pueden tener un alto riesgo y malos resultados del tratamiento antituberculoso (Kargarpour Kamakoli, et al., 2020).

Al detectar estas cepas mixtas ocasionó una problemática en la caracterización genotípica, puesto que para poder resolver el problema se debía de contar con el medio de cultivo bacteriano lo cual no teníamos, por ende, no pudimos realizar el análisis de colonias individuales ni realizar diluciones en serie del inóculo en agar 7H11 y mucho menos pudimos realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

**CAPÍTULO V**  
**CONSIDERACIONES FINALES**

## **CONCLUSIONES**

Este estudio permitió evidenciar la distribución de los linajes de aislamientos del complejo bacteriano de *M. tuberculosis* donde se lograron identificar 10 cepas de *M. tuberculosis* distribuidas en la población de la provincia de Chiriquí y regiones cercanas de Bocas del Toro y Comarca Ngäbe Buglé; cepas encontradas de mayor transmisión descrita previamente en Panamá y Colón.

Con la información obtenida de los resultados de esta investigación se puede evidenciar que el Linaje 4 de *M. tuberculosis* es el de mayor transmisibilidad en la provincia de Chiriquí, donde se destaca la presencia del genotipo LAM.

Finalmente, no encontramos en la colección analizada de la provincia de Chiriquí la misma proporción de cepas problemáticas que en el caso de la provincia de Panamá y Colón, posiblemente por la diferencia de entornos, diversas condiciones de vida, zona ambiental y cultural que lo hace limitante a que esa cepa se disperse.

## **RECOMENDACIONES**

Es necesario la continuidad de este estudio utilizando otras herramientas de biología molecular y genómica que permita la genotipificación del resto de las cepas. Por ejemplo, en la siguiente etapa se podría aplicar método de epidemiología molecular basada en MIRU-VNTR para caracterizar genotipos y Cluster de cepas que no forman parte de la cepa analizada de la Provincia de Chiriquí.

Se debe invertir más conocimiento, esfuerzo y dinero para realizar un análisis a nivel de genoma completo realizado en los laboratorios locales para conocer a fondo cepas o Cluster de mayor riesgo o transmisión en Chiriquí y en la comarca Ngäbe-Buglé y así tener una base sólida sobre la epidemiología de la TB de estas regiones.

Finalmente, también es recomendable implementar estrategias de diagnóstico microbiológico, junto con las herramientas de vigilancia epidemiológica de cepas de mayor transmisión de *M. tuberculosis* en Chiriquí y la Comarca Ngäbe-Buglé.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO M. GUÍA PARA LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADO. Obtenido de: [https://bib.us.es/derechoytrabajo/sites/bib3.us.es.derechoytrabajo/files/guia\\_para\\_elaborar\\_un\\_trabajo\\_final\\_de\\_grado\\_1.pdf](https://bib.us.es/derechoytrabajo/sites/bib3.us.es.derechoytrabajo/files/guia_para_elaborar_un_trabajo_final_de_grado_1.pdf)
- Daros W. 2002. ¿Qué es un marco teórico? Enfoques, vol. XIV. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/259/25914108.pdf>
- OMS, 2020 Informe Mundial sobre la Tuberculosis 2020. Obtenido de: Informe Mundial sobre la Tuberculosis 2020 (who.int)
- Kremer, K., Glynn, J. R., Lillebaek, T., Niemann, S., Kurepina, N. E., Kreiswirth, B. N., Bifani, P.J., & van Soolingen, D. (2004). Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacterium tuberculosis on the basis of genetic markers. *Journal of clinical microbiology*, 42(9), 4040–4049. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4040-4049.2004>
- Bañuls, A. L., Sanou, A., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
- Mathema, B., Andrews, JR, Cohen, T., Borgdorff, MW, Behr, M., Glynn, JR, Rustomjee, R., Silk, BJ y Wood, R. (2017). Factores impulsores de la transmisión de la tuberculosis. *Revista de enfermedades infecciosas*, 216 (supl\_6), S644 – S653. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix354>
- Turner, RD, Chiu, C., Churchyard, GJ, Esmail, H., Lewinsohn, DM, Gandhi, NR y Fennelly, KP (2017). Infecciosidad por tuberculosis y susceptibilidad del huésped. *Revista de enfermedades infecciosas*, 216 (supl\_6), S636 – S643. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix361>
- Murillo-Godínez, G., (2009). Las gotitas de Flüge. *Revista Med Inst Mex Seguro Soc* 2009; 47(3):290. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2009/im093j.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (2016). Informe mundial sobre la tuberculosis 2016. Disponible en: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
- Barberis, I., Bragazzi, NL, Galluzzo, L. y Martini, M. (2017). La historia de la tuberculosis: desde los primeros registros históricos hasta el aislamiento del bacilo de Koch. *Revista de medicina preventiva e higiene*, 58 (1), E9–E12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432783/>
- Valderrama, R. (2014). Robert Koch entre caldos, gelatinas, tinciones y bacilos: Crónica de un acontecimiento. *Hechos Microbiol.* 2013; 4(1); 61-83.
- MORENO ALTAMIRANO, LAURA. (2004). DESDE LAS FUERZAS MÁGICAS HASTA ROBERTO KOCH: UN ENFOQUE EPIDEMIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(2), 117-125. Recuperado en 16 de diciembre de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-75852004000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000200008&lng=es&tlng=es).
- González-Martin. J. (2014). Microbiología de la tuberculosis. *Semin Fund Esp Reumatol.* 2014;15(1):25–33
- DATABiO (2012). Mycobacterium tuberculosis, Fichas de agentes biológicos. <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Mycobacterium+tuberculosis.pdf/9d648564-f9f0-41ff-9ae96c7af638bb52?version=1.0&t=1528734433284#:~:text=Son%20bacilos%20Gram%20positivo%2C%20C3%A1cido,la%20tuberculosis%20humana%20m%C3%A1s%20frecuente.>
- P. Coll, D. García de Viedma (2018). *Epidemiología molecular de la tuberculosis*. Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- ORAS – CONHU (2018). MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. PARTE 1: MANUAL DE ACTUALIZACIÓN DE LA BACILOSCOPIA/Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas”.
- Fernández de Vega, F., Moreno J., González Martín, J., Palacios Gutiérrez, J. (2005). *Micobacterias. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/s-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
- OPS (2020). TUBERCULOSIS EN LAS AMÉRICAS. INFORME REGIONAL 2020.

[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55047/9789275324479\\_spa.pdf?sequence=1](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55047/9789275324479_spa.pdf?sequence=1)

- OPS (2021). Ministerio de Salud en Panamá avanza con Control de la Tuberculosis, nueva hoja de ruta propone iniciativa en grandes ciudades con el apoyo de OPS/OMS. <https://www.paho.org/es/noticias/17-9-2021-ministerio-salud-panama-avanza-control-tuberculosis-nueva-hoja-ruta-propone>
- OPS (1933). Mortalidad debida a la tuberculosis en la ciudad de Panamá. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/10270>
- MINSA, 2017. Indicadores Básicos de Salud.
- Tarajia, M., & Goodridge, A. (2014). Tuberculosis remains a challenge despite economic growth in Panama. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 18(3), 286–288. <https://doi.org/10.5588/ijtld.13.0534>
- Perez-Lago L, Comas I, Navarro Y, Gonzalez-Candelas F, Herranz M, Bouza E, et al. Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis*. 2014;209:98-108
- Domínguez, J., Acosta, F., Pérez-Lago, L., Sambrano, D., Batista, V., De La Guardia, C., Abascal, E., Chiner-Oms, Á., Comas, I., González, P., Bravo, J., Del Cid, P., Rosas, S., Muñoz, P., Goodridge, A., & García de Viedma, D. (2019). Simplified Model to Survey Tuberculosis Transmission in Countries Without Systematic Molecular Epidemiology Programs. *Emerging infectious diseases*, 25(3), 507–514. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181593>
- Plata-Casas, L., Gutiérrez-Lesmes, Ó., & Herrán-Falla, Ó. (2018). Tuberculosis and human immunodeficiency virus coinfection: Epidemiological situation in the department of Meta, 2010- 2015. *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 38(0), 68–79. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3930>.
- CEPAL (2022). Panorama Social de América Latina 2021. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/47718>.
- Shao Y, Song H, Li G, Li Y, Li Y, Zhu L, Lu W y Chen C (2021) Recaída o reinfección, la situación de la tuberculosis recurrente en el este de China. Parte delantera. *Célula. Infectar. Microbiol*. 11:638990. doi: 10.3389/fcimb.2021.638990 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.638990/full>
- Afshar, B., Carless, J., Roche, A., Balasegaram, S., & Anderson, C. (2019). Surveillance of tuberculosis (TB) cases attributable to relapse or reinfection in London, 2002–2015. *PloS one*, 14(2), e0211972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211972>
- Gadoev, J., Asadov, D., Harries, A. D., Parpieva, N., Tayler-Smith, K., Isaakidis, P., Ali, E., Hinderaker, S. G., Ogtay, G., Ramsay, A., Jalolov, A., & Dara, M. (2017). Recurrent tuberculosis and associated factors: A five - year countrywide study in Uzbekistan. *PloS one*, 12(5), e0176473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176473>
- Chimusa, E. R., Zaitlen, N., Daya, M., Möller, M., van Helden, P. D., Mulder, N. J., Price, A. L., & Hoal, E. G. (2014). Genome-wide association study of ancestry-specific TB risk in the South African Coloured population. *Human molecular genetics*, 23(3), 796–809. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt462>
- Bloom, B. R., Atun, R., Cohen, T., Dye, C., Fraser, H., Gomez, G. B., Knight, G., Murray, M., Nardell, E., Rubin, E., Salomon, J., Vassall, A., Volchenkov, G., White, R., Wilson, D., & Yadav, P. (2017). Tuberculosis. In K. K. Holmes (Eds.) et. al., *Major Infectious Diseases*. (3rd ed.). The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525174/>
- Morán López, Elena, & Lazo Amador, Yaima. (2001). Tuberculosis. *Revista Cubana de Estomatología*, 38(1), 33-51. Recuperado en 16 de marzo de 2022 de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003475072001000100005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475072001000100005&lng=es&tlng=es)
- Ravimohan, S., Kornfeld, H., Weissman, D., & Bisson, G. P. (2018). Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 27(147), 170077. <https://doi.org/10.1183/16000617.0077-2017>
- Hunter R. L. (2011). Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 91(6), 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.03.007>
- Asamblea General de las Naciones Unidas. Reunión de Alto Nivel sobre Resistencia a los Antimicrobianos. 2016. [www.un.org/pga/71/event-latest/high-level-meeting-on-antimicrobial-resistance/](http://www.un.org/pga/71/event-latest/high-level-meeting-on-antimicrobial-resistance/) Fecha de último acceso: 22 de abril de 2020. [ Lista de referencia ]
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020) Directrices consolidadas de la OMS sobre tuberculosis Módulo 4: Tratamiento Tratamiento de la tuberculosis resistente a los medicamentos . Ginebra, OMS, 2020.
- TDR. Paquete de investigación SORRT. Ginebra, Organización Mundial de la Salud y Programa Especial de Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales, 2020. [https://www.who.int/tdr/research/tb\\_hiv/shorrt/en/](https://www.who.int/tdr/research/tb_hiv/shorrt/en/)

- OMS (2022) Día Mundial de la Tuberculosis, Invirtamos en poner fin a la TB. Salvemos vidas. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-tuberculosis-2022>
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B. C., Narayanan, S., Nicol, M., Niemann, S., Kremer, K., Gutierrez, M. C., Hilty, M., Hopewell, P. C., & Small, P. M. (2006). Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2869–2873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511240103>
- MINSA, OMS (2017). NORMA TÉCNICA NACIONAL PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS [https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/programas/10sept\\_norma\\_tb\\_digital.pdf](https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/programas/10sept_norma_tb_digital.pdf)
- Boldú, J., Cebollero, P., Abu, J., & Prado, A. de. (2007). Tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(Supl. 2), 99-115. Recuperado en 16 de marzo de 2022, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S113766272007000400008&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272007000400008&lng=es&tlng=es).
- Rojas Jaimes J, Giraldo-Chavez J, Huyhua-Flores Y, Caceres-Nakiche T. Identificación de micobacterias en medio solido mediante microscopía de fase invertida y tinción Ziehl-Neelsen. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(2):279-84. doi:10.17843/rpmesp.2018.352.3471
- Rojas Jaimes J, Giraldo-Chavez J, Huyhua-Flores Y, Caceres-Nakiche T. (2018). Identificación de micobacterias en medio solido mediante microscopía de fase invertida y tinción Ziehl- Neelsen. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(2):279-84. doi:10.17843/rpmesp.2018.352.3471. Recuperado en 21 de marzo de 2022, de [https://www.researchgate.net/publication/326618264\\_Identificacion\\_de\\_micobacterias\\_en\\_medio\\_solido\\_mediante\\_microscopia\\_de\\_fase\\_invertida\\_y\\_tincion\\_Ziehl-Neelsen](https://www.researchgate.net/publication/326618264_Identificacion_de_micobacterias_en_medio_solido_mediante_microscopia_de_fase_invertida_y_tincion_Ziehl-Neelsen)
- Hong, X., & Hopfinger, A. J. (2004). Molecular modeling and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell wall permeability. *Biomacromolecules*, 5(3), 1066–1077. <https://doi.org/10.1021/bm0345155>
- Vincent AT, Nyongesa S, Morneau I, Reed MB, Tocheva EI y Veyrier FJ (2018) The Mycobacterial Cell Envelope: ¿Una reliquia del pasado o el resultado de una evolución reciente?. *Parte delantera. Microbiol*. 9:2341. doi: 10.3389/fmicb.2018.02341
- Marrakchi, H., Lanéelle, M. A., & Daffé, M. (2014). Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & biology*, 21(1), 67–85. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>
- Stres, B. y Kronegger, L. (2019). Cambio de paradigma hacia la microbiología de última generación. *Cartas de microbiología FEMS*, 366 (15), fnz159. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz159>
- Fauci, A. S., & Morens, D. M. (2012). The perpetual challenge of infectious diseases. *The New England journal of medicine*, 366(5), 454–461. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1108296>
- McArthur DB (2019). Enfermedades infecciosas emergentes. *Clínicas de enfermería de América del Norte*, 54 (2), 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.006>
- Sanou, A., Bañuls, A.-L., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology*. Recuperado el 30 de marzo de 2022 <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000171> <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
- OPS, 2021 Resistencia a los antimicrobianos. [https://www.paho.org/es/temas/resistencia- antimicrobianos](https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos) Recuperado el 30 de marzo de 2022
- OMS, 2020. Datos y cifras de la resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> Recuperado el 30 de marzo de 2022.
- MINSA y OPS. 2021. NORMA PARA EL MANEJO CLÍNICO DEL PACIENTE CON DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS DROGORESISTENTE. 1ra. EDICIÓN
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544 (1998). <https://doi.org/10.1038/31159>
- Dorrnsoro, I., & Torroba, L.. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(Supl.2), 67-85. Recuperado en 03 de abril de 2022, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S113766272007000400006&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272007000400006&lng=es&tlng=es)
- OMS, 2021 Datos claves de la tuberculosis <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis#:~:text=Se%20calcula%20que%20una%20cuarta,ni%20pueden%20transmitir%20la%20infecci%C3%B3n>
- Fu, L. M., & Fu-Liu, C. S. (2002). Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial

- pathogens?. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland), 82(2-3), 85–90. <https://doi.org/10.1054/tube.2002.0328>
- Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, LT, Vollmer, W., Keep, NH y Bhakta, S. (2019). Peptidoglicano de la pared celular en *Mycobacterium tuberculosis*: un talón de Aquiles para el patógeno que causa la tuberculosis. *Revisiones de microbiología de FEMS*, 43 (5), 548–575. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz016>
- Castillo R., 2022. Tuberculosis, retos presentes y futuros para Panamá [Webinar] Hospital materno infantil José Domingo de Obaldía & Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá <https://we.tl/t-NNE1pbPEAT>
- OPS, 2017. Control de la Tuberculosis en Grandes Ciudades de Latinoamérica y el Caribe. Lecciones Aprendidas <https://iris.paho.org/handle/10665.2/33988>
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-Gerdes S, Willery E. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01392-06>
- Doyle, J. (1990). DNA PROTOCOLS FOR PLANTS. NATO ASY Series, 283-284.
- Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19:11–15.
- Iglesias Andreu, Lourdes & Luna-Rodríguez, M. & Domínguez, Rocío. (2003). DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN ÓPTIMO PARA EL DESARROLLO DE LA TÉCNICA RAPD EN MEGAGAMETOFITOS DE *Pinus hartwegii* Lindl.
- Yaxsier de Armas, Virginia Capó, Efraín González, Lilian Mederos, Raúl Díaz. 2006. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante <http://www.patologia.es/volumen39/vol39-num3/pdf%20patologia%2039-3/39-03-07.pdf>
- Pérez-Lago, L., Izco, S., Herranz, M., Tudó, G., Carcelén, M., Comas, I., Sierra, O., González-Martín, J., Ruiz-Serrano, M. J., Eyene, J., Bouza, E., & García de Viedma, D. (2017). Una nueva estrategia basada en la genómica y la PCR específica revela cómo una cepa multirresistente de *Mycobacterium tuberculosis* se hizo prevalente en Guinea Ecuatorial 15 años después de su aparición. *Microbiología clínica e infección: la publicación oficial de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*, 23(2), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.10.006>
- Fatima, S., Kumari, A., Das, G., & Dwivedi, V. P. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life sciences*, 252, 117594. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117594>
- Mangtani, P., Abubakar, I., Ariti, C., Beynon, R., Pimpin, L., Fine, P. E., Rodrigues, L. C., Smith, P. G., Lipman, M., Whiting, P. F., & Sterne, J. A. (2014). Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical infectious diseases and official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(4), 470–480. <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>
- Kumate, J, Gutiérrez, G: Tuberculosis e infecciones por micobacterias atípicas. In: *Infectología Clínica*, ed. Mendez, pp. 131-147. 2008
- Parwati, I, van Crevel, R., & van Soolingen, D. (2010). Posibles mecanismos subyacentes para la aparición exitosa de las cepas del genotipo *Mycobacterium tuberculosis* Beijing. *The Lancet. Enfermedades infecciosas*, 10(2), 103–111. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70330-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70330-5)
- Rodríguez D, Juan C. (2012). Tuberculosis latente. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 28 (1), 61-68. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482012000100009> Maritza Angarita MerchánI, María Inés Torres CaicedoII, Andrea Katherine Díaz Torres. 2017. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura.
- Brock TD. *Biology of microorganisms, USA*, Prentice Hall (1998)
- Martínez Abreu J. Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, un tema de interés para todos. *Rev Méd Electrón [Internet]*. 2014 Sep-Oct [citado: fecha de acceso];36(5). Disponible en: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202014/vol5%202014/tema01>
- OPS.2022 Enfermedades Transmisibles. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-transmisibles>
- Borrego Juan. 2018. La Microbiología en sellos. VIII. Robert Koch: El triunfo de la perseverancia (I). Recuperado de: <https://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmfiles/koch.pdf> Obtenido el 11 de abril de 2022.
- Bergey, & Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Williams an Wilkins. van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M. J., Simeone, R., Brosch, R., & van Soolingen, D. (2012).

- Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases*, 18(4), 653–655. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110888>
- Chernick V. (2004). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Pediatric pulmonology*, 38(1), 1. <https://doi.org/10.1002/ppul.20085>
- Mantzana-Oikononaki, V., Maan, M. y Sabino-Pinto, J. (2021). Detección de patógenos en vida silvestre: evaluación de protocolos alternativos de extracción de ADN. *Métodos y protocolos de biología*, 6 (1), bpab018. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpab018>
- Gomez, D. I., Mullin, C. S., Mora-Guzmán, F., Crespo-Solis, J. G., Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B., & Restrepo, B. I. (2011). Rapid DNA extraction for specific detection and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in sputum specimens using Taqman assays. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 91 Suppl 1, S43–S48. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.10.009>
- Thompson Bonilla MR, Calderón Rosete G, Moreno Sandoval HN, Merino García JL, Lara Lozano M, Piña Leyva C. 2014. Epidemiología molecular de infecciones por micobacterias en pacientes del Hospital Regional 1° de Octubre. *Rev Esp Med Quir* 2014;19:80-87. <https://www.redalyc.org/pdf/473/47330738012.pdf>
- PARISACA MAMANI, SANDRA, BAUTISTA, ANGELA, & VASQUEZ MICHEL, ANETH. (2015). Comparación del rendimiento del medio de cultivo Löwenstein-Jensen in house y Löwenstein-Jensen comercial, para el aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista CON-CIENCIA*, 3(1), 69-76. Recuperado en 14 de abril de 2022, de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S231002652015000100008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S231002652015000100008&lng=es&tlng=es)
- Valencia-Aguirre, Salomé, Arroyave, Ivan, & García-Basteiro, Alberto L.. (2022). Nivel educativo y mortalidad por tuberculosis en Colombia: desigualdades crecientes y estancamiento en la reducción. *Cadernos de Saúde Pública*, 38 (1), e00031721. Epub 31 de enero de 2022. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00031721>
- Mata-Azofeifa, Zeidy, & Baraquiso-Pazos, Maribel. (2020). Análisis de la mortalidad por tuberculosis, en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 62 (3), 126-129.
- Fontalvo Rivera, Dilia & Gómez Camargo, Doris. (2015). Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Médicas UIS*, 28 (1), 39-51. Recuperado el 14 de abril de 2022, de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012103192015000100004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012103192015000100004&lng=en&tlng=es)
- Pérez-Lago, L., Comas, I., Navarro, Y., González-Candelas, F., Herranz, M., Bouza, E., & García- de-Viedma, D. (2014). Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *The Journal of infectious diseases*, 209(1), 98–108. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit439>
- Huang, X., Duan, N., Xu, H., Xie, T. N., Xue, Y. R., & Liu, C. H. (2018). *Molekuliarnaia biologiiia*, 52(4), 718–726. <https://doi.org/10.1134/S0026898418040080>
- Wilson K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 2, .<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>
- Şahin, F., Kıyan, M., Karasartova, D., Çalgın, M. K., Akhter, S., & Türegün Atasoy, B. (2016). Nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılmak üzere, gram-pozitif bakteriler ve mikobakterilerin hücre duvarlarının ortadan kaldırılmasında yeni bir yöntem: Kum yöntemi [A new method for the disruption of cell walls of gram-positive bacteria and mycobacteria on the point of nucleic acid extraction: sand method]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 50(1), 34–43. <https://doi.org/10.5578/mb.10685>
- Tan, SC y Yiap, BC (2009). Extracción de ADN, ARN y proteínas: el pasado y el presente. *Revista de biomedicina y biotecnología*, 2009, 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Loeffler J, Schmidt KD, Hebart H, Einsele H. Extracción automatizada de ácidos nucleicos. *Enciclopedia de Genómica y Proteómica*. 2004: 93–96.
- Sambrook J, Russel D. Clonación molecular: un manual de laboratorio . 3ra edición. vol. 1. Nueva York, NY, EE. UU.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001
- Mokrousov I, Vyazovaya A, Iwamoto T, et al. Linaje latinoamericano-mediterráneo de *Mycobacterium tuberculosis*: rastros humanos a través de la filogeografía de patógenos . *Mol Phylonet Evol* . 2016; 99 :133–143.
- Cerezo-Cortés, MI, Rodríguez-Castillo, JG, Hernández-Pando, R., & Murcia, MI (2019). Circulación del genotipo Beijing de *M. tuberculosis* en América Latina y el Caribe. *Patógenos y salud global*, 113 (8), 336–351. <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1710066>

- López-Rocha, E., Juárez-Álvarez, J., Riego-Ruiz, L., Enciso-Moreno, L., Ortega-Aguilar, F., Hernández-Nieto, J., Enciso-Moreno, J. A., & López-Revilla, R. (2013). Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México. *BMC research notes*, 6, 172. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-172>
- Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers (2010) Nucleic Acid. <https://www.thermofisher.com/documentconnect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCAD%2Fmanuals%2Fts-nanodrop-nucleicacid-olvr2.pdf>
- Chen, W. C., Kerr, R., May, A., Ndlovu, B., Sobalisa, A., Duze, S. T., Joseph, L., Mathew, C. G., & Babb de Villiers, C. (2018). The Integrity and Yield of Genomic DNA Isolated from Whole Blood Following Long-Term Storage at -30°C. *Biopreservation and biobanking*, 16(2), 106–113. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0050>
- Baoutina, A., Bhat, S., Partis, L., & Emslie, K. R. (2019). Storage Stability of Solutions of DNA Standards. *Analytical chemistry*, 91(19), 12268–12274. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02334>
- Rosas, S., Bravo, J., Gonzalez, F., de Moreno, N., Sanchez, J., Gavilan, RG, & Goodridge, A. (2013). Altas tasas de agrupamiento de genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes en Panamá. *BMC enfermedades infecciosas*, 13, 442. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-442>
- Lanzas, F., Karakousis, P. C., Sacchetti, J. C., & Ioerger, T. R. (2013). Multidrug-resistant tuberculosis in panama is driven by clonal expansion of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain related to the KZN extensively drug-resistant *M. tuberculosis* strain from South Africa. *Journal of clinical microbiology*, 51(10), 3277–3285. <https://doi.org/10.1128/JCM.01122-13>
- Sambrano, D., Correa, R., Almengor, P., Domínguez, A., Vega, S., & Goodridge, A. (2014). Los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* de una sola clínica ambulatoria en la ciudad de Panamá exhiben una amplia diversidad genética. *La revista estadounidense de medicina tropical e higiene*, 91 (2), 310–312. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0134>
- Pérez-Lago, L., Campos-Herrero, M.I., Cañas, F. 2019, Una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* Beijing persiste a altas tasas y extiende sus límites geográficos 20 años después de la importación. *Sci Rep* 9, 4687 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40525-6>
- García David, Astudillo Myriam. 2019. Genotipificación de aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante MIRU-VNTR, Cali, Colombia, 2013-2015 <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3924>
- Kargarpour Kamakoli, M., Farmanfarmaei, G., Masoumi, M., Khanipour, S., Gharibzadeh, S., Sola, C., Fateh, A., Siadat, S. D., Refregier, G., & Vaziri, F. (2020). Prediction of the hidden genotype of mixed infection strains in Iranian tuberculosis patients. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 95, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.056>
- Acosta, F., Martínez-Lirola, M., Sola-Campoy, PJ, Sicilia, J., Guerra-Galán, T., Maus, SR, Muñoz, P., Pérez-Lago, L., & García de Viedma, D. (2022). Información sobre la complejidad de un grupo inactivo de *Mycobacterium tuberculosis* una vez que se reanuda la transmisión. *Espectro de microbiología*, 10 (1), e0138121. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01381-21>
- Verza, M., Scheffer, MC, Salvato, RS, Schorner, MA, Barazzetti, FH, Machado, HM, Medeiros, TF, Rovaris, DB, Portugal, I., Viveiros, M., Perdigão, J., Kritski, A. y Bazzo, ML (2020). Epidemiología genómica de *Mycobacterium tuberculosis* en Santa Catarina, Sur de Brasil. *Informes científicos*, 10 (1), 12891. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69755-9>
- Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB: una base de datos internacional de múltiples marcadores disponible públicamente para estudiar la diversidad genética y la epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol.* 2012. junio; 12 ( 4 ):755–66. 10.1016/j.meegid.2012.02.004 .
- Lagos, J., Couvin, D., Arata, L., Tognarelli, J., Aguayo, C., Leiva, T., Arias, F., Hormazabal, JC, Rastogi, N., & Fernández, J. ( 2016). Análisis de la distribución del linaje genotípico de *Mycobacterium tuberculosis* en Chile y países limítrofes. *PloS uno*, 11 (8), e0160434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160434>
- Song, W. M., Zhao, J. Y., Zhang, Q. Y., Liu, S. Q., Zhu, X. H., An, Q. Q., Xu, T. T., Li, S. J., Liu, J.Y., Tao, N. N., Liu, Y., Li, Y. F., & Li, H. C. (2021). COVID-19 and Tuberculosis Coinfection: An Overview of Case Reports/Case Series and Meta-Analysis. *Frontiers in medicine*, 8, 657006. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.657006>
- Alejandra Serrato Díaz, Lluvia Flores Rentería, Jaime Aportela Cortez y Edgar Sierra Palacios. PCR: reacción en cadena delapolimerasahttp://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf
- López, A., Acosta, F., Sambrano, D., Tarajia, M., Navajas, S., Arias, F., Escobar, B., Ortis, P., Adames, F., & Goodridge, A. (2021). Caracterización Molecular Directa del Frotis de Bacilos Ácido-Resistentes de Especies de *Mycobacterium* NoTuberculosis

- Causantes de Tuberculosis Pulmonar en la Región Guna Yala, Panamá. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*, 105(3), 633–637. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0096>
- L. Pérez-Lago, M. Martínez Lirola, M. Herranz, I. Comas, E. Bouza, D. García-de-Viedma. 2015. Vigilancia descentralizada rápida y de bajo costo de la transmisión de la tuberculosis basada en PCR específicas de cepa adaptadas a partir de datos de secuenciación del genoma completo: un estudio piloto. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14000640?via%3Dihub>
- Fermín Acosta, Anders Norman, Dilcia Sambrano, et al. Prevalencia probable a largo plazo de un clon predominante de *Mycobacterium tuberculosis* de genotipo Beijing en Colón, Panamá. *Autorea*. 28 de agosto de 2020. DOI: 10.22541/au.159863230.01791414 <https://www.authorea.com/users/353724/articles/477497-probable-long-term-prevalence-for-apredominantmycobacteriumtuberculosiscloneofabeijinggenotypeincolonpanama?commit=73dc0f6eda20d852c83fa300d5d1359b874d0f75>
- Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31:406
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35:907-14.
- Van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis*. 1999;180:726-3

## ANEXO

### ABREVIATURAS

<b>BAAR</b>	Bacilo Acido Alcohol Resistente
<b>BK</b>	Bacilo de Koch
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>TB-MDR</b>	Tuberculosis Multidrogoresistente
<b>TB-XDR</b>	Tuberculosis extensamente resistentes
<b>VIH/SIDA</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana/ Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
<b>COVID-19</b>	Enfermedad de coronavirus 2019
<b>DNTP</b>	Desoxirribonucleótido
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>LJ</b>	Löwenstein-Jensen
<b>MINSA</b>	Ministerio de Salud
<b>MIRU</b>	Unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias
<b>PB</b>	Pares de bases
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido simple
<b>SPOLIGOTYPING</b>	Tipificación de oligonucleótido espaciador
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>VNTR</b>	Número variable de repeticiones en tándem

### GLOSARIO

<b>CEPA</b>	Grupo de microorganismos, como bacterias o virus, que pertenecen a la misma especie.
<b>CLUSTER</b>	Conjunto o agrupación de más de una cepa de cualquier microorganismo.
<b>GENOTIPO</b>	Colección de genes de un individuo o alelos específicos de un organismo.
<b>LINAJE</b>	Línea evolutiva de descendencia biológica

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS UTILIZADOS EN LA EXTRACCIÓN DE ADN:

✓ **Tampón TE (1X)**

**Fórmula Ci. Vi= Cf. Vf:**

$$(10 X) (Vi) = (1 X) (200 \text{ ml}) \\ = Vi = \frac{(1 X)(200 \text{ ml})}{10 X} = 20 \text{ ml de TE}$$

✓ **Lisozima 10 mg/ml**

**3.1.** Primero se preparar **TRIS HCL 10 mM:**

**Fórmula Ci. Vi= Cf. Vf:**

$$(1,000) (Vi) = (10 \text{ mM}) (250 \text{ ml}) \\ = Vi = \frac{(10 \text{ mM})(250 \text{ ml})}{1000 \text{ mM}}$$

*Vi = 2.5 ml TRIS HCL concentrado en 247.5 ml de agua ultra pura.*

**3.2.** Luego se preparar Lisozima y se disolverla en TRIS HCL previamente preparado.

**Fórmula Ci. Vi= Cf. Vf:**

$$(100 \text{ mg/ml}) (Vi) = (10 \text{ mg/ml}) (10 \text{ ml}) \\ = Vi = \frac{(10 \text{ mg/ml})(10 \text{ ml})}{100 \text{ mg/ml}}$$

*Vi = 1 ml Lisozima + 9 ml TRIS HCL al 10 mM pH8*

✓ **SDS 10 %**

- Para 100ml: 10g en 100ml de agua ultrapura.
- Para 250ml: 25g en 250ml de agua ultrapura

✓ **Proteinasa K (Comercial)**

✓ **NaCl 5M**

Para preparar un volumen final de 250ml: Diluir 73.05g en 250ml agua ultrapura

✓ **CTAB/NaCl:**

- 1- Disolver en agitación 4,1 gr. de NaCl en 80 ml de agua (H<sub>2</sub>O) destilada.
- 2- Añadir 10 gramos de CTAB (Bromuro de N-acetil-trimetil-amonio).
- 3- Si no se disuelve bien calentar a 65°C.
- 4- Ajustar el volumen a 100 ml.
- 5- Almacenar a Temperatura ambiente (No más de 6 meses).
- 6- Antes de usar precalentar

✓ **Fenol Cloroformo Alcohol isoamílico 25:24:1 (Comercial)**

✓ **Isopropanol**

✓ **Etanol 70%**

**Fórmula Ci. Vi= Cf. Vf:**

$$(95 \%) (200 \text{ ml}) = (70 \%) (Vf.) \\ = Vf = \frac{(95 \%)(200 \text{ ml})}{70 \%}$$

*Vf = 271.42 ml Etanol + 71.42 Agua*

✓ **Agua desionizada ultrapura (grado molecular)**

**Fórmulas utilizadas para la preparación de reactivos de la electroforesis**

- ✓ **Agarosa:** 3 g de agarosa + 100 ml de Buffer TBE (Tris, borato y EDTA) + 6 µl de Bromuro de Etidio
- ✓ **Buffer de gel y corrida TBE:** TBE 10X comercial (pasar a 1X) en un volumen de 1000 ml.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$(10x) (V_i) = (1x) (100 \text{ ml})$$

$$V_i = \frac{1 \times 1000 \text{ ml}}{10x} = 100 \text{ ml TBE} + 900 \text{ ml de H}_2\text{O}$$

✓ **Preparación de TBE 10X en laboratorio**

- TRIZMA BASE (Nombre sinónimo Tris Base o Trometanol): 54.0 gramos
- ÁCIDO BÓRICO: 27.5 gramos
- EDTA: 3.75 gramos

Procedimiento:

1. Agitar (utilizar magneto) en un vaso químico con 200 a 250 ml de agua destilada a una temperatura entorno a 60° C a 70 °C a una velocidad en el equipo 300rpm.
2. Añadir poco a poco el Trizma base, una vez esté todo homogenizado, se empiezan a agregar los otros reactivos uno a uno, dejando que cada uno se torne homogéneamente en la solución.
3. Filtrar (paso opcional si se observan precipitados en la solución luego de homogenizar)
4. Medir el pH, ajustar que la solución este a un pH8.3
5. Autoclavar la solución en modo liquido en el autoclave (desenroscar la botella)

**Preparación de desinfectante VESPHENE**

- Medir 30ml del concentrado VESPHENE (comercial) en un tubo falcon
- Agregar a un galón de agua destilada (El agua debe estar previamente en el galón)

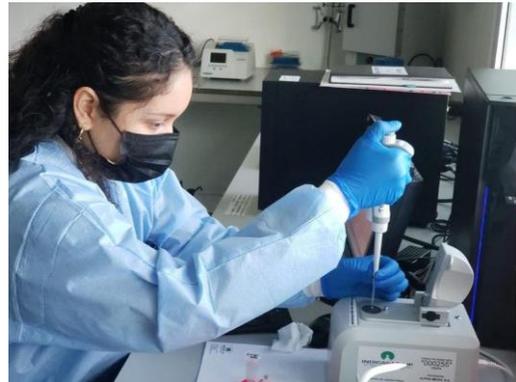
**EVIDENCIAS**



**Conservación de ADN (-20°)**



**Electroforesis**



**Cuantificación de ADN utilizando espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000)**



**AUTORIZACIÓN PARA LA INCORPORACIÓN DE TRABAJO AL REPOSITORIO JÄDIMIKE DE LA UNACHI.**

---

Yo, Sara P. Miranda R. con cédula de identidad personal/ pasaporte 4-807-856, autorizo que mi trabajo (tesis, trabajo de grado, monografía, artículo, video, conferencia, libro, imagen, fotografía, audio, presentación u otro), titulado “**Genotipificación de aislados del Complejo**

**Mycobacterium tuberculosis provenientes del Hospital Materno Infantil José Domingo**

**de Obaldía, provincia de Chiriquí**” sea incorporado al Repositorio JÄ DIMIKE de la Universidad Autónoma de Chiriquí, para fines educativos y no lucrativos, por lo que eximo de cualquier tipo de responsabilidad a la UNACHI y al REPOSITORIO JÄDIMIKE con respecto a violaciones al Derecho de autor y propiedad intelectual, entre otras, y declaro que soy titular de los derechos de la obra arriba descrita, por lo cual asumo personalmente cualquier responsabilidad emanada de la publicación de la misma.

Firmo para constancia, hoy 1 de mayo de 20 22

Nombre: Sara Miranda

Firma:   
4-807-856

Cédula/Pasaporte: 4-807-856

