



TESIS DOCTORAL

Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en Ecuador: Diversidad genética de cepas presentes en el país y transmisión en zonas fronterizas con Colombia y Perú.

BERNARDO DAVID CASTRO RODRÍGUEZ

Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal (R005)

Con la conformidad del director:

Director:

Miguel Ángel García Bereguain

Esta tesis cuenta con la autorización del director de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2024

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo del proyecto de investigación que se manifiesta en la presente tesis doctoral no pudo ser posible sin el apoyo de varias personas:

A Miguel Ángel, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo para desarrollar esta investigación con su guía, consejo, amistad y confianza. Formaste un gran equipo con el que hemos pasado de todo desde los inicios, pero siempre nos hemos mantenido unidos y dando lo mejor de nosotros bajo tu liderazgo.

A Javier Hermoso de Mendoza y Luis García Marín, por su apoyo y ayuda durante todo el proceso.

A José Manuel Benítez y Natalia Jiménez, por su apoyo con el procesamiento de espoligotipos.

A Nathalia, por la paciencia casi infinita durante todo este proceso, el apoyo incondicional, la confianza y el amor. Te debo esto y más.

A mis padres, Marco Antonio y María Elena, y mis hermanos, Marcos y Lorena, Agustín y Simona, Stefanie y Hugo. Sin ustedes no podría haber culminado este camino.

A mis sobrinos Marcus Emilio, Rafaella, Flavio David, Daniel Agustín, Hugo Sebastián y Sofía, son lo mejor que me ha pasado.

A los amigos de la UDLA, Diana, Bárbara, Carolina, Paolo, Sebastián y Santiago, unos llegaron antes y otros después. Gracias por compartir sus conocimientos y observaciones, pero sobre todo por el trajín del día a día y las bromas que nos unieron como un grupo de amigos.

A mis amigos de siempre, los que han estado presentes a pesar de que la vida nos haya distanciado un poco. Ustedes saben quienes son, me faltarían páginas para agradecerles a todos.

A Ñusta y Leo, por la compañía durante las largas noches frente al computador.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad de Extremadura, por la oportunidad de formar parte del Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal, y a la Universidad de las Américas, por su apoyo a la iniciativa de doctorandos.

DEDICATORIA

A Nathalia y mi familia

ÍNDICE

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL PRESENTADA COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES (Según establece en el artículo 33 de la Normativa de Doctorado de la UEx)	3
AGRADECIMIENTOS.....	6
DEDICATORIA	7
ÍNDICE	8
1. RESUMEN.....	10
2. SUMMARY	12
3. ABREVIATURAS.....	14
4. INTRODUCCIÓN	15
4.1. Patología de la Tuberculosis	16
4.2. Epidemiología de TB.....	17
4.2.1. Epidemiología de la TB en la región de las Américas.....	17
4.2.2. Epidemiología de la TB en Ecuador.....	18
4.3. Estructura de linajes.....	19
4.3.1. Linajes circulantes en América Latina.....	20
4.3.2. Linajes circulantes en el Ecuador	22
4.3.3. Linaje 4 y el genotipo RD ^{Rio}	23
4.3.4. Linaje 2 y el genotipo Beijing	24
4.4. Tratamiento de la TB y el desarrollo de resistencia a antibióticos.....	25
4.5. Diagnóstico molecular de micobacteriosis.....	27
4.6. Técnicas moleculares usadas en la epidemiología de MTBC.	28
4.6.1. IS6110-RFLP	29
4.6.2. Espoligotipado: Tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping)	29
4.6.3. Tipificación de repeticiones en tándem MIRU de número variable (MIRU-VNTR).....	30
4.6.4. Secuenciación del genoma completo (WGS).....	30
4.6.5. Bioinformática para el análisis de linajes MTB	31
5. JUSTIFICACIÓN.....	32
6. OBJETIVOS	33
7. RESULTADOS: TRABAJOS PUBLICADOS	34
7.1. Population structure of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in El Oro: a first insight into Ecuador-Peru tuberculosis transmission.....	34
7.2. A first insight into tuberculosis transmission at the border of Ecuador and Colombia: a retrospective study of the population structure of <i>M. tuberculosis</i> in Esmeraldas province.	67
8. DISCUSIÓN	95

8.1.	Estructura poblacional de MTB en el Ecuador	95
8.2.	Transmisión de TB a través de las fronteras	96
8.3.	Resistencia a antibióticos usados en el tratamiento contra TB.....	101
8.4.	Detección de MTBC y NTM	104
9.	CONCLUSIONES.....	107
10.	BIBLIOGRAFÍA	108

1. RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Es una de las tres principales causas de muerte por un solo agente infeccioso, junto con el COVID-19 y el VIH/SIDA. En Ecuador, se estima que en 2022 hubo 8200 casos de TB, de los cuales 390 estaban asociados a TB multidrogorresistente (MDR-TB). Sin embargo, solo se notificaron 7388 casos, lo que evidencia un problema de subdiagnóstico.

El MTBC comprende ocho linajes filogenéticos, de los cuales el linaje L4 es el más prevalente en las Américas, especialmente la familia LAM. El genotipo RD^{Rio}, perteneciente a LAM, se asocia con el desarrollo de resistencia a antibióticos. En América Latina, la prevalencia de las cepas RD^{Rio} difiere de un país a otro, siendo Brasil, Venezuela, Perú y Colombia los países con mayor prevalencia. Por otro lado, el linaje L2 representado por el genotipo Beijing tiene una importante ventaja selectiva asociada al desarrollo de resistencia a antibióticos, transmisibilidad incrementada e hipervirulencia. La prevalencia de las cepas Beijing en la región difiere de un país a otro, siendo Cuba, Perú y Colombia los países con las prevalencias más elevadas. En Ecuador, no existen reportes de la presencia de cepas RD^{Rio} a la fecha, mientras que la prevalencia del genotipo Beijing es menor al 1%.

El estudio realizado por nuestro equipo de investigación en las provincias de El Oro y Esmeraldas, fronterizas con Perú y Colombia, respectivamente, encontró el predominio de cepas de L4 en ambas provincias. Sin embargo, la elevada variabilidad genética que existen en las cepas analizadas de ambas provincias no permite la formación de clústeres de transmisión activa con cepas de otras provincias del Ecuador o con las cepas de Colombia y Perú usadas en el análisis. Estos eventos pueden estar relacionados con las condiciones socioeconómicas pobres de estas provincias, con acceso limitado a la infraestructura sanitaria y elevada presencia de población vulnerable, que se asocian con la reactivación de infecciones latentes de TB más que a eventos de transmisión activa.

Nuestra investigación determinó que la prevalencia del genotipo RD^{Rio} en Ecuador es la más baja de la región hasta la fecha (2.1%). Dentro de este grupo, el 29.4% se identificaron como cepas MDR. A pesar de las bajas tasas de prevalencia de RD^{Rio} y Beijing en Ecuador, es importante considerar las condiciones epidemiológicas del país, ya que podrían variar en poco tiempo debido a la política de fronteras abiertas con Perú y Colombia que reportan

prevalencias elevadas para ambos genotipos, además de Venezuela que presenta una de las tasas más altas de RD^{Rio} para la región. La crisis que se desarrolla desde el 2017 en Venezuela produjo una migración masiva hacia otros países de la región, convirtiendo a los migrantes irregulares en individuos vulnerables a la TB y facilitando la diseminación de enfermedades, promoviendo problemas imprevistos en los programas sanitarios.

Por último, considerando que las micobacterias no tuberculosas (NTM) son un problema de salud pública a nivel mundial, y que en Ecuador se desconoce la incidencia y distribución de este grupo de micobacterias, el uso conjunto de metodologías de referencia y de técnicas moleculares aumenta el poder discriminatorio para diferenciar NTM de MTBC. El estudio realizado por nuestro equipo de investigación encontró que los kits comerciales basados en PCR de Viasure y Sansure presentan un buen desempeño clínico para la detección de MTBC con una sensibilidad del 100% en comparación con los métodos de referencia. Sin embargo, la detección de NTM tiene una fuerte variación entre los kits: la sensibilidad reportada para el kit de Viasure es de 94% a diferencia de la sensibilidad obtenida para el kit de Sansure de 75.6%, sugiriendo que el kit Sansure podría tener un desempeño pobre para la detección de NTM de muestras clínicas.

En conclusión, los resultados de este estudio son importantes para el control de la TB en Ecuador. El conocimiento de la distribución poblacional de las cepas de MTB en el país permite orientar las estrategias de vigilancia y control de la enfermedad en zonas de frontera con una elevada población migrante. Además, la evaluación del desempeño de los kits comerciales basados en PCR para la detección/diferenciación de NTM y MTBC es importante para garantizar el diagnóstico adecuado de las diferentes infecciones micobacterianas.

2. SUMMARY

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by bacteria from the Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC). It is one of the three main causes of death by a single infectious agent together with COVID-19 and HIV/AIDS. By 2022, it was estimated for Ecuador 8200 cases of TB, of which 390 were associated to multidrug resistant TB (MDR-TB). Nevertheless, only 7388 cases were notified, which evidences a problem of underdiagnosis.

The MTBC comprises of eight phylogenetic lineages, of which L4 is the most prevalent in the Americas, especially the LAM family. The RDRio genotype, which belongs to LAM family, is associated to the development of antibiotic resistance. In Latin America, the prevalence of RDRio strains differs from country to country, being Brasil, Venezuela, Peru and Colombia, the countries with higher prevalence. On the other hand, lineage L2 represented by the Beijing genotype has an important selective advantage associated to the development of antibiotic resistance, increased transmissibility and hypervirulence. Prevalence of Beijing strains in the region differs from country to country, being Cuba, Peru and Colombia the countries with the higher prevalence. To date, there are no reports of the presence of RDRio strains, while the prevalence of the Beijing genotype is under 1%.

The study performed by our research team in the provinces of El Oro and Esmeraldas, with frontier with Peru and Colombia, respectively, found a predominance of L4 strains in both provinces. However, the higher genetic variability found in the analyzed strains from both provinces do not allow the structure of active transmission clusters with other provinces of Ecuador or with the strains from Colombia and Peru used in the analysis. These events might be related to the reactivation of latent TB infections rather than active transmission events, due to poverty conditions in the areas of study.

Our research determined the prevalence of RDRio genotype in Ecuador (2.1%) as the lowest in the region to date. Within this group, the 29.4% of isolates were identified as MDR. Noticing the low prevalence rates of Beijing and RDRio genotypes in Ecuador, it is important to consider the epidemiological conditions of the country, as variations might have been occurred in recent years due to open-border policies with Peru and Colombia, which report high prevalence rates for both genotypes, as well with Venezuela that reports the highest prevalence rate of RDRio for the region. The ongoing economic crisis in Venezuela have caused a surge of TB cases. Since 2017, a massive migration of Venezuelan population has occurred towards other countries in the region, converting this highly vulnerable migrant population into a vector of infectious diseases at a regional level.

Finally, fast and differential diagnosis of MTBC from non-tuberculous mycobacteria (NTM) is another challenge in the surveillance and control programs. NTM are an emergent global public health issue

and many countries like Ecuador are unaware of the incidence and distribution of this group of mycobacteria, which are frequently misdiagnosed as MTBC. The study performed by our research team found that commercial PCR-kits from Viasure and Sansure, available in Ecuador, show a good clinical performance for the rapid typification of MTBC cultures. However, there are marked differences between the analyzed commercial kits when detecting NTM, with a variable sensibility of 75.6% to 94%.

In conclusion, the results of this study contribute to the knowledge of the population distribution of MTB strains in Ecuador, as pioneer studies related to TB surveillance in border areas. Finally, it also contributes with useful information for the microbiological diagnosis of MTBC and NTM through the evaluation of some currently available commercial tests.

3. ABREVIATURAS

CM: Mutaciones compensatorias

CNR: Centro Nacional de Referencia para Micobacterias

DST: Prueba de susceptibilidad a drogas

INSPI: Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación “Leopoldo Izquieta Pérez”, Ecuador

L2: Linaje 2

L4: Linaje 4

LTBI: Infección latente de tuberculosis

MDR-TB: Tuberculosis multidrogo resistente

MIRU: Unidades repetitivas intercaladas micobacterianas

MIRU-VNTR: Marcadores repetitivos de variación en tándem en micobacterias

MTB: Mycobacterium tuberculosis (sensu stricto)

MTBC: Complejo Mycobacterium tuberculosis

NTM: Micobacterias no tuberculosas

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PPL: Personas privadas de la libertad

real-time PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de tiempo real

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

TB: Tuberculosis

UDLA: Universidad de las Américas, Ecuador

XDR-TB: Tuberculosis extensamente resistente a drogas

4. INTRODUCCIÓN

Esta introducción de la tesis doctoral presenta el conjunto de artículos requeridos para tesis basadas en compendio de publicaciones. El elemento básico que relaciona dichas publicaciones es el avance en el conocimiento epidemiológico-molecular de la tuberculosis en las poblaciones humanas de áreas fronterizas del norte y sur de Ecuador, y la evaluación de kits comerciales para la detección y diferenciación de *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas por RT-PCR.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad antigua que ha afectado a la humanidad desde sus orígenes [1–3] y que continúa siendo una de las principales causas de muerte en el mundo, en concreto una de las tres principales causas de muerte por un único agente infeccioso junto con el COVID-19 y el VIH/SIDA [4, 5]. El agente causal de la TB es *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), una bacteria aeróbica, acidorresistente y con forma bacilar que no forma esporas y se propaga por el aire cuando los individuos infectados tosen y expulsan la bacteria al ambiente en aerosoles de exudados respiratorios. Las personas que mantienen una interacción cercana y conviven con individuos afectados, principalmente en espacios reducidos y con una alta densidad ocupacional, tienen un alto riesgo de desarrollar la enfermedad en los pulmones (TB pulmonar) o en cualquier otro órgano o tejido (TB extrapulmonar) [4, 6]. La TB es más prevalente en hombres adultos (56.5%), seguido por mujeres adultas (32.5%) y niños (11%), y se estima un total de 10.6 millones de enfermos y 1.4 millones de muertes en todo el mundo [4, 5]; además, la enfermedad supone una gran carga para los países con bajo desarrollo socioeconómico y agrava las desigualdades existentes. Las estimaciones mundiales de TB proporcionadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que una cuarta parte de la población mundial ha sido infectada por MTB, de los cuales un 5% tiene un alto riesgo de desarrollar TB en los primeros dos años después de la infección [5], por lo que se estima que alrededor de un 23% de la población mundial padece una infección latente de TB (LTBI). Sin embargo, la mayoría de pacientes con LTBI no desarrollarán la versión activa de la enfermedad, mientras que se estima que entre el 5% al 15% de ellos progresarán a una TB activa durante su período de vida [7, 8].

Aunque existe una estrategia global auspiciada por la Organización Mundial de la Salud para erradicar TB a nivel global, sólo algunos países han hecho avances para reducir la carga de TB a menos de 10 casos por cada 100 000 habitantes. No obstante, la investigación para el

desarrollo de nuevas terapias y vacunas para combatir la TB debe impulsarse y concentrarse en la disminución del número de casos, especialmente en partes del mundo con condiciones socioeconómicas precarias donde el acceso al tratamiento de la TB es muy limitado [4, 9]. Además, la pandemia de COVID-19 en 2020 tuvo un enorme impacto en la dinámica de la TB que representó una disminución importante en el número de nuevos pacientes diagnosticados con TB, reportando la reducción de 7.1 millones en el período 2017-2019 a 5.8 millones en el período 2019-2020, aunque las cifras aumentaron parcialmente a 6.4 millones en el 2021 [4, 10]; principalmente al enfoque prioritario de los sistemas de salud para controlar el SARS-CoV-2, descuidando la vigilancia de otras enfermedades infecciosas.

La TB presenta un espectro clínico complejo debido a la interacción de diversos factores asociados al huésped (estado inmunológico), al ambiente (vías de transmisión) y al patógeno (virulencia, transmisibilidad, supervivencia/reproducción), por lo que la investigación de MTB es importante, haciendo énfasis en el uso de biomarcadores genéticos que faciliten la identificación de linajes micobacterianos y su asociación con características que afecten a la virulencia y al desarrollo de perfiles de resistencia, y en la creación de nuevas opciones de tratamiento, vacunas y herramientas de diagnóstico [11]. Ecuador es un país con una alta diversidad poblacional y fuertes diferencias socioeconómicas, por lo que el estudio de la epidemiología molecular de las cepas circulantes facilita el diseño y desarrollo de programas públicos para la prevención y control de la TB en distintos sectores vulnerables de la población [12–17].

4.1. Patología de la Tuberculosis

El desarrollo de la TB es una consecuencia de la interacción entre el bacilo y la inmunidad del huésped, por lo que la relación entre ambos puede ser diversa, compleja y durar toda la vida [18]. La dispersión y contagio de los agentes infecciosos se da por microgotas de 1 a 5 micras de diámetro presentes en los aerosoles expulsados por la tos del individuo infectado, que contienen de 1 a 5 bacilos, siendo la dosis infecciosa de 1 a 10 bacilos. Un episodio de tos puede producir 3000 microgotas y un estornudo hasta un millón [18, 19]. Una vez que los patógenos ingresaron al organismo del huésped, la progresión de la enfermedad depende del nivel de inmunidad del individuo, por lo que el 90% de individuos sanos no desarrollará TB y el 10% restante desarrollará la enfermedad activa: el 50% de estos en los

primeros 2 años y 50% restante desarrollará TB más adelante en la vida [20]. Debido al proceso de transmisión aérea, la TB pulmonar es la forma predominante de la enfermedad en un 80% de los casos, donde el pulmón es el sitio primario de infección. La TB extrapulmonar ocurre como una consecuencia o como fenómeno simultáneo al curso de la TB pulmonar, y puede afectar a casi todos los órganos del cuerpo [21]. Por esta razón, la TB se clasifica en diferentes tipos clínico-patológicos considerando diversos factores: TB primaria, que se presenta en personas que han estado expuestas al bacilo por primera vez, especialmente en infantes y adolescentes que habitan áreas del mundo donde la TB es altamente endémica, y en individuos que han perdido la inmunidad adquirida por efecto de enfermedades inmunodepresoras o por edad avanzada, lo que predispone a un estado inmunológico inadecuado o débil; TB post-primaria, que es una enfermedad que afecta generalmente a los adultos debido a una reactivación endógena de un proceso previo controlado o durmiente, o por una reinfección exógena en un paciente sano, pero previamente sensibilizado que ha conservado cierto grado de inmunidad adquirida. La diseminación de la enfermedad por el sistema circulatorio desde los pulmones hacia múltiples órganos (TB miliar) puede ocurrir tanto en las formas primaria como en la post-primaria de la enfermedad [18].

4.2. Epidemiología de TB

4.2.1. Epidemiología de la TB en la región de las Américas

La situación de la TB en las Américas es consecuencia directa de múltiples factores de riesgo y socioeconómicos que afectan principalmente a grupos poblacionales vulnerables (por ejemplo: personas privadas de libertad (PPL), población indígena, habitantes de calle y migrantes irregulares). Considerando que algunos países de la región han realizado grandes esfuerzos para eliminar la enfermedad como problema de salud pública, las estimaciones de la OMS para el año 2021 identifican a los países de alta carga como aquellos con un número estimado de casos de TB superior a 10 000 por año y una tasa de incidencia superior a 45 por cada 100 000 habitantes: Brasil, Perú, México, Haití, Colombia, Argentina, Venezuela, Bolivia, Ecuador, El Salvador, Paraguay, Guyana y Dominica [5, 14]. La OMS informó un descenso en las tasas de incidencia estimada y del número absoluto de muertes por TB entre el 2000 y 2019 para la región de las Américas, lo que representa un avance hacia los

objetivos establecidos en la Estrategia Fin de la TB; sin embargo, para el año 2020 se observó un revés en el progreso realizado para cumplir estos objetivos, ya que el acceso a los servicios de TB se vio interrumpido por medidas de cuarentena y relocalización de personal médico hacia servicios relacionados con la COVID-19, lo que causó una reducción de 16.8% en los reportes de nuevos casos de TB en comparación con el año anterior, el incremento de la incidencia estimada de TB al 28.5% y el reporte de 27 000 casos fatales [4, 14]; sin embargo, la disponibilidad de pruebas moleculares rápidas ha aumentado de 11 dispositivos GeneXpert® en 2011 a 677 en 2020 para la región de las Américas [14]. Las pruebas de susceptibilidad a drogas terapéuticas contra la TB (DST) en las Américas mejoraron la detección de cepas multirresistentes a antibióticos (MDR-TB), con un aumento del 48,8% en 2019 al 54% en 2020 de casos previamente tratados y la identificación de nuevos casos de MDR-TB del 39,8% en 2019 al 48,9% en 2020. Bahamas, Nicaragua, Estados Unidos de América, Surinam y Chile informan la tasa más alta de DST en casos de TB nuevos y previamente tratados, mientras que Haití, Colombia y Venezuela se encuentran por debajo del promedio regional informado. Diez países de las Américas son los más afectados por las cepas de MDR-TB, de los cuales Perú y Ecuador informan las tasas de incidencia más altas, con 4.3% y 1.4% respectivamente [14].

4.2.2. Epidemiología de la TB en Ecuador

La población humana del Ecuador presenta una alta diversidad y está compuesta por mestizos (71,9%), descendientes europeos (6,1%), indígenas (6,8%), afroecuatorianos (7,2%) y montuvios (7,4%); además de presentar condiciones socioeconómicas locales que impactan la distribución de la población en áreas urbanas (62,8%) y rurales (37,2%), especialmente en zonas marginales donde la falta de acceso a programas y recursos de salud es común [12, 22, 23]. De acuerdo con el último reporte proporcionado por las autoridades sanitarias del Ecuador en el 2018, las provincias con mayor incidencia de TB son Guayas (55,03%), El Oro (7,28%) y Los Ríos (6,02%), donde la población vulnerable incluye grupos de bajos ingresos económicos e individuos con enfermedades diversas (VIH-positivos, diabetes, etc.) [24]. La mayoría de los casos de TB reportados en Ecuador corresponden al grupo de edad de 25 a 34 años (25%), seguido por el grupo de 15 a 24 años (20,54%) y el de 35 a 44 años (16,85%), lo que indica que la TB afecta principalmente a adultos en edades

económicamente productivas, generando así un impacto negativo en la economía nacional y la sociedad [24].

De acuerdo con los datos presentados por la OMS para el año 2022, las estimaciones para Ecuador fueron de 8200 casos de TB (45 por 100 000 habitantes), de los cuales 390 están asociados a MDR-TB (2.2 por cada 100 000 habitantes), y 850 fallecimientos entre individuos VIH positivos y negativos. En el mismo año Ecuador notificó 7388 casos totales, 474 de los cuales presentaron la condición MDR-TB [25]. Es notorio encontrar diferencias entre ambos informes, lo que evidencia un problema grave de subdiagnóstico que se agravó por el impacto de la pandemia de COVID-19 y provocó en 2020 una disminución del 17% de casos notificados con respecto al año anterior [5, 14]. Sin embargo, no es un problema reciente, ya que un estudio realizado en 2019 por Silva y colaboradores también establecen un elevado porcentaje de subdiagnóstico de niños y adolescentes con TB, basándose en la diferencia de casos estimados para la región de las Américas (12%) y los casos reportados en el estudio (2.03%), sugiriendo que el acceso limitado a pruebas diagnósticas, la falta de capacitación del personal sanitario y una deficiente investigación de contactos son las principales razones para fallar en el seguimiento y vigilancia de casos [26], las mismas que también son reconocidas por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador en el último Boletín Anual de TB publicado en 2018 como factores vinculados al subdiagnóstico de TB en el país [22, 24].

La rifampicina y la isoniazida son fármacos usados en la primera línea de tratamiento contra la TB que han demostrado ser eficaces [27]. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a fármacos antituberculosos ha complicado el tratamiento de la TB, por lo que la detección temprana, preferiblemente antes del inicio de una terapia, es crucial para la aplicación de un tratamiento eficaz y para la interrupción de la transmisión y propagación de estas cepas [28]. Según la OMS en 2022, Ecuador tiene una tasa de prevalencia estimada de MDR/RR-TB del 3% en casos nuevos y del 26% en pacientes con TB previamente tratada. Los valores indican un aumento en comparación con los datos reportados en 2021 [14, 25, 29].

4.3. Estructura de linajes

Los bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* pertenecen al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que comprende linajes de micobacterias altamente similares entre sí,

con un 99,9% de identidad genética. Los humanos son los principales huéspedes de ocho linajes filogenéticos: L1, Indo-Africano Oriental (EAI); L2, Asiático Oriental (incluye la familia Beijing); L3, Cepa de Asia Central (CAS); L4, Euroamericano (incluye Haarlem, X, LAM, S y T); L5 y L6, Africano Occidental I y II respectivamente; L7, Etiópe [30–32]; y L8, Africano Oriental [33]. Los linajes se diferencian por su distribución global y en su capacidad infectiva, transmisión y resistencia a los antibióticos [30, 31, 34–36], lo que sugiere que la estructura filogeográfica de las poblaciones de MTBC está relacionada con determinadas poblaciones humanas como resultado de las interacciones huésped-patógeno que permanecen estables en entornos rurales y urbanos a lo largo del tiempo [32]. El MTBC se caracteriza por no realizar transferencia horizontal de genes ni utilizar plásmidos, en comparación con otros patógenos, por lo que la ocurrencia de mutaciones cromosómicas se da como resultado de deleciones, duplicaciones, inserciones y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) lo que representa la fuente de diversidad genética del Complejo [11, 37]. Estos eventos determinan un patrón único de evolución clonal que refiere a un ancestro común del cual emergen los diferentes linajes y cepas [11], por lo que la variabilidad del MTBC se basa en alteraciones genéticas que pueden explotarse como marcadores moleculares para fines epidemiológicos [38, 39].

4.3.1. Linajes circulantes en América Latina

La entrada de cepas pertenecientes al linaje 4 (L4) a las Américas se dio durante el periodo de colonización en los siglos XV y XVI, desplazando al linaje zoonótico endémico de la región y estableciéndose como el dominante en el continente americano [11, 40, 41]. Esto se ha confirmado por varios grupos de investigación de diferentes partes de América que reportan al linaje Euroamericano (L4) como el más prevalente, especialmente las familias LAM (Latinoamericana-Mediterránea), Haarlem y T [11, 41]. Sin embargo, existen diferencias en la distribución genotípica entre diferentes regiones de las Américas [42]; por ejemplo, la variante RD^{Rio} que pertenece a la familia LAM muestra una prevalencia variable en el territorio brasileño [38, 43, 44], mientras que otros países reportan una baja presencia del genotipo, como Argentina o Paraguay, debido a la predominancia de cepas LAM diferentes a RD^{Rio} (LAM3) en Argentina y una baja proporción de cepas LAM RD^{Rio} (LAM1 y LAM2) en Paraguay [41, 45], estableciendo la presencia de cepas silvestres para RD^{Rio} (SIT391/LAM4)

en esta zona geográfica específica del continente [46]. La familia Haarlem está asociada con la MDR-TB y se encuentra con frecuencia en los Estados Unidos y el Caribe, a diferencia de otros países de Sudamérica. No obstante, Bolivia reportó una elevada incidencia del 39.4% del genotipo H por encima del 26.3% de LAM [47], mientras que en un estudio realizado en Buenos Aires reportó una incidencia del 16.9% de linajes H1 y H3, menor que las de las subfamilias LAM y T [46]. Cerezo y colaboradores determinaron que las cepas pertenecientes a la familia Haarlem son las que tienen una transmisión más activa en Bogotá, debido a la presencia de una cepa MIT45 predominante encontrada en el estudio [48]. La familia T presenta una elevada heterogeneidad y ambigüedad, lo que la convierte en un grupo difícil de definir debido a la limitada información filogenética provista [46]. Sin embargo, las cepas pertenecientes a la familia T están bien representadas en diferentes países de América: en Guatemala es el segundo grupo más prevalente reportado en el país (22%) después de LAM (39%), mientras que el genotipo T en Honduras representa el 16% de los aislados después de LAM (55%) y Haarlem (16%) [49]. En Argentina, los genotipos T tienen una importante representación (35,9%) a diferencia de la prevalencia reducida en otros países del continente, lo que sugiere una expansión geográfica restringida al país debido a la larga historia de inmigración italiana [46]. En Panamá, los genotipos T2 y T4-CEU1 son altamente prevalentes, por lo que la introducción de estos desde el Caribe y Sudáfrica pudo ocurrir durante la construcción del Canal de Panamá [41]. Otras familias del L4 son X, que está muy representada en Haití [50, 51], y S, que es muy común en la región andina de Ecuador [22].

Otro linaje que está ampliamente distribuido en la región es el Linaje 2 (L2), debido a la migración china a las Américas durante la década de 1850 por trabajo y comercio [52, 53], y más recientemente por los viajes intercontinentales que también han permitido la introducción de cepas pertenecientes a L2. El genotipo Beijing tiene una importante ventaja selectiva asociada a una capacidad mutagénica que incrementa la habilidad para desarrollar resistencia a los antibióticos, incrementar la transmisibilidad e hipervirulencia, las cuales son características comunes en cepas evolutivamente “modernas” que se encuentran en lugares con presencia reciente, como América Latina, sur de África y este de Europa; a diferencia de las cepas evolutivamente “antiguas” que se localizan en los países del este de Asia y muestran una virulencia leve y resistencia variable a los antibióticos [54].

4.3.2. Linajes circulantes en el Ecuador

Desde hace algunos años se han realizado estudios retrospectivos para determinar la estructura poblacional de aislados de MTB y el perfil de resistencia a antibióticos en diferentes escenarios del Ecuador, para comprender el panorama de la TB en el país. En el 2023, un estudio realizado en una prisión de Guayaquil por Garcés y colaboradores analizaba datos de 15-loci MIRU-VNTR de 36 aislados de PPL (año de recolección: 2016) para determinar la estructura poblacional de MTB en este grupo. Los resultados detallan una alta prevalencia de cepas pertenecientes a los sublinajes L4: 58.2% LAM, 16.7% Haarlem, 16.7% Ghana y 5.6% S; además de una muestra identificada como Beijing (2.8%) [55]. Estos resultados son comparables al trabajo publicado por Morey-León *et al.* en 2022, quienes trabajaron con secuencias genómicas de 21 cepas de MTB-MDR de la región costera de Ecuador (año de recolección: 2020) para el análisis de la resistencia a antibióticos, reportando que las muestras analizadas pertenecían al linaje 4: LAM (61.9%), Haarlem (19%), X (9.5%), S y T (cada una 4.8%). El análisis de droga resistencia determinó seis aislados como extensamente resistentes a antibióticos (XDR), de los cuales 4 pertenecen al sublinaje LAM [56]. En el 2020, Garzón-Chávez y colaboradores publicaron un estudio más amplio sobre la estructura poblacional de la MTB en Ecuador, utilizando técnicas de genotipaje de 24-loci MIRU-VNTR y PCR de Regiones de Diferencia (RD), además de información de resistencia a los medicamentos, a partir de 373 aislados de MTB recolectados a nivel nacional (años de recolección: 2013-2016). El estudio reporta una distribución uniforme de L4 en Ecuador, de la cual LAM es el sublinaje más representativo con 45.6%, seguido por Haarlem con 32.2%, S con 13.2%, X con 4.3%, mientras que otros sublinajes L4 comprenden el 3.9%; siendo la prevalencia de Beijing del 1.1%. El estudio encontró que algunas cepas LAM y S forman complejos clonales con cepas encontradas en el país vecino de Colombia, lo que indica una agregación regional y bajas tasas de transmisión; sin embargo, al comparar con cepas peruanas no se encontraron asociaciones. El estudio sugiere que las diferencias encontradas en el análisis epidemiológico molecular podrían asociarse a patrones migratorios importantes desde Colombia a Ecuador durante el período en que se recolectaron las muestras, cuando aproximadamente 170 000 colombianos y 15 000 peruanos viajaron a Ecuador [22]. El estudio publicado en 2019 por Zurita *et al.* analiza los perfiles de droga resistencia y la diversidad genotípica de 104 cepas de MTB recolectadas entre 2002-2014 en la ciudad de Quito, y reportan una prevalencia del 33.7% para aislados

LAM, 30.8% para Ghana, 5.8% para S, el sublinaje Cameroon con 3.8%, Haarlem con 3.8%, Beijing está representado con 1.9%, y 20.2% se reportan como genotipos huérfanos. 80 aislados de 104 se reportaron como resistentes a la rifampicina, 97/104 resistentes a la isoniazida y 73/104 se determinaron como aislados MDR. LAM fue el sublinaje más representativo entre todos los aislados resistentes a los antibióticos [57].

4.3.3. Linaje 4 y el genotipo RD^{Rio}

El L4 está conformado por al menos diez sublinajes que se diferencian en su capacidad de transmisión; de estos, el sublinaje L4.3 o Latinoamericano-mediterráneo – LAM es el que presenta una mayor frecuencia y distribución a nivel mundial [32, 58]. Dentro de este sublinaje se encuentran varios genotipos, de los cuales tres son los más comunes alrededor del mundo: RD115, el más ancestral; RD174, también conocido como RD^{Rio}, y el espoligotipo SIT33. Sin embargo, existen otros sublinajes del L4 que muestran una tendencia a estar geográficamente restringidos y con menos probabilidades de sufrir una expansión transfronteriza, ya que están íntimamente asociados a su población huésped por un largo proceso de adaptación local [58, 59], como por ejemplo el genotipo Carabobo en Venezuela, que se encuentra geográficamente limitado al estado del que recibe su nombre [41, 60].

En el año 2007, Lazzarini y colaboradores identificaron un nuevo gen fusionado Rv3346c/55c usando un protocolo de PCR de punto final en una colección de aislados MTBC de Río de Janeiro, descubriendo así el genotipo RD^{Rio} dentro de la familia LAM. Este polimorfismo de secuencia larga (LSP) surgió por un evento de recombinación homóloga entre dos genes codificadores de proteínas (Rv3346c y Rv355c) ubicados a más de 26.3 kb de distancia, que produjo una delección genética que fusionó ambos genes [38]. Posteriores análisis de espoligotipado, IS6110-RFLP y MIRU-VNTR establecieron al genotipo RD^{Rio} como un miembro de la familia LAM, con características que corresponden a LAM1 y LAM2 como las únicas subfamilias que albergan este genotipo, mientras que las subfamilias LAM4-6 y LAM 9 agrupan a los genotipos RD^{Rio} y silvestre, y la subfamilia LAM3 contiene únicamente a cepas de tipo silvestre [38, 41]. La variante RD^{Rio} se asocia al desarrollo de resistencia contra múltiples antibióticos y se distribuye en muchos países del mundo [38, 61–64]. En América Latina, la prevalencia de las cepas RD^{Rio} difiere de un país a otro: del 30% al 51.9% en diferentes locaciones en Brasil [38, 43, 44]; un 69.8% de las cepas LAM venezolanas se han

identificado como RD^{Rio} [60]; un 37% de aislados en Colombia se identificaron como RD^{Rio} [48, 65, 66]; un 31% de las cepas peruanas pertenecían a la subfamilia RD^{Rio} [65, 67]; por su parte, Chile ha reportado un 3% de aislados RD^{Rio} [65]. A la fecha no existen reportes de la presencia de cepas RD^{Rio} en el Ecuador.

4.3.4. Linaje 2 y el genotipo Beijing

Las cepas del linaje 2 se están expandiendo rápidamente por todo el mundo debido al aumento de la transmisibilidad y virulencia de algunos de sus miembros [58, 68], además de su asociación con la resistencia a los antibióticos debido a una serie de eventos: mayor tasa de mutación basal, progresión acelerada a la enfermedad, mayor transmisión y condiciones demográficas del huésped [54, 69].

Aproximadamente, el genotipo Beijing es responsable del 25% de los casos de TB en el mundo [70]. Este genotipo fue identificado por primera vez en 1995 por Van Soolingen *et al.* que detectaron un grupo de cepas chinas que compartía un patrón IS6610-RFLP único con 15 a 20 copias en su genoma, además de un patrón de espoligotipo distintivo en los espaciadores 35 al 43 del locus DR (Repeticiones Directas) sugiriendo un proceso evolutivo independiente, a diferencia de otras cepas MTB. Las cepas Beijing presentan deleciones en RD105 y RD207, que son responsables de la ausencia de los primeros 34 espaciadores en el locus DR, y están presentes en otros patrones de linaje. El RD181 es un marcador de evolución temprana y es una característica única en casi todas las cepas de la familia Beijing. Por otro lado, la presencia o ausencia de RD150 y RD142 es una característica de cepas con una evolución más reciente [54]. Las cepas modernas de la familia Beijing se distribuyen en América Latina, sur de África y este de Europa, y están asociadas con ventajas selectivas para desarrollar resistencia a los antibióticos, hipervirulencia y mayor transmisibilidad [39, 54, 71]. Perú alberga las subfamilias antiguas y modernas, por lo que se lo considera como la principal fuente de transmisión del genotipo Beijing en las Américas debido a la migración histórica de individuos chinos, japoneses y coreanos al país a fines del siglo XIX. Sin embargo, la ciudad portuaria colombiana de Buenaventura, de importante actividad económica, muestra una alta prevalencia del genotipo que se debe a haber sido un punto de entrada alternativo de las cepas Beijing desde Asia [41].

En el continente americano la prevalencia de las cepas Beijing muestra diferentes tasas de un país a otro. La prevalencia del genotipo Beijing en América Latina es del 3.9%, siendo los países que reportan un mayor número de aislados Beijing Cuba (17.26%), Perú (16%) y Colombia (5%) [54]. En Ecuador, Mora-Pinargote y colaboradores publicaron en 2019 un estudio usando un tamaño muestral de 991 cepas provenientes de 22 de las 24 provincias (años de recolección: 2014-2016), en el cual reportan una prevalencia del genotipo Beijing de 0.43% a nivel nacional [72].

4.4. Tratamiento de la TB y el desarrollo de resistencia a antibióticos

El tratamiento estándar recomendado por la OMS consiste en un ciclo de seis meses con medicamentos antituberculosos de primera línea, que incluyen isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol; además existe un grupo de medicamentos antituberculosos de segunda línea, como las fluoroquinolonas y otros antibióticos inyectables. El tratamiento se divide en dos fases: la fase intensiva, que tiene como objetivo destruir las bacterias con altas tasas de replicación, disminuir los procesos inflamatorios, mejorar los síntomas y signos clínicos, y la fase continua, que está orientada a la eliminación de bacterias en fase de latencia [73, 74]. El tratamiento estándar para pacientes con TB se resume de la siguiente manera: la administración de isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol por un período de dos a tres meses en la fase intensiva; y la administración de isoniazida y rifampicina por cuatro a cinco meses para la fase continua [75, 76]. La multirresistencia en la TB (MDR-TB) se define como la falta de respuesta a dos o más antibióticos de primera línea, al menos rifampicina e isoniazida, mientras que la TB extensamente resistente a antibióticos (XDR-TB) se refiere a la resistencia a al menos uno de los medicamentos de segunda línea además de las características de la MDR-TB [73]. El régimen de tratamiento recomendado para MDR-TB consiste en el uso de al menos cuatro medicamentos durante la fase intensiva: pirazinamida, un inyectable de segunda línea (kanamicina, capreomicina o amikacina), una fluoroquinolona y cicloserina. La primera fase dura aproximadamente 8 meses, mientras que la segunda fase comienza cuando se suspende el medicamento inyectable; en total, el tratamiento puede durar 20 meses. No existe un régimen específico para el tratamiento de XDR-TB; sin embargo, se ha observado éxito en pacientes tratados con seis medicamentos durante la fase intensiva y con cuatro medicamentos en la fase continua [73, 77].

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos usados para el tratamiento de micobacterias se han desarrollado por medio de mutaciones genómicas espontáneas, principalmente SNPs, que se propagan por la replicación de bacterias resistentes dentro del huésped y su posterior transmisión entre infectados, ya que las micobacterias carecen de los mecanismos típicos, como la transferencia horizontal de genes o elementos móviles de resistencia (plásmidos), que se pueden encontrar en otras bacterias [73, 78]. Usualmente, los antibióticos inhiben las proteínas necesarias para la supervivencia bacteriana, por lo que la ocurrencia de mutaciones que confieren resistencia modifica el genoma y puede resultar en una pérdida de aptitud (“fitness”) micobacteriana: crecimiento bacteriano más lento, transmisión reducida o el desarrollo de una enfermedad menos grave [73, 79]. A pesar de las aparentes desventajas asociadas a las mutaciones vinculadas a la resistencia, las micobacterias pueden desarrollar mutaciones secundarias, denominadas mutaciones compensatorias (CM), que restauran de manera parcial o total la aptitud. El surgimiento de una CM varía dependiendo del antibiótico que se utilice en la terapia, ya que reducen las funciones específicas comprometidas por las mutaciones de resistencia [78–80]. Sin embargo, algunas cepas resistentes parecen tener una ventaja sobre las cepas susceptibles al provocar una buena parte de los casos de TB en determinadas comunidades, ciudades, países o incluso regiones más amplias, causando brotes importantes en diferentes partes del mundo, lo que puede deberse a que las micobacterias que pertenecen a clados estrechamente relacionados y altamente transmisibles, se suelen asociar con el desarrollo de resistencia a los medicamentos [79, 80]. En 2021, Ektefaie y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo de 10299 aislados clínicos de MTBC recolectados entre 1987 y 2014 con datos de susceptibilidad a fármacos basados en cultivo y en secuenciación del genoma completo (WGS), estableciendo que las tasas de multirresistencia por linaje fueron del 3% para el linaje 1, 48% para el linaje 2, 4% para el linaje 3 y 23% para el linaje 4 [81]. Estos informes concuerdan con lo publicado por Alame et al. en 2021 en el que resumen las cepas MTBC responsables de diferentes brotes históricos, por ejemplo: L2-Beijing “moderno” en Rusia, Europa del Este y Uzbekistán; L2-Beijing “antiguo” en Sudáfrica; L4.3.3 en Sudáfrica; L4.3.4.2 RD^{Rio} en Portugal; L4.1.2.1 en Argentina; y L4-LAM9 en Panamá [80]. Estos hallazgos sugieren que las cepas de los linajes L2 y L4 parecen tener ventajas propias asociadas con una mayor transmisión, mayor virulencia, mayor probabilidad de fallo del tratamiento y mayor tendencia a desarrollar resistencia a los medicamentos. Además, presentan una

mayor frecuencia de CM en comparación con otras cepas, y una mayor tasa de mutación para la adquisición de resistencia, pero con pocas diferencias entre cepas evolutivamente relacionadas [78, 80]. Sin embargo, es importante considerar otros factores del huésped y del entorno que pueden favorecer la distribución de las micobacterias drogo resistentes [78].

4.5. Diagnóstico molecular de micobacteriosis

El diagnóstico de MTB y otras micobacteriosis puede realizarse con una gran cantidad de técnicas, desde microscopía de frotis, histopatología y cultivo hasta el uso de inmunoensayos cromatográficos y métodos serológicos para detectar e identificar micobacterias. Los métodos moleculares destacan como técnicas que permiten un diagnóstico rápido y alternativas de cribado con alta especificidad y sensibilidad cuando se usan en combinación con métodos clásicos [82]. Las pruebas de diagnóstico molecular ofrecen una solución más simple y rápida para detectar la resistencia a los medicamentos en comparación con los métodos fenotípicos que consumen mucho tiempo, además, las pruebas de laboratorio no siempre son posibles en entornos con recursos limitados debido a los requisitos de infraestructura y personal capacitado [83].

Existen dos grupos principales de micobacterias de importancia clínica y distribución global: miembros del MTBC que causan tuberculosis, y micobacterias atípicas o no tuberculosas (NTM). Estos últimos son microorganismos ubicuos y oportunistas que pueden causar enfermedades en individuos inmunodeprimidos, además de exhibir una capacidad inusual para sobrevivir en condiciones ambientales particulares y extremas [84–86]. El grupo de NTM comprende cualquier micobacteria que no sea MTBC o *Mycobacterium leprae*, incluyendo más de 190 especies y subespecies con una amplia gama de habilidades para causar enfermedades pulmonares y extrapulmonares [87, 88]. En países con carga alta de TB, la detección y el tratamiento de las NTM son rara vez realizadas por el desconocimiento de enfermedades ocasionadas por dichas micobacterias y un acceso limitado a técnicas para la identificación micobacteriana a nivel de especie. Es común que en países en vías de desarrollo y de desarrollo intermedio, la detección de MTB se base en la microscopía y el cultivo por ser métodos de referencia; sin embargo, las NTM a menudo se pasan por alto o se confunden con MTB porque estos métodos no permiten una discriminación precisa entre

MTBC y NTM, ocasionando que los pacientes reciban un tratamiento inadecuado con medicamentos antituberculosos [86, 87, 89]. Como los tratamientos con antibióticos son totalmente diferentes para esos dos grupos de micobacterias [5, 14, 86], existen varias metodologías para la discriminación entre MTBC o MNT, incluidas pruebas bioquímicas [85, 86], secuenciación de Sanger [86, 87] o MALDI-TOF MS [89–92]. También se han descrito protocolos de PCR “in-house” para una discriminación rápida de MTBC y MNT, además de la comercialización de diversos kits basados en tecnología PCR en tiempo real: Advansure TB/NTM real-time PCR kit [93], Anyplex MTB/NTM real-time detection assay V2.0 [94], EZplex MTBC/NTM Real-Time PCR kit [95], VIASURE Real Time PCR Detection Kit – *M. tuberculosis* Complex + Non-tuberculous mycobacteria [96], Mycobacterium Multiplex Nucleic Acid Diagnostic Kit (Multiplex PCR-Fluorescence Probing) [97], por mencionar algunos.

La detección de MTB mediante herramientas moleculares de diagnóstico se presta a incluir la detección de resistencia a medicamentos antituberculosos, debido a que los mecanismos de resistencia se asocian a mutaciones genéticas bien caracterizadas [98, 99]. Entre la diversidad de pruebas de diagnóstico molecular desarrolladas y aprobadas por la OMS, el sistema GeneXpert MTB/RIF es el más utilizado a nivel mundial para la detección de TB y resistencia a rifampicina, generando un incremento en el diagnóstico y vigilancia de cepas resistentes en regiones con una alta carga de TB [5, 100].

4.6. Técnicas moleculares usadas en la epidemiología de MTBC.

El uso de herramientas moleculares ha contribuido a mejorar la comprensión de la dinámica de transmisión y las características evolutivas de epidemias y brotes de TB en diferentes países, usando marcadores genéticos específicos. El patógeno es un microorganismo genéticamente conservado, por lo que el desarrollo y estandarización de métodos de genotipificación han permitido comprender mejor la estructura poblacional, mientras se incrementaba su poder discriminatorio [39, 41]. La selección de un método de genotipificación depende principalmente de las tasas de mutación de un marcador molecular que afectan el poder de resolución, la disponibilidad de recursos, la experiencia técnica necesaria y el número de aislados a analizar, ya que estos factores influyen directamente en el costo de los ensayos [39]. Por lo tanto, en América Latina es común el

uso de técnicas más clásicas, como IS6110-RFLP, espoligotipado, MIRU-VNTR de 12, 15 y/o 24 loci; sin embargo, la secuenciación del genoma completo (WGS) se ha vuelto más popular en los últimos años a medida que la tecnología se ha desarrollado y se ha hecho más asequible. No obstante, se suelen realizar una combinación de al menos dos técnicas para obtener un mayor poder de discriminación y comparar diferentes métodos [41].

4.6.1. IS6110-RFLP

El método se basa en la identificación de copias de la secuencia de inserción IS6110. La metodología se estandarizó en 1993 y consiste en la digestión del ADN micobacteriano con la enzima de restricción *PvuII*, seguida de la separación electroforética de los fragmentos resultantes. Luego se realiza una hibridación “Southern” utilizando una sonda para detectar el número de copias y la posición de las secuencias de inserción IS6110, estableciendo así una huella digital de ADN específica de la cepa [82, 101]. Aunque es un método lento que requiere técnicos altamente experimentados, el uso de IS6110-RFLP sigue siendo popular debido a su alto poder de discriminación y reproducibilidad, necesarios para la tipificación de cepas [82].

4.6.2. Espoligotipado: Tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping)

El espoligotipado es una herramienta de genotipificación que detecta la variabilidad en la región de repeticiones directas (DR) del genoma de MTBC. El método se basa en la presencia o ausencia de 43 secuencias espaciadoras de ADN, que se encuentran intercaladas entre 36 loci conservados ubicados en la región DR [101, 102]. Es un método basado en PCR que amplifica los loci DR usando los primers DRa y DRb, seguido de la hibridación de los productos a una membrana que contiene oligonucleótidos para cada secuencia espaciadora. La membrana se procesa para obtener una película que proporciona una señal positiva o negativa que se registra en formatos binario u octal para la interpretación genotípica utilizando bases de datos públicas como SpolDB4 y SITVIT2 [103–105]. Debido a su bajo poder discriminatorio, el método se utiliza comúnmente para la identificación de genotipo a nivel de familia antes que la tipificación a nivel de cepas, por lo que se recomienda su uso en combinación con otros métodos [103–105].

4.6.3. Tipificación de repeticiones en tándem MIRU de número variable (MIRU-VNTR)

El método permite detectar diferentes unidades micobacterianas repetitivas intercaladas (MIRU) ubicadas en múltiples loci del genoma de MTBC. Cada alelo MIRU difiere en el número de repeticiones en tándem, por lo que la técnica de PCR amplifica cada región MIRU y, en función del tamaño del amplicón de cada alelo, se puede discriminar entre cepas. Para fines de genotipificación, cada alelo MIRU se identifica con un número y se genera un perfil numérico [101, 106]. Este código sirve como una huella digital de ADN para utilizarse en diferentes bases de datos, como MIRU-VNTR plus o SITVIT2 [105, 107]. Se utilizan diferentes regiones MIRU para la identificación de cepas y se combinan 12, 15 y 24 loci para la genotipificación. Analizar un mayor número de loci MIRU aumenta el poder de discriminación entre cepas [41, 101]. Los resultados son fáciles de usar e interpretar, lo que permite establecer comparaciones de genotipos, determinar relaciones filogenéticas y su distribución geospacial, ya que es un método de tipificación con alto poder de discriminación [41, 82].

4.6.4. Secuenciación del genoma completo (WGS)

El genoma de MTB se secuenció por primera vez en 1998 utilizando el método de terminación de la cadena de didesoxinucleótidos [101, 108]. Aunque esta técnica es costosa y lenta, el desarrollo de la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido la creación de plataformas de WGS como alternativas para sortear las limitaciones de otros métodos moleculares. En América Latina su uso ha aumentado rápidamente desde 2012 debido al desarrollo de plataformas más rápidas y asequibles [41]. La WGS puede identificar genotipos, predecir el fenotipo de resistencia y determinar las relaciones y dinámicas filogenéticas para guiar la toma de decisiones clínicas. La secuenciación permite crear bibliotecas micobacterianas para catalogar variantes, establecer la filogenia de las cepas MTBC circulantes y correlacionar las mutaciones con la resistencia a los antibióticos, ya que el método de WGS examina alrededor del 90% del genoma micobacteriano en lugar de una pequeña porción (~1%) que analizan otros métodos de genotipificación [101, 109].

4.6.5. Bioinformática para el análisis de linajes MTB

La plataforma MIRU-VNTR plus (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) es una base de datos de acceso abierto creada a partir de una colección de 196 cepas de referencia de los linajes principales de MTBC. Proporciona información sobre el origen geográfico, perfil de susceptibilidad a antibióticos, linajes filogenéticos y perfiles MIRU-VNTR de cada cepa, además de otras características [107]. SITVITWEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/) es una base de datos internacional que incorpora información de múltiples marcadores para proporcionar una visión general de la diversidad genética de las cepas de MTBC en todo el mundo. Se basa en más de 62.000 aislados clínicos de 153 países [104]. SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>) es actualmente la base de datos internacional más grande de genotipificación de MTBC, con una recopilación de 111 635 aislados del patógeno de 169 países. Proporciona información sobre las características genóticas, perfiles de resistencia a antibióticos, datos epidemiológicos e información demográfica de cada cepa [105].

Debido a la gran cantidad de información que produce la WGS, el desarrollo de bases de datos amigables para el usuario y de herramientas de análisis genómicos para personas con mínimas habilidades bioinformáticas, ha permitido incrementar el análisis de enormes cantidades de datos genómicos brutos [110]. Existen muchas herramientas gratuitas disponibles en línea para el análisis de datos de secuencias micobacterianas, como TB Profiler [111, 112], Mykrobe Predictor TB [112], CASTB [112], KvarQ [111, 112], PhyResSE [112, 113] y SAM-TB [114].

5. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* son los patógenos responsables de la TB, una de las principales causas de muerte por agente infeccioso en el mundo junto con el COVID-19 y el VIH/SIDA [5]. La enfermedad afecta principalmente a los países con bajo desarrollo socioeconómico, especialmente a individuos de estratos económicos bajos y que pertenecen a grupos vulnerables. En el 2022, la OMS estimó alrededor de 10.6 millones de casos de TB y 1.3 millones de muertes a nivel mundial, un panorama que se había visto agravado por la pandemia de COVID-19 en el 2020 que provocó una disminución importante en el número de casos nuevos de TB [5]. En el 2022, la OMS estimó para Ecuador 8200 casos de TB, de los cuales 390 estaban asociados a MDR-TB; sin embargo, las autoridades notificaron 7388 casos, de los cuales 474 presentaron MDR-TB, evidenciando un problema grave de subdiagnóstico [25].

La TB presenta un espectro clínico complejo que está determinado por diversos factores asociados al huésped, al ambiente y al patógeno. El estudio del MTBC usando biomarcadores genéticos es crucial para identificar linajes y asociarlos con características de virulencia o de resistencia [11]. En los últimos años, se han realizado varios estudios en Ecuador para determinar la estructura poblacional de aislados de MTB y su relación con la resistencia a antibióticos. Los resultados de estos estudios muestran que los sublinajes L4, especialmente LAM, son los más prevalentes en el país, mientras que la prevalencia del genotipo Beijing es una de las más bajas de la región [22, 55–57].

Dado a que en los países vecinos de Colombia y Perú las prevalencias de genotipos LAM-RD^{Rio} y Beijing se encuentran entre las más altas de la región [54, 63, 65], la realización de este estudio permitirá brindar un enfoque más preciso al panorama genético de las cepas circulantes de TB dentro del Ecuador. Además, generará los primeros aportes acerca de los efectos migratorios humanos en la dispersión de la enfermedad en las zonas de frontera con Colombia y Perú, comparándolos con eventos similares que se reportan en otros países de la región.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la transmisibilidad de cepas MTBC a través de las fronteras de Ecuador con Colombia y Perú, a través del análisis genotípico de las colecciones de cepas disponibles procedentes de las provincias fronterizas de Esmeraldas y El Oro.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia y prevalencia del linaje RD^{Rio} de MTB en Ecuador y comparar con los reportes de Perú, Colombia y Venezuela.
- Conocer la diversidad genética del agente causal de tuberculosis humana en la provincia de Esmeraldas, en la frontera de Ecuador con Colombia, y estudiar la existencia de clústeres de transmisión activa transfronterizos.
- Conocer la diversidad genética del agente causal de tuberculosis humana en la provincia de El Oro, en la frontera de Ecuador con Perú, y estudiar la existencia de clústeres de transmisión activa transfronterizos.
- Estudiar el desempeño clínico de protocolos de PCR comerciales para el diagnóstico diferencial de Micobacterias tuberculosas y no tuberculosas.

7. RESULTADOS: TRABAJOS PUBLICADOS

7.1. Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in El Oro: a first insight into Ecuador-Peru tuberculosis transmission.

Publicado en: Journal of Infection and Public Health

Fwd: Your Submission

Miguel Angel Garcia Bereguiain <magbereguiain@gmail.com>

Tue 1/23/2024 7:38 AM

To: Bernardo Castro <bcr2483@gmail.com>; Bernardo David Castro <bernardo.castro@udla.edu.ec>

PRECAUCIÓN: este correo electrónico proviene de una fuente externa. Tenga cuidado con los enlaces y archivos adjuntos

Mail aceptación artículo 2

----- Forwarded message -----

From: **Journal of Infection and Public Health** <em@editorialmanager.com>

Date: Mon, Jan 22, 2024 at 8:24 AM

Subject: Your Submission

To: Miguel Angel Garcia-Bereguiain <magbereguiain@gmail.com>

Ms. Ref. No.: JI-PH-D-23-01778R1

Title: Population structure of Mycobacterium tuberculosis in El Oro: a first insight into Ecuador-Peru tuberculosis transmission.

Journal of Infection and Public Health

Dear Dr Miguel Angel Garcia-Bereguiain,

I am pleased to inform you that your paper "Population structure of Mycobacterium tuberculosis in El Oro: a first insight into Ecuador-Peru tuberculosis transmission." has been accepted for publication in Journal of Infection and Public Health.

By submitting your paper to Journal of Infection and Public Health you agree and acknowledge the journal is an Open Access journal. If your paper is successful and accepted by the Editor your article will be subject to an article processing fee.

An invoice will be issued post acceptance.

More information about the journal and the APC can be found here:

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-infection-and-public-health/1876-0341/guide-for-authors>

Thank you for submitting your work to Journal of Infection and Public Health.

Yours sincerely,

Sameera Al Johani

Editor in Chief

Journal of Infection and Public Health

2022 Impact Factor 6.7

2022 CiteScore 11.1

Indexed in Medline

<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-infection-and-public-health/>

Comments from the editors and reviewers:

Reviewer #1: Dear editor

The authors are responded points by points.

Reviewer #2: Thank you for your submission. I thing it can be accepted for publication.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5l8thD9XtE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript (https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/).

#AU_JI-PH#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ji-ph/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in El Oro: a first insight into Ecuador-Peru tuberculosis transmission.

Bernardo Castro ^{1,2}, Kerly León-Ordóñez^{1,3}, Greta Franco-Sotomayor ^{4,5}, José María Benítez-Medina⁶, Natalia Jiménez-Pizarro⁶, Greta Cárdenas-Franco¹, Juan Carlos Granda⁴, Juan Luis Aguirre-Martínez⁵, Solon Alberto Orlando^{4,7} Javier Hermoso de Mendoza⁶, Miguel Ángel García-Bereguai^{1*}.

1. One Health Research Group. Universidad de las Américas. Quito, Ecuador.
2. Programa de Doctorado de Salud Pública Humana y Animal. Universidad de Extremadura. Cáceres. Spain.
3. Yachay Tech University. Urcuquí. Ecuador.
4. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Leopoldo Izquieta Pérez”. Guayaquil, Ecuador.
5. Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Guayaquil. Ecuador.
6. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres. Spain.
7. Universidad Espíritu Santo. Guayaquil. Ecuador.

* Corresponding author: Miguel Angel Garcia-Bereguai (magbereguai@gmail.com).

1 **Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in El Oro: a first insight**
2 **into Ecuador-Peru tuberculosis transmission.**

3 **Abstract.**

4 *Background.* Tuberculosis (TB) is a major public health concern in Ecuador and Peru, both
5 settings of high burden of drug resistance TB. Molecular epidemiology tools are important
6 to understand the transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC)
7 and to track active transmission clusters of regional importance. This study is the first to
8 address the transmission of TB between Peru and Ecuador through the population
9 structure of MTBC lineages circulating in the Ecuadorian border province of "El Oro".

10 *Methods.* A total number of 56 MTBC strains from this province for years 2012-2015 were
11 included in the study and analyzed by 24-loci MIRU-VNTR and spoligotyping.

12 *Results.* Genotyping revealed a high degree of diversity for MTBC in "El Oro", without
13 active transmission clusters. MTBC L4 was predominant, with less than 2% of strains
14 belonging to MTBC L2-Beijing.

15 *Conclusions.* These results may suggest that TB dynamics in this rural and semi-urban area
16 would not be linked to highly transmitted strains like MTBC L2-Beijing from Peru, but
17 related to TB relapse; although further studies with larger MTBC cultures collection from
18 recent years are needed. Nevertheless, we recommend to reinforce TB surveillance
19 programs in remote rural settings and border regions in Ecuador.

20 **Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; molecular epidemiology; MIRU-
21 VNTR; Spoligotyping; migration; border transmission; Ecuador; Peru.

22

23

24

25 Introduction

26 Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis*
27 Complex (MTBC). MTBC includes lipid-rich cell wall, acid-fastness, slow growth, intracellular,
28 rod-shaped, aerobic airborne pathogens that spreads by close person-to-person contact.
29 MTBC can infect lungs (pulmonary TB) or other organs and tissues (extrapulmonary TB)¹⁻³.
30 The MTBC comprises a group of bacteria with 99% of nucleotide identity classified in seven
31 main lineages with different features in global distribution, virulence, transmission and
32 antibiotic resistance⁴. Therefore, genetic characterization of MTBC lineages is crucial to
33 improve TB surveillance and control programs⁵.

34 The World Health Organization (WHO) estimated for Ecuador a total number of 8500 new
35 TB cases and 950 deaths for Ecuador in 2020. In that year, the Ecuadorian Ministry of Health
36 reported 5469 TB cases, 256 (4.7%) multiple drug resistance TB (MDR-TB)⁶. The provinces
37 with higher TB incidence were Guayas (55%), El Oro (7.3%) and Los Ríos (6%)⁷. Although
38 Ecuador is a high burden setting, molecular epidemiology studies of TB are scarce⁸⁻¹¹. There
39 is a single country wide study addressing the population structure and genetic diversity of
40 MTBC, reporting that MTBC lineage 4 (L4) sublineage LAM is predominant and lineage 2 (L2)
41 sublineage Beijing has a much lower prevalence compared to Colombia and Peru⁸.

42 The WHO estimated for Peru a total number of 38000 new TB cases and 2890 deaths. In the
43 same year, the Peruvian Ministry of Health reported 24581 TB cases, 1540 (6.4%) were
44 MDR-TB¹². Previous studies showed MDR/extensively drug resistant (XDR) MTBC clusters
45 that have been spreading in Peru since 2007¹³⁻¹⁷. Those strains belong to L4 but also to
46 lineage 2 (L2) sublineage Beijing¹⁶⁻¹⁸.

47 This scenario makes Peru a hot spot for MDR and XDR TB and a challenge for TB control in
48 the South American region¹²⁻¹⁸, specially to neighbor countries like Ecuador. There was only
49 one report studying transnational TB transmission between Ecuador and their neighbor
50 countries where only two small MTBC clonal complexes between Ecuador and Colombia
51 were found⁸. However, MTBC strains from the border provinces with Peru were
52 underrepresented in that study and transmission between Peru and Ecuador could not be
53 totally ruled out⁸.

54 The aim of this study was to describe the population structure of MTBC at El Oro province
55 in the border of Ecuador and Peru and to analyze the potential transmission between those
56 countries.

57 **Materials and Methods**

58 *Mycobacterium tuberculosis isolates.*

59 A collection of 56 MTBC isolates from years 2012 to 2016 stored at "Centro Nacional de
60 Referencia para Micobacterias" from "Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación
61 Leopoldo Izquieta Pérez" (INSPI) in Guayaquil (Ecuador) was included in the study. For
62 demographics of the study population see Supplementary Material 1. This collection of 56
63 MTBC isolates includes all the MTBC strains available at the time this study was carried out
64 from the provinces located in the border of Peru and Ecuador. In fact, those 56 MTBC
65 isolates were from a single province, El Oro, the most populated province at the Ecuador-
66 Peru border. MTBC isolates were cultured and tested for first- and second-line drugs used
67 in TB therapy following Pan American Health Organization guidelines^{19,20} at the "Centro
68 Nacional de Referencia para Micobacterias". However, at the point of care facility,
69 bacilloscopy is the main diagnosis tools assisted by MTBC culture in a laboratory located in

70 this province, following the guidelines of Pan American Health Organization, so none of the
71 molecular epidemiology methods implemented in this study were including in the National
72 Surveillance TB program in Ecuador. The access to this MTBC strains collection was
73 approved by IRBs from INSPI and University San Francisco de Quito (code 2017-023IN). All
74 samples were anonymized, and no personal data of the patients were made available.

75 *Mycobacterium tuberculosis* heat inactivation and DNA isolation

76 A small sample from cultures of MTBC isolates was collected and resuspended in TE buffer
77 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), then inactivated by boiling at 95°C for 45 min. After
78 this process, samples were centrifuged for 5min at 10000 g and the supernatant was directly
79 used for genotyping, as reported elsewhere^{21,22}.

80 *MTBC strains MIRU-VNTR genotyping.*

81 This is one of the gold standard method for molecular epidemiology of TB that have been
82 used worldwide for over 20 years²³⁻²⁶. This method is PCR-based and allows the detection
83 of different Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) located at multiple loci in
84 the MTBC genome. Each MIRU allele is identified by a number, thus generating a numerical
85 profile which is used for genotyping studies²³⁻²⁵. The PCR reaction was prepared individually
86 to a final volume of 15uL: 7.5uL of GoTaq® Green Mastermix (Promega, Wisconsin, USA)
87 (1X), 0.75uL of MIRU primers (0.5uM), 1uL of mycobacterial DNA and completed with
88 Nuclease-Free water. The following PCR program was established for all MIRUs: initial
89 denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 1 min, 54°C for 1 min 30 s, 72°C for 1
90 min 30 s, and a final extension step of 72°C for 10 min. Amplicons were observed in 2%
91 UltraPure™ Agarose (Invitrogen, California, USA) gels of 15 cm x 10 cm in 0.5X Tris-boric
92 acid-EDTA (TBE) buffer at 100V for 3h using a ladder 100bp Plus Opti-DNA Marker (Cat.No.:

93 G016, Applied Biological Materials Inc., British Columbia, Canada) for size determination.

94 MIRU allele identification was performed according to Supply et al.²⁶.

95 *MTBC strains spoligotyping*

96 This is one of the gold standard method for molecular epidemiology of TB that have been
97 used worldwide for over 30 years^{27,28}. The method is based on the presence/absence of 43
98 DNA spacer sequences, which are interspersed between 36 conserved loci located in the
99 Direct Repeat (DR) region^{27,28}. Spoligotyping was performed as described elsewhere: PCR
100 amplification of DR loci was performed using DRa and DRb primers; PCR products were
101 biotinylated and hybridized to a membrane containing oligonucleotides for each spacer
102 sequence, then incubated with streptavidin-peroxidase conjugate (Roche, USA). Membrane
103 was exposed to chemiluminescent Amersham ECL reagents (GE Healthcare, UK) and located
104 in an X-Ray cassette on a Hyperfilm ECL (Merck, USA). The film was developed, and a
105 positive/negative signal is recorded in binary or octal formats for genotyping
106 interpretations. The results are compared against the fourth international spoligotyping
107 database (SpolDB4)^{27,28}.

108 *Phylogenetic analysis of MTB strains.*

109 For phylogenetic analysis, 24 MIRU-VTNR and spoligotyping patterns for the 56 MTBC
110 strains from years 2012-2016 from El Oro were used. Additionally, information from MTBC
111 strains from Ecuador and Peru was retrieved from the bibliography and included in the
112 study: 142 MTBC strains (15 MIRU-VNTR and spoligotyping patterns) from Peru for years
113 2007-2009¹⁶, 68 MTB strains (spoligotyping patterns) from Peru for years 2011-2015¹⁷ and
114 300 isolates (24 MIRU-VNTR pattern) from Ecuador from years 2012-2016⁸ (Supplementary
115 Table 1).

116 Genotyping data were analyzed using the MIRU-VNTRplus web application (www.miru-
117 vnrplus.org)²⁹. Lineage identification was performed by similarity search using MIRU-VNTR
118 and spoligotyping information, using categorical distance measure (MIRU-VNTR weight: 1,
119 Spoligo weight: 1). Calculation of Neighbour-joining Tree (NJT) and Minimum Spanning Tree
120 (MST) was performed using MIRU-VNTR and/or Spoligotyping information when available.

121 **Results**

122 *Drug susceptibility testing of MTBC strains from El Oro Province.*

123 The information for drug susceptibility testing was available for 25 of the 56 MTBC isolates:
124 5/25 (20%) were resistant to isoniazid (2/5 were monoresistant to INH), 3/25 (12%) were
125 resistant to streptomycin (1/3 was monoresistant to SM), 2/25 (8%) were resistant to
126 ethambutol, 3/25 (12%) were resistant to rifampicin, 2/25 (8%) were resistant to
127 pyrazinamide (3.6%). Isolates resistant to isoniazid and rifampicin (MDR) were 3/25 (12%).
128 On the other hand, 19/25 (76%) isolates were sensible to all the drugs tested (Table 1).

129 *Population structure of MTBC strains from EL Oro province.*

130 The 56 MTBC strains from El Oro were analyzed using 24-loci MIRU-VNTR and spoligotyping.
131 A Neighbor Joining Tree (NJT) based on this genotypic information was done (Figure 1). The
132 lineage distribution revealed a high degree of diversity without any active transmission
133 clusters. Although spoligotyping-based clusters were observed, no clusters without any
134 single loci variation for 24-loci MIRU-VNTR was found (Figure 1). The MTBC lineage for El
135 Oro province was: L2-sublineage Beijing 1/56 (1.8%); and L4 55/56 (98.2%), with sublineages
136 Cameroon 2/56 (3.6%), Ghana 7/56 (12.5%), Haarlem 14/56 (25%), LAM 26/56 (46.4%), S

137 5/56 (8.9%) and Uganda I 1/56 (1.8%) (Figure 1 and Figure 2). The information of drug
138 susceptibility for each MTBC lineage is included in Supplementary Table 2.

139 *Comparision of population structure of MTBC strains from El Oro province, Ecuador and*
140 *Peru.*

141 The geographic distribution of MTBC strains and lineage distribution for El Oro province,
142 Ecuador and Peru are presented in Figure 2.

143 The lineage distribution of MTBC strains from Ecuador (excluding El Oro province) was: L2-
144 sublineage Beijing 4/300 (1.3%); and L4 296/300 (98.7%), with sublineages Cameroon
145 16/296 (5.4%), Ghana 16/296 (5.4%), Harleem 95/296 (32.1%), LAM 132/296 (44,6%), NEW-
146 1 1/296 (0.3%), S 21/296 (7.1%) and Uganda I 14/296 (4.7%) (Figure 2). As it was detailed in
147 the methods, these strains were retrieved from our previous study⁸.

148 The lineage distribution of MTBC strains from Peru (2007-2009) was: L2-sublineage Beijing
149 12/142 (8.5%); L2 130/142 (91.5%), with sublineages Cameroon 7/130 (5.4%), Haarlem
150 66/130 (50.8%), LAM 43/130 (33.1%), NEW-1 5/130 (3.8%), Uganda I 4/130 (3.1%),
151 Uganda II 2/130 (1.5%) and X 3/130 (2.3%). The lineage distribution of MTBC strains from
152 Peru (2011-2015) was: L2-sublineage Beijing 6/68 (9.8%); L3- sublineage Delhi/CAS 1/68
153 (1.5%); L4 61/68 (89.7%), with sublineages Ghana 6/61 (9.8%), H37Rv 9/61 (14.7%),
154 Haarlem 10/61 (16.4%), LAM 9/61 (14.7%), S 6/61 (9.8%), Uganda I 15/61 (24.6%), X 2/61
155 (3.3%). As it was detailed in the methods, these strains were retrieved from our previous
156 study^{16,17}.

157 Figure 3 represents the Minimum Spanning Tree (MST) for MTBC strains from Ecuador (300
158 isolates) and El Oro (56 isolates) using 24-loci MIRU-VNTR information. The Neighbor Joining

159 Tree (NJT) is provided in Supplementary Figure 1. This province was highly represented in
160 this analysis as the number MTBC strains from the most populated provinces of Pichincha
161 and Guayas were 59 and 111, respectively. There was a strong segregation of 42 out of the
162 56 MTBC strains from El Oro compared to the rest of Ecuador. Within those 42 strains,
163 delimited groups of 17 MTBC strains sublineage LAM, 12 MTBC strains sublineage
164 Harleem, 5 MTBC strains sublineage S and 8 MTBC strains sublineage Ghana were identified;
165 also, 3 clonal complexes were found only including MTBC strains from El Oro, with a
166 maximum of 2 loci difference in 24 MIRU-VNTR pattern (Figure 3). On the other hand, 14
167 MTBC strains from El Oro were clearly dispersed within the MTBC strains from the rest of
168 Ecuador, and 4 clonal complexes including MTBC strains from El Oro and other provinces of
169 Ecuador were found (sublineages LAM, Haarlem and Ghana). Interestingly, the 4 MTBC
170 strains L2-Beijing from Ecuador and the only strain from this sublineage in El Oro were not
171 located together within a branch in the NJT (Supplementary Figure 1).

172 Figure 4 represents the Minimum Spanning Tree (MST) for MTBC strains from Peru (142
173 isolates, years 2007-2009) and El Oro (56 isolates, years 2012-2016) using 15-loci MIRU-
174 VNTR information, as only 15 loci were available for those Peruvian strains¹⁶. The Neighbor
175 Joining Tree (NJT) combining 15 MIRU-VNTR and spoligotyping is provided in
176 Supplementary Figure 2. There was a strong segregation of 34 out of the 56 MTBC strains
177 from El Oro compared to the MTBC strains from Peru. There was a single clonal complex for
178 MTBC strains from El Oro exclusively. No clonal complexes were identified including MTBC
179 strains from Peru and El Oro. This result was consistent in both the MST (Figure 4) and NJT
180 analysis (Supplementary Figure 2). The only L2-Beijing MTBC strain from El Oro was located
181 within the same branch with L2-Beijing strains from Peru, but did not represented an active
182 cluster (Supplementary Figure 2).

183 Figure 5 represents the Minimum Spanning Tree (MST) for MTBC strains from Peru (68
184 isolates, years 2011-2015) and El Oro (56 isolates, 2012-2016) using spoligotyping
185 information, the only genotyping information available for those Peruvian strains¹⁷. Within
186 the reduced segregation capacity of spoligotyping method for active transmission events,
187 well defined clonal complexes of L4 sublineages and L2-Beijing including MTBC strains from
188 El Oro and Peru were observed.

189 Finally, a global phylogenetical comparison including 15-loci MIRU-VNTR information for
190 MTBC strains from El Oro, Ecuador and Peru was done (MST in Figure 6). Four clonal
191 complexes were found including MTBC strains from El Oro and Ecuador. However, no clonal
192 complexes including MTBC strains exclusively from El Oro and Peru were found. Meanwhile,
193 a big clonal complex including MTBC strains from Peru and Ecuador belonging to L4-Harleem
194 sublineage was identified. Also, a large clonal complex including MTBC strains from El Oro,
195 Ecuador and Peru, belonging to L4-LAM sublineage was also found.

196 ***Discussion.***

197 The rapid identification of active transmission complexes of MTBC is crucial to improve TB
198 surveillance and control, as it has been done in multiple studies worldwide^{8,17,18,30}. This
199 study aimed to understand the potential transmission of MTBC strains from Peru to Ecuador
200 analyzing the dominant MTBC genotypes in the border province of El Oro.

201 The population structure of MTBC in El Oro showed a high genetic variability. No active
202 transmission clusters were found for 24-MIRU-VNTR typing. Moreover, the majority of
203 MTBC strains from El Oro were segregated from the strains of Ecuador, although 4 clonal
204 complexes including strains from El Oro and other provinces were also found. This high level
205 of variability within a reduced rural and semi-urban geographical area has been also

206 described in other countries like Panama³⁰, China³¹ or Canada³² and the lack of active
207 transmission clusters despite the relatively high incidence of TB could be explained as the
208 consequence of relapse of latent tuberculosis cases³⁰⁻³². Nevertheless, the MTBC lineages
209 within El Oro were mainly L4 and less than 2% of L2-Beijing, as it has been already described
210 for Ecuador⁸. However, L2-Beijing sublineage is one of the most prevalent worldwide^{31,32,33},
211 while in the Americas is only present at high prevalence in Cuba, Colombia and Peru, with
212 more than 8% prevalence for the last one^{17,18,33}. As this MTBC lineage has been associated to
213 high transmissibility, virulence and drug resistant TB, its potential spread from Peru to other
214 regions of South America is a matter of concern^{21,22,33}. Interestingly, the L2-Beijing strain
215 from El Oro province was phylogenetically closer to L2-Beijing strains from Peru than
216 Ecuador. Although it did not represented a recent transmission event, surveillance of MBTC
217 lineages should be implemented to track active transmission clusters in rural and semi-
218 urban settings in Latin America to improve TB control³⁴. Although the findings of our study
219 and others³⁰⁻³² did not explain the MTBC dynamics from TB active transmission perspective
220 but probably due to TB relapse, this was not always the case. Other studies carried out in
221 high burden urban settings showed that the MTBC population structure was influenced by
222 recent active transmission events as it has been described in Panama³⁴, Angola³⁵ or
223 Tunisia^{36,37}.

224 This study had some limitations and our results should be interpreted with caution. First,
225 we could access only a collection of 56 MTBC strains from El Oro from years 2012 to 2016,
226 so we could not totally rule out that the current TB transmission scenario could have
227 changed. We call the attention to the high level of migration across the Ecuador-Peru border
228 in recent years due to the migratory crisis following the economic collapse of Venezuela³⁸.
229 Second, the phylogenetic analysis had different resolutions depending of the data available:

230 for instance, MTBC strains from Ecuador were from years 2012-2016 and had 24 loci MIRU-
231 VNTR but only MTBC strains from El Oro had spoligotyping information. Third, MTBC strains
232 collection from Peru and Ecuador had a geographical bias as most of those strains came
233 from Lima and Guayaquil, the most populated cities^{8,16,17}.

234 In conclusion, cost-effective molecular epidemiology tools remain useful for middle and
235 high burden TB settings in Latin America where Whole Genome Sequencing is still a
236 challenge. TB control and surveillance programs should consider a wider implementation of
237 those methods either to track potential outbreaks of highly transmissible MTBC strains or
238 to identify regional features explaining the TB prevalence in rural and semi-urban settings.

239 **Author statements.** All the authors endorsed submission of the manuscript in its present
240 form.

241 **Conflict of interest.** Nothing to declare.

242 **References.**

243 [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva, Switzerland:
244 World Health Organization; 2020.

245 [2] Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Jawetz, Melnick
246 & Adelberg's Medical Microbiology. 28th ed. New York, USA: McGraw Hill; 2019.

247 [3] Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology. 9th Edition. USA: Elsevier;
248 2020.

249 [4] Gagneux S, editor. Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role
250 in Biology, Epidemiology and Control. vol. 1019. Cham: Springer International Publishing;
251 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7>.

- 252 [5] Woodman M, Haeusler I, Grandjean L. Tuberculosis Genetic Epidemiology: A Latin
253 American Perspective. *Genes* 2019;10:53. <https://doi.org/10.3390/genes10010053>.
- 254 [6] World Health Organization. Perfil de Tuberculosis: Ecuador n.d.
255 [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type="country"&lan="](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=)
256 [ES"&iso2="EC"](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=) (accessed October 15, 2021).
- 257 [7] Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Boletín Anual Tuberculosis 2018. Dirección
258 Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Subsecretaría de Vigilancia de la Salud Pública -
259 Ministerio de Salud Pública; 2018.
- 260 [8] Garzon-Chavez D, Garcia-Bereguaiin MA, Mora-Pinargote C, Granda-Pardo JC, Leon-
261 Benitez M, Franco-Sotomayor G, et al. Population structure and genetic diversity of
262 *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador. *Sci Rep* 2020;10:6237.
263 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62824-z>.
- 264 [9] Zurita J, Espinel N, Barba P, Ortega-Paredes D, Zurita-Salinas C, Rojas Y, et al. Genetic
265 diversity and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador. *Int J Tuberc Lung*
266 *Dis* 2019;23:166–73. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0095>.
- 267 [10] Garzon-Chavez D, Zurita J, Mora-Pinargote C, Franco-Sotomayor G, Leon-Benitez M,
268 Granda-Pardo JC, et al. Prevalence, Drug Resistance, and Genotypic Diversity of the
269 *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family in Ecuador. *Microbial Drug Resistance*
270 2019;25:931–7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0429>.
- 271 [11] Ortiz-Jiménez J, Franco-Sotomayor G, Ramos-Ramirez M. Validación e implementación
272 de GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico de tuberculosis en Ecuador. *Kasmera* 2019;47:29–
273 37.

- 274 [12] World Health Organization. Perfil de Tuberculosis: Perú n.d.
275 [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22PE%22)
276 [&lan=%22ES%22&iso2=%22PE%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22PE%22) (accessed October 15, 2021).
- 277 [13] Del Castillo H, Mendoza-Ticona A, Saravia JC, Somocurcio JG. Epidemia de tuberculosis
278 multidrogo resistente y extensivamente resistente a drogas (TB MDR/XDR) en el Perú:
279 situación y propuestas para su control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud*
280 *Pública* 2009;7.
- 281 [14] Wong P, Puray M, Gonzales A, Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en
282 el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología* 2011;15:12.
- 283 [15] Taype CA, Agapito JC, Accinelli RA, Espinoza JR, Godreuil S, Goodman SJ, et al. Genetic
284 diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru.
285 *Infection, Genetics and Evolution* 2012;12:577–85.
286 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.002>.
- 287 [16] Cáceres O, Rastogi N, Bartra C, Couvin D, Galarza M, Asencios L, et al. Characterization
288 of the Genetic Diversity of Extensively-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical
289 Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Peru. *PLoS ONE* 2014;9:e112789.
290 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112789>.
- 291 [17] Santos-Lazaro D, Gavilan RG, Solari L, Vigo AN, Puyen ZM. Whole genome analysis of
292 extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Peru. *Sci Rep*
293 2021;11:9493. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88603-y>.

- 294 [18] Tarazona D, Galarza M, Levano KS, Guio H. Análisis genómico comparativo de cepas
295 peruanas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2016;33:256.
296 <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2192>.
- 297 [19] Franco-Sotomayor G, Rivera-Olivero IA, Leon-Benitez M, Uruchima-Campoverde SE,
298 Cardenas-Franco G, Perdomo-Castro ME, Cardenas-Franco CS, Ortega-Vivanco J, Abad- Ruiz
299 AS, de Waard JH, Garcia-Bereguain MA. 2020. Fast, simple, and cheap: the Kudoh- Ogawa
300 swab method as an alternative to the Petroff–Lowenstein-Jensen method for culturing of
301 *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 58:e01424-19. <https://doi.org/10>
302 [.1128/JCM.01424-19](https://doi.org/10.1128/JCM.01424-19).
- 303 [20] Franco-Sotomayor G, Garzon-Chavez D, Leon-Benitez M, de Waard JH and Garcia-
304 Bereguain MA. A First Insight into the *katG* and *rpoB* Gene Mutations of Multidrug-
305 Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Ecuador. *Microbial Drug Resistance*.
306 2018. DOI: 10.1089/mdr.2018.0203.
- 307 [21] Garzon-Chavez D, Zurita J, Mora-Pinargote C, Franco-Sotomayor G, Leon-Benitez M,
308 Granda-Pardo JC, et al. Prevalence, Drug Resistance, and Genotypic Diversity of the
309 *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family in Ecuador. *Microbial Drug Resistance*
310 2019;25:931–7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0429>.
- 311 [22] Mora-Pinoargote C, Garzon-Chavez D, Franco-Sotomayor G, Leon-Benitez M, Granda-
312 Pardo JC, Trueba G, et al. Country-wide rapid screening for the *Mycobacterium tuberculosis*
313 Beijing sublineage in Ecuador using a single-nucleotide polymorphism-polymerase chain
314 reaction method. *Int J Mycobacteriol* 2019;8:366-70.

- 315 [23] Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, Stevenson K, Pickup R, Hermon-Taylor J.
316 Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate Mycobacterium avium
317 subspecies paratuberculosis from other species of the Mycobacterium avium complex.
318 Molecular and Cellular Probes 2003;17:157–64. [https://doi.org/10.1016/S0890-](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00047-1)
319 8508(03)00047-1.
- 320 [24] Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-Gerdes S, Willery E, et al.
321 Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-
322 variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol
323 2006;44:4498–510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>.
- 324 [25] Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: Situación
325 epidemiológica, avances y desafíos para su control. Rev Peru Med Exp Salud Publica
326 2017;34:299. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2384>.
- 327 [26] Supply P. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of Mycobacterium
328 tuberculosis - Technical Guide 2005.
- 329 [27] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al.
330 Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for
331 diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35:907–14.
332 <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>.
- 333 [28] García-Jiménez WL, Cortés M, Benítez-Medina JM, Hurtado I, Martínez R, García-
334 Sánchez A, Risco D, Cerrato R, Sanz C, Hermoso-de-Mendoza M, Fernández-Llario P,
335 Hermoso-de-Mendoza J. Spoligotype diversity and 5-year trends of bovine tuberculosis in

336 Extremadura, southern Spain. *Tropical Animal Health and Production*. 2016. Vol 48, 8; 1533
337 - 15401. DOI: 10.1007/s11250-016-1124-4.

338 [29] Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and Strategy
339 for Use of MIRU-VNTRplus, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping
340 Data and Phylogenetic Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates.
341 *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:2692–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00540-08>.

342 [30]. Acosta F, Saldana R, Miranda S, Candanedo D, Sambrano D, Mora M, Bejarano S, De
343 Arriba Y, Reigosa A, De Dixon E, Atencio M, Castillo R and Goodridge A. Heterogeneity of
344 *Mycobacterium tuberculosis* Strains Circulating in Panama’s Western Region. *Am. J. Trop.*
345 *Med. Hyg.* 2023. doi:10.4269/ajtmh.23-0039.

346 [31] Wang W, Hu Y, Mathema B, Jiang Y, Kreiswirth B and Xu B. Recent transmission of W-
347 Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* in rural eastern China. *Int J Tuber Lung Dis.* 2012;
348 16(3):306–311; <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0304>.

349 [32] Deanne Langlois-Klassen, Ambikaipakan Senthilselvan, Linda Chui, Dennis Kunimoto, L.
350 Duncan Saunders, Dick Menzies and Richard Long. Transmission of *Mycobacterium*
351 *tuberculosis* Beijing Strains, Alberta, Canada, 1991–2007. *Emerging Infectious Diseases*.
352 2013. Volume 19, Number 5.

353 [33] Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Hernández-Pando R, Murcia MI. Circulation of
354 *M. tuberculosis* Beijing genotype in Latin America and the Caribbean. *Pathog Glob Health*.
355 2019 Dec;113(8):336-351. doi: 10.1080/20477724.2019.1710066.

356

357 34. Acosta F et al. Probable long-term prevalence for a predominant *Mycobacterium*
358 tuberculosis clone of a Beijing genotype in Colon, Panama. *Transbound Emerg Dis*. 2021. 68:
359 2229– 2238.

360 [35] Perdigão J, Clemente S, Ramos J, Masakidi P, Machado D, Silva C, Couto I, Viveiros M,
361 Taveira N and Portugal I. Genetic diversity, transmission dynamics and drug resistance of
362 *Mycobacterium tuberculosis* in Angola. *Sci Reports*. 2017; 7:4281; DOI: 10.1038/srep42814.

363 [36] Skhairia MA, Dekhil N, Mardassi H. Evolutionary history and spread of the
364 *Mycobacterium tuberculosis* Latin American and Mediterranean (L4.3/LAM) sublineage,
365 Tunisia. *Tuberculosis (Edinb)*. 2023 Jan;138:102297. doi: 10.1016/j.tube.2022.102297. Epub
366 2022 Dec 20.

367 [37] Skhairia MA, Dekhil N, Mhenni B, Fradj SB, Mardassi H. Successful expansion of
368 *Mycobacterium tuberculosis* Latin American and Mediterranean sublineage (L4.3/LAM) in
369 Tunisia mainly driven by a single, long-established clonal complex. *Int J Infect Dis*. 2021
370 Feb;103:220-225. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.195

371

372 [38] Arenas-Suarez NE, Cuervo LI, Avila EF, Duitama-Leal A, Pineda-Peña AC. The impact of
373 immigration on tuberculosis and HIV burden between Colombia and Venezuela and across
374 frontier regions. *Cad Saúde Pública* 2021;37:e00078820. [https://doi.org/10.1590/0102-](https://doi.org/10.1590/0102-311x00078820)
375 311x00078820.

376

- 1 **Table 1. Drug susceptibility resistance information for the MTBC strains from El Oro province**
 2 **included in this study.**

Drug Resistance Profile	Isolates	%
Isoniazid resistant	5	20
Streptomycin resistant	3	12
Ethambutol resistant	2	8
Rifampicin resistant	3	12
Pyrazinamide resistant	2	8
Isoniazid + Rifampicin resistant (MDR)	3	12
Sensible to all tested drugs	19	76
Total	25	
Without information	31	

3

4

NJ-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)

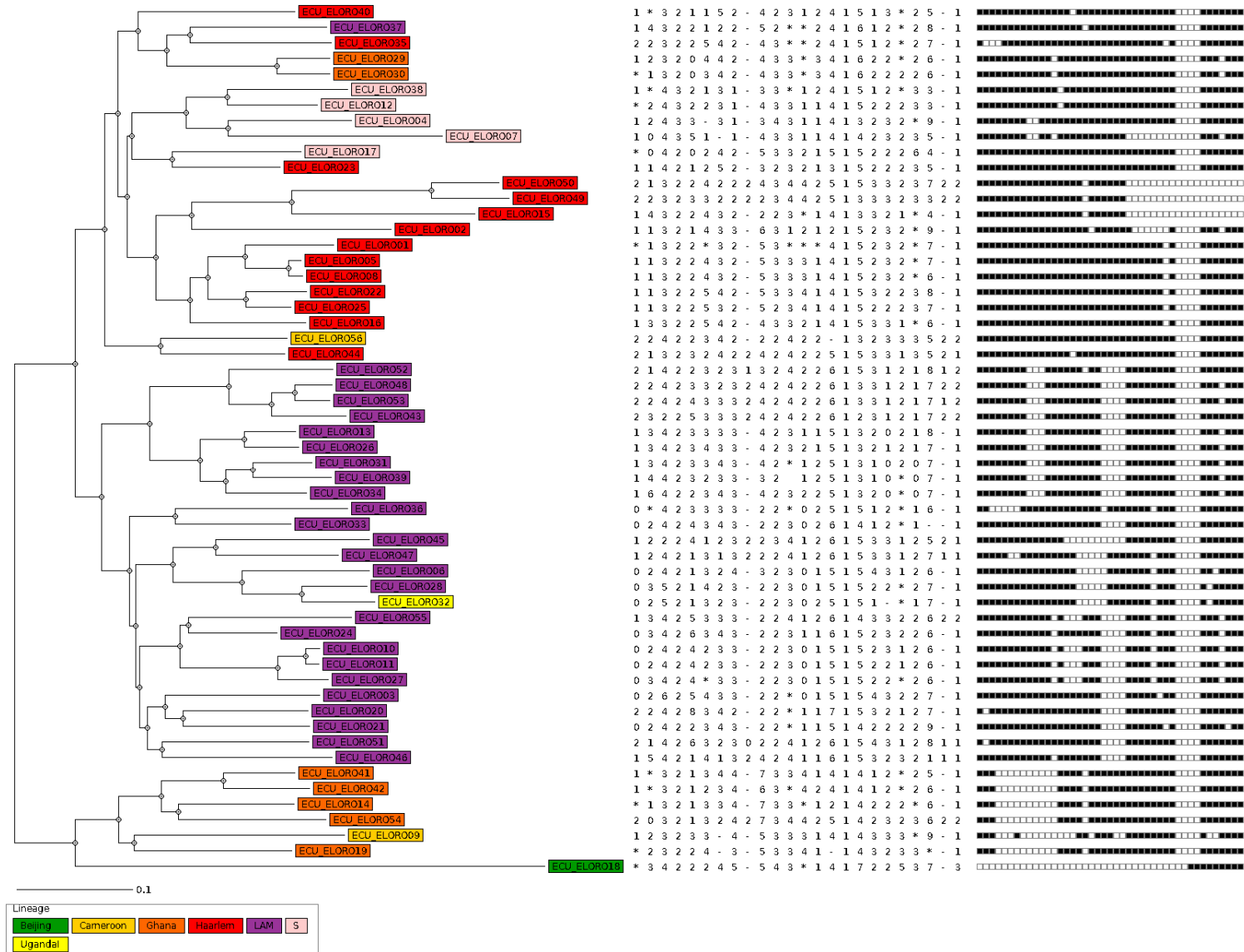


Figure 1. Population structure of MTBC in the Ecuadorian province of El Oro. The Neighbor Joining Tree for the 56 MTB strains included in the study, based in 24-loci MIRU-VNTR and Spoligotyping is shown.

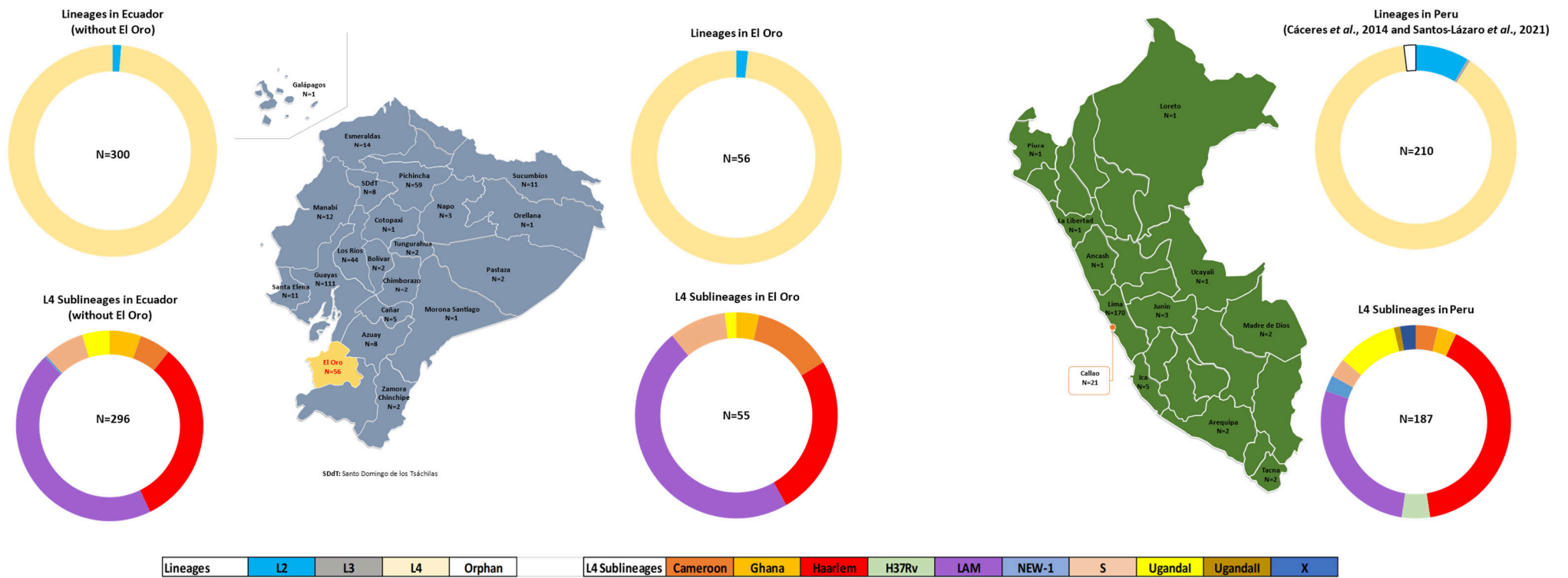


Figure 2. Geographical and sublineage distribution of MTBC strains from El Oro (our study), Ecuador (Garzon *et al.*, 2020) and Peru (Caceres *et al.*, 2014 and Santos-Lázaro *et al.*, 2021). Ring-charts represent occurrence of MTB lineages in El Oro province, rest of Ecuador and Peru.

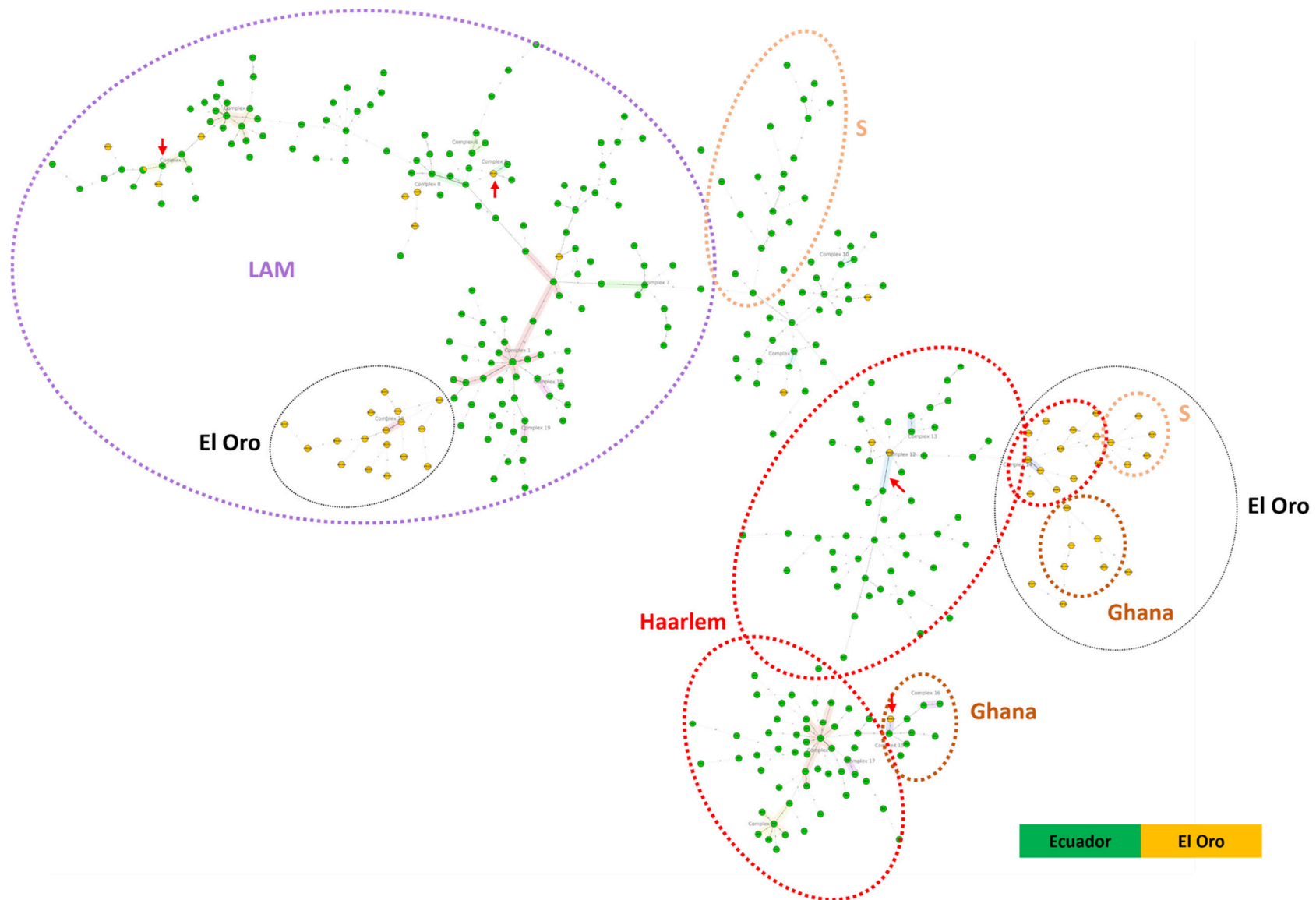


Figure 3. Minimum Spanning Tree of MTBC strains from El Oro and Ecuador using 24-loci MIRU-VNTR data. Distinction of genotypic lineages is shown by dotted circles of different colors. Black dotted circles indicate strains from El Oro provinces and red arrows indicate clonal complexes formed between isolates from El Oro province and the rest of Ecuador (Maximum locus difference within a clonal complex is 2).

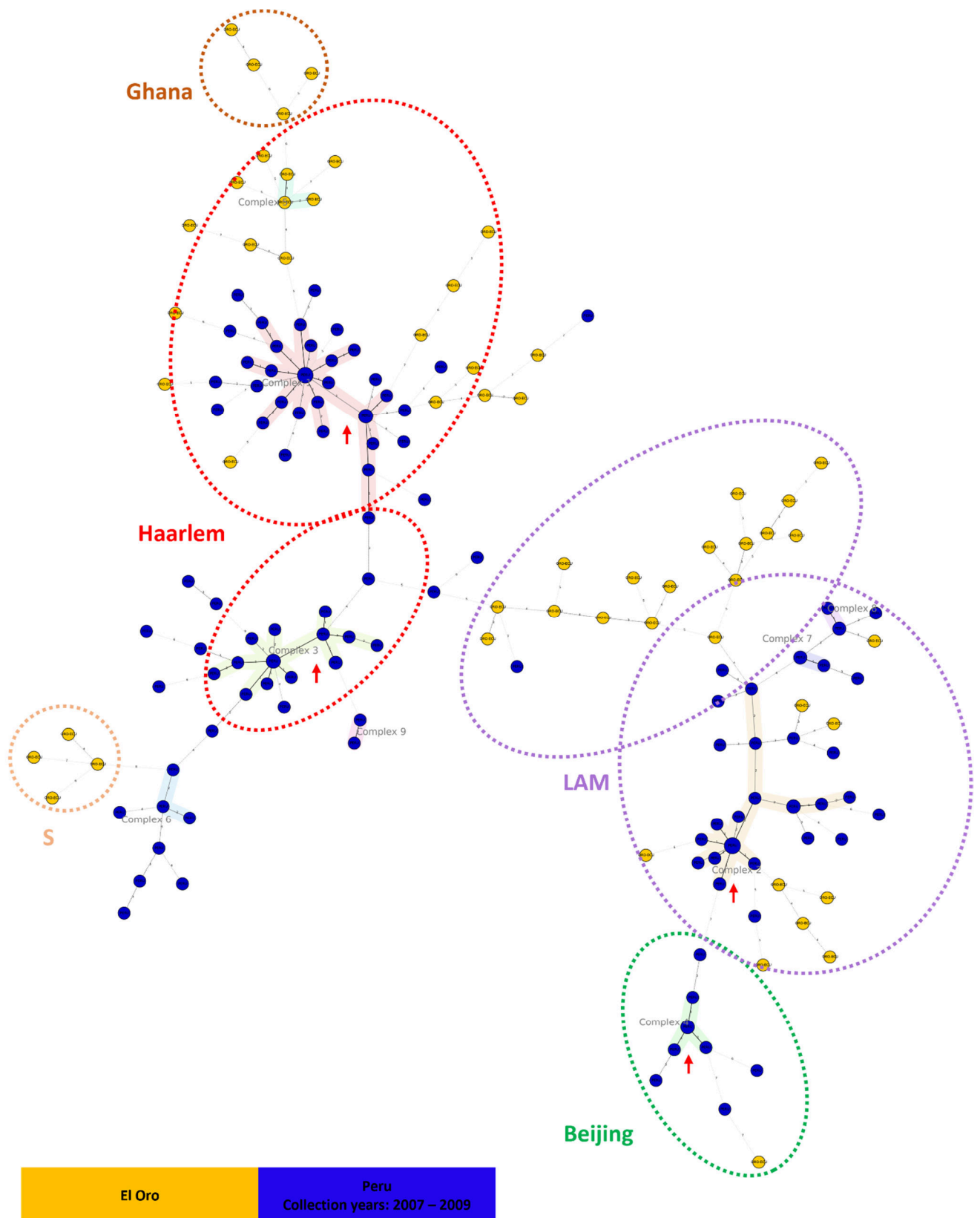


Figure 4. Minimum Spanning Tree of MTBC strains from El Oro (2012-2016) and Peru (2007-2009) using 15-loci MIRU-VNTR data. Distinction of genotypic lineages is shown by dotted circles of different colors, red arrows indicate clonal complexes from Peru (Maximum locus difference within a clonal complex is 2).

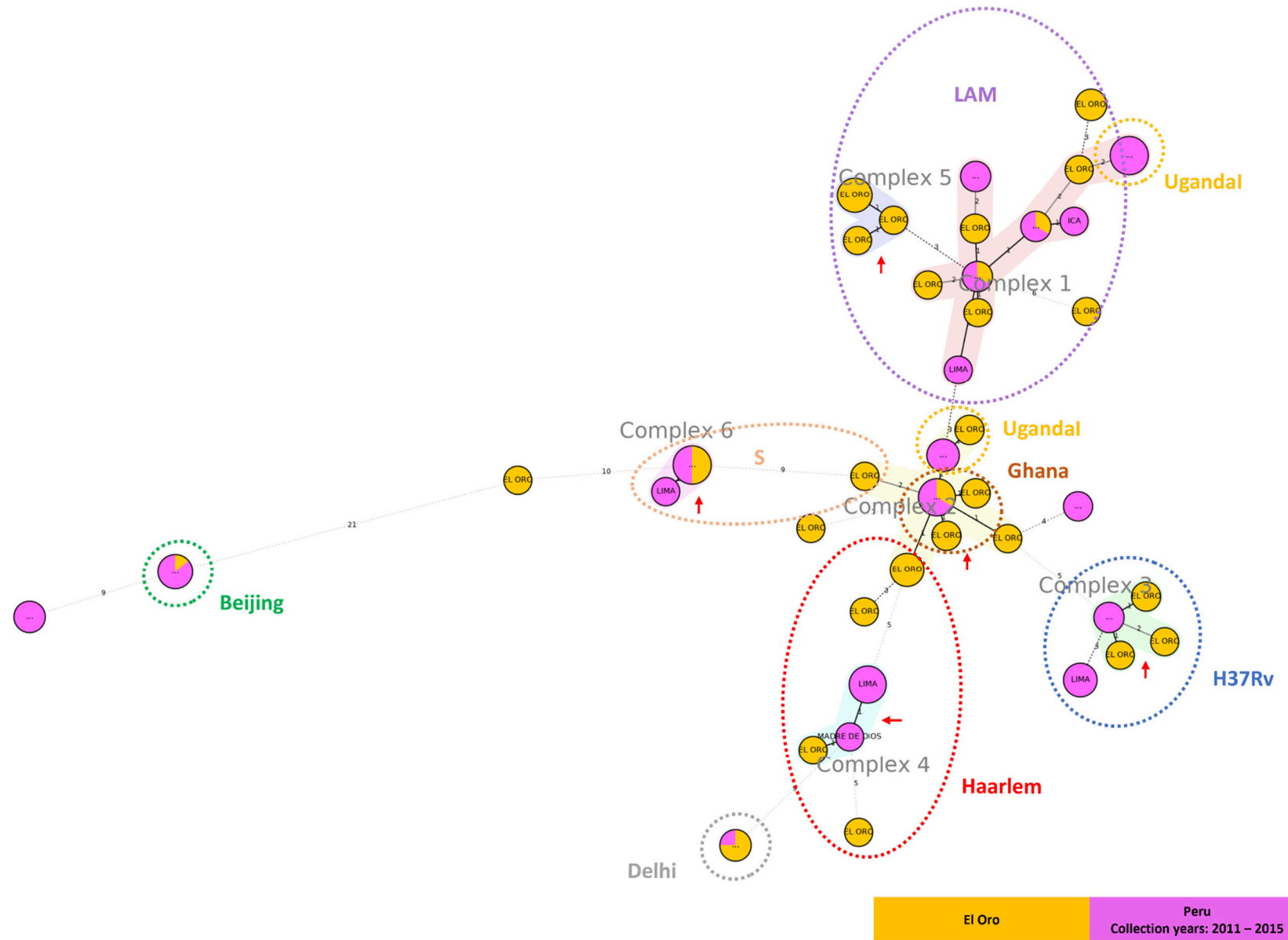


Figure 5. Minimum Spanning Tree of MTBC strains from El Oro (2012-2016) and Peru (2011-2015) using spoligotyping data. Distinction of genotypic lineages is shown by dotted circles of different colors. Red arrows indicate clonal complexes formed between isolates from El Oro province and Peru (Maximum locus difference within a clonal complex is 2).

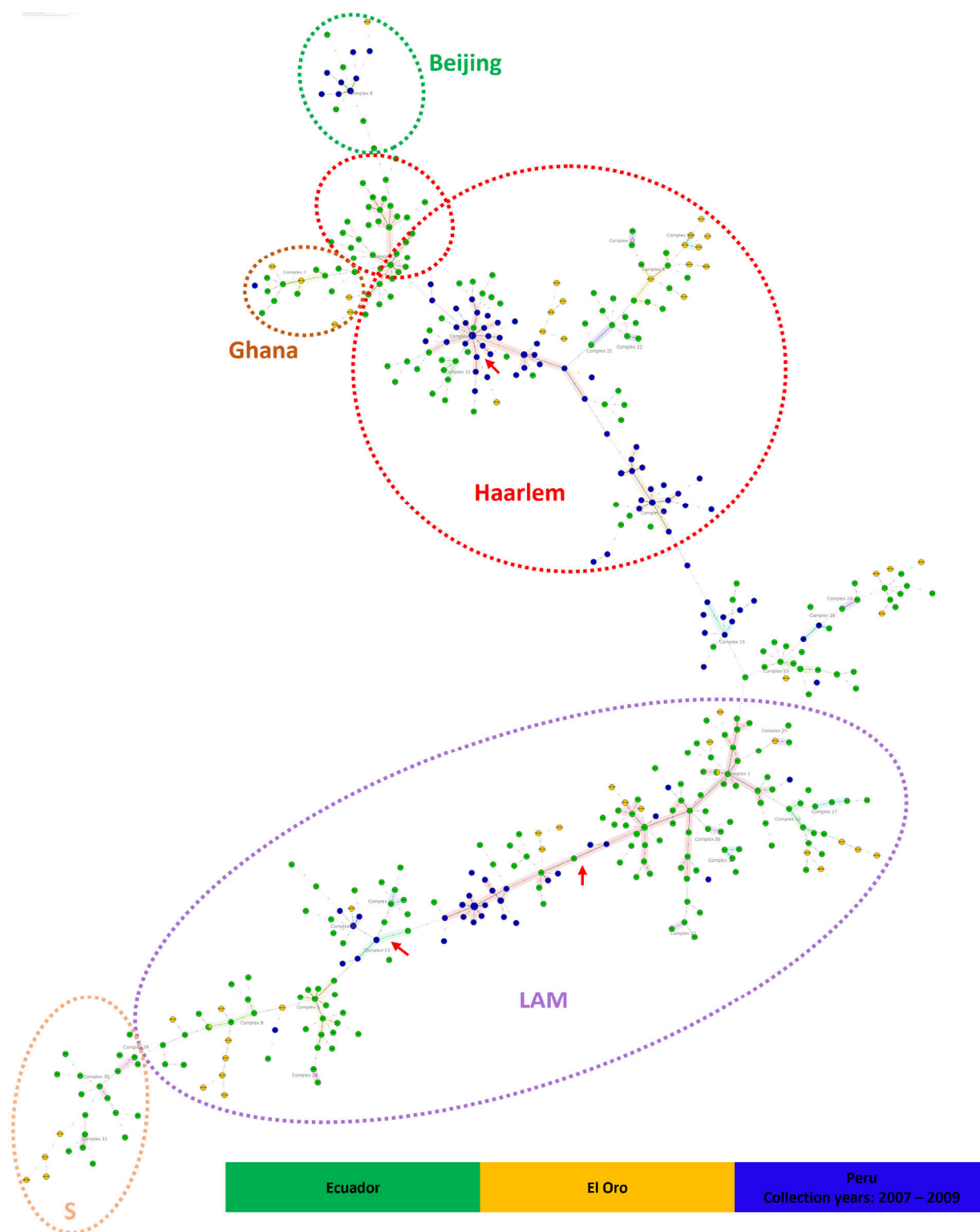


Figure 6. Minimum Spanning Tree of MTBC strains from El Oro (2012-2016), Ecuador (2012-2016) and Peru (2007-2009) using 15-loci MIRU-VNTR data. Distinction of genotypic lineages is shown by dotted circles of different colors, red arrows indicate clonal complexes between Ecuadorian and Peruvian MTBC strains (Maximum locus difference within a clonal complex is 2).

- 1 **Supplementary Table 1.** Geographical distribution of MTBC strains from Ecuador and Peru included
 2 in the phylogenetic analysis in this study.

ECUADOR ¹		PERU			
Province	Samples	Department	Samples	Source	
Azuay	8	Arequipa	1	Cáceres <i>et al.</i> , 2014 ²	
Bolívar	2	Callao	14		
Cañar	5	Ica	2		
Chimborazo	2	Junín	3		
Cotopaxi	1	Lima	119		
Esmeraldas	14	Madre de Dios	1		
Galápagos	1	Tacna	2		
Guayas	111	TOTAL	142		
Los Ríos	44	Department	Samples		Source
Morona Santiago	1	Ancash	1		Santos-Lázaro <i>et al.</i> , 2021 ³
Manabí	12	Arequipa	1		
Napo	3	Callao	7		
Orellana	1	Ica	3		
El Oro	56	La Libertad	1		
Pastaza	2	Lima	51		
Pichincha	59	Loreto	1		
Santo Domingo de los	8	Madre de Dios	1		
Tsáchilas					
Santa Elena	11	Piura	1		
Sucumbíos	11	Ucayali	1		
Tungurahua	2	TOTAL	68		
Zamora	2				
TOTAL	356				

¹ Ecuadorian samples were collected between 2012-2016

² Peruvian samples from Cáceres *et al.*, 2014 were collected between the years 2007-2009.

³ Peruvian samples from Santos-Lázaro *et al.*, 2021 were collected between the years 2011-2015

- 1 **Supplementary Table 2. Drug susceptibility resistance information for the MTBC strains from El**
 2 **Oro province included in this study, according by lineage.**

Drug Resistance Profile	L2		L4				
	Beijing	Cameroon	Ghana	Haarlem	LAM	S	Uganda
Isoniazid resistant	-	-	2	2	1	-	-
Streptomycin resistant	-	-	2	1	-	-	-
Ethambutol resistant	-	-	2	-	-	-	-
Rifampicin resistant	-	-	2	1	-	-	-
Pyrazinamide resistant	-	-	2	-	-	-	-
MDR	-	-	2	1	-	-	-
Sensible to all tested drugs	-	2	3	3	10	1	-
Without information	1	-	2	8	15	4	1

3

4

1 **Supplementary Figure 1:** 24-loci MIRU-VNTR based Neighbour-Joining Tree of MTBC strains
2 from El Oro province and Ecuador.

3 **Supplementary Figure 2:** 15-loci MIRU-VNTR and spoligotyping based Neighbour-joining
4 Tree of MTBC strains from El Oro and Peru (2012-2016).

5

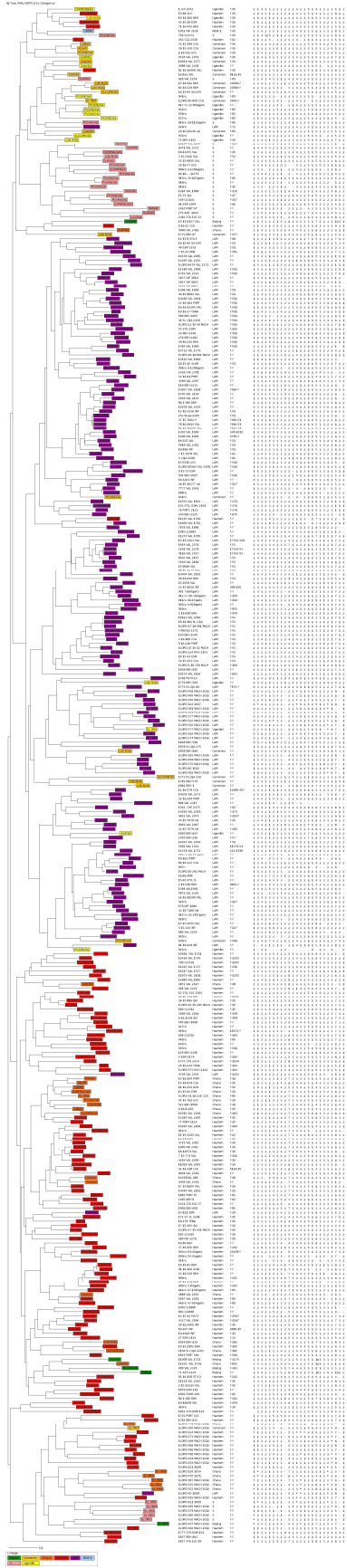
6

7

8

9

10



7.2. A first insight into tuberculosis transmission at the border of Ecuador and Colombia: a retrospective study of the population structure of *M. tuberculosis* in Esmeraldas province.

Publicado en: Frontiers in Public Health

Fwd: Your manuscript is accepted - 1343350

Miguel Angel Garcia Bereguiain <magbereguiain@gmail.com>

Tue 1/23/2024 7:38 AM

To: Bernardo Castro <bcr2483@gmail.com>; Bernardo David Castro <bernardo.castro@udla.edu.ec>

PRECAUCIÓN: este correo electrónico proviene de una fuente externa. Tenga cuidado con los enlaces y archivos adjuntos

mail aceptación artículo 1

----- Forwarded message -----

From: **Frontiers in Public Health Editorial Office** <publichealth.editorial.office@frontiersin.org>

Date: Thu, Jan 18, 2024 at 10:30 AM

Subject: Your manuscript is accepted - 1343350

To: <magbereguiain@gmail.com>

Dear Dr Garcia Bereguiain,

Please read this email in full as it contains important information related to the publication of your article.

I am pleased to inform you that your manuscript "A first insight into tuberculosis transmission at the border of Ecuador and Colombia: a retrospective study of the population structure of M. tuberculosis in Esmeraldas province" has been approved for production and accepted for publication in Frontiers in Public Health, section Infectious Diseases: Epidemiology and Prevention. Proofs are being prepared for you to verify before publication. We will also perform final checks to ensure your manuscript meets our criteria for publication (<https://www.frontiersin.org/about/review-system#ManuscriptQualityStandards>).

The title, abstract and author(s) list you provided during submission is currently online and will be replaced with the final version when your article is published. Please do not communicate any changes until you receive your proofs.

Any questions? Please visit our Production Help Center page for more information: <https://helpcenter.frontiersin.org>.

For issues concerning invoices and payments, please contact our Accounting team at accounting@frontiersin.org

You can click here to access the final review reports and manuscript: <https://review.frontiersin.org/review/bootstrap/a0e580f4-96d3-442a-ae15-06148b92073a>

As an author, it is important that you keep your Frontiers research network (Loop) profile up to date, so that you and your publications are more discoverable. You can update your profile pages (profile picture, short bio, list of publications) using this link: <https://loop.frontiersin.org/people/>

With best regards,

Frontiers in Public Health Editorial Office
Editorial Office, Frontiers in Public Health
<https://www.frontiersin.org/>

*** BE AWARE OF SCAM ATTEMPTS ***

Frontiers will always contact you from a @[frontiersin.org](https://www.frontiersin.org/) or @[frontiersin.com](https://www.frontiersin.com/) email address - please always check the email address the message was sent from.

If in doubt, please contact accounting@frontiersin.org

We want to hear about your experience with Frontiers.

We are constantly striving to improve our peer review process, please complete our short 3-minute survey to tell us about your experience, your opinion is important and will guide future development.

https://frontiersin.qualtrics.com/jfe/form/SV_aW5zUzZO1ZbOKQ6?survey=authorapproved&ArticleId=1343350&UserId=965446&FinalDecision=Accepted&CountryName=Ecuador&FieldName=Public Health&RoleId=16

Thank you very much for taking the time to share your thoughts.

Manuscript title: A first insight into tuberculosis transmission at the border of Ecuador and Colombia: a retrospective study of the population structure of M. tuberculosis in Esmeraldas province

Journal: Frontiers in Public Health, section Infectious Diseases: Epidemiology and Prevention

Article type: Original Research

Authors: Bernardo Castro-Rodriguez, Sebastian Espinoza-Andrade, Greta Franco-Sotomayor, Jose Manuel Benitez-Medina, Natalia Jimenez-Pizarro, Camilo Cardenas-Franco, Juan Carlos Granda, Jose Luis Jouvin, Javier Hermoso de Mendoza and Miguel Angel Garcia Bereguain

Manuscript ID: 1343350

Edited by: Hai-Feng Pan

If you encounter any technical issue, contact support@frontiersin.org, with gxjZ0RHMVUDkRug as reference.

1 **A first insight into tuberculosis transmission at the border of Ecuador and**
2 **Colombia: a retrospective study of the population structure of *M. tuberculosis* in**
3 **Esmeraldas province.**

4 Bernardo Castro¹, Sebastián Espinoza-Andrade¹, Greta Franco-Sotomayor^{2,3}, José María Benítez-
5 Medina⁴, Natalia Jiménez-Pizarro⁴, Camilo Cárdenas-Franco³, Juan Carlos Granda², Jose Luis Jouvin³,
6 Solon Alberto Orlando^{2,5}, Javier Hermoso de Mendoza⁴ and Miguel Ángel García-Bereguiain^{1*}.

7 1. One Health Research Group. Universidad de las Américas. Quito, Ecuador.

8 2. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Leopoldo Izquieta Pérez”. Guayaquil, Ecuador.

9 3. Facultad de Medicina. Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Guayaquil. Ecuador.

10 4. Departamento de Patología Infecciosa. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres.
11 Spain.

12 5. Universidad Espíritu Santo. Guayaquil. Ecuador.

13 *Corresponding author: Miguel Angel Garcia-Bereguiain (magbereguiain@gmail.com).

14 **Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; MIRU-VNTR; Spoligotyping; migration.

15

16

17

18

19

20 **Abstract.**

21 *Objective.* Tuberculosis (TB) is a major public health problem in Ecuador and Colombia,
22 both high burden settings for drug resistance TB. Molecular epidemiology is crucial to
23 understand the transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC)
24 and to identify active transmission clusters of regional importance. *Methods.* We studied
25 the potential transmission of TB between Colombia and Ecuador through the analysis of
26 population structure of MTBC lineages circulating in the Ecuadorian province of
27 Esmeraldas at the border with Colombia. A total number of 105 MTBC strains were
28 characterized by 24-loci MIRU-VNTR and spoligotyping. *Results.* MTBC lineage 4 is the
29 only present in Esmeraldas; no MTBC strains belonging to Lineage 2-sublineage Beijing
30 were found despite its presence in other provinces of Ecuador and, at high prevalence,
31 in Colombia. Genotyping results revealed a high degree of diversity for MTBC in
32 Esmeraldas: neither active transmission clusters within this province nor including MTBC
33 strains from Colombia or other provinces of Ecuador were found. *Conclusions.* Our data
34 suggest that tuberculosis dynamics in this rural and isolated area may be not related with
35 highly transmitted strains like MTBC Lineage-Beijing but could be influenced by other
36 health determinants that favor TB relapse like poverty and poor health system access.
37 Further studies including a larger number of MTBC strains from Esmeraldas are
38 necessary to test this hypothesis.

39

40

41

42 **Introduction.**

43 The *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC) includes bacteria with specific
44 microbiological characteristics that confer certain properties for host-adaptation, virulence
45 and transmission; thus contributing to the development of tuberculosis (TB), an infectious
46 disease that mainly spreads by close person-to-person contact through the expulsion and
47 inhalation of contaminated aerosols, affecting the lungs or other organs^{1,2}. Considering
48 the importance of TB as one of the leading causes of death around the world, behind
49 COVID-19 and above HIV-AIDS, the understanding of the genetic diversity of the *M.*
50 *tuberculosis* (MTB) is critical for TB surveillance and prevention^{1,3}. Briefly, the MTBC is
51 comprised by seven highly related lineages that differ in geographical distribution,
52 infectious capabilities, transmission modes and resistance to antibiotics: Lineage 1 (Indo-
53 Oceanic), Lineage 2 (East Asia), Lineage 3 (India- East Asia), Lineage 4 (Euro-American),
54 Lineage 5 (West African 1), Lineage 6 (West African 2) and Lineage 7 (Ethiopia). The
55 most significant sublineages are lineage 1, MANU and EAI; lineage 2, Beijing; lineage 3,
56 Central Asian (CAS) and Delhi; lineage 4, Haarlem, Latin American Mediterranean (LAM),
57 T, X, S, Ghana, URAL, TUR, Uganda, and H37Rv; and lineage 6, AFRI and West
58 African^{3,4}. Therefore, the use of molecular markers present in the genome of *M.*
59 *tuberculosis*, like Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU-VNTR typing
60 method) and/or spacer sequences in the Direct Repeat (DR) region (Spoligotyping
61 method), allow the characterization of transmission dynamics and MTBC strains
62 clusters⁵⁻⁷.

63 For 2021, the World Health Organization (WHO) estimated for Ecuador a TB burden of
64 8,500 cases (rate of 48/100,000 population) and 370 cases of multidrug resistance TB

65 (MDR-TB) (rate 2.1/100,000 population), 830 deaths of HIV-negative TB patients and 330
66 deaths of HIV-positive TB patients (TB case fatality ratio: 14%)⁸. MTBC molecular
67 epidemiology studies in Ecuador are really scarce⁹⁻¹². There is a single study addressing
68 the population structure and genetic diversity of MTBC in the whole country, showing that
69 MTBC lineage 4 sublineage LAM is predominant countrywide, and sublineages X and S
70 are also predominant in the Coastal and Andean regions, respectively⁹. Similar results
71 have been reported in other studies with MTBC strains from Quito¹⁰ and Guayaquil¹².

72 For the same year 2021, the estimates of TB cases for Colombia provided by WHO were
73 21,000 (rate 41/100,000 population) and 1,100 cases of MDR-TB (rate 2.2/100,000
74 population), 1700 deaths of HIV-negative TB individuals and 840 deaths of HIV-positive
75 TB individuals (TB case fatality ratio: 12%)¹³. However, total notified TB cases in both
76 countries are lower than the estimates provided by the WHO, with 5,595 cases notified in
77 Ecuador and 13,659 cases in Colombia, suggesting an underestimation of TB cases in
78 both countries^{8,13,14}. The most predominant MTBC lineage in Colombia is lineage 4
79 (including sublineages like LAM, Haarlem, X and S) but also lineage 2 sublineage
80 Beijing^{4,15}. Colombia and Peru have a significantly higher presence of MTBC lineage 2
81 sublineage Beijing than other countries in South America, representing a potential risk for
82 TB control in the region^{4,15-22}.

83 As neighbor countries and members of the Andean Community, Ecuador and Colombia
84 have an historically intense migration flow⁹. Considering that both countries are high
85 burden TB settings, and also that Colombia is a hot spot for MTBC Beijing^{11,23,24}, TB
86 transnational transmission studies could improve strategies for TB control^{9,11}. There is a
87 previous study addressing the population structure of MTBC in Ecuador that reported

88 clonal complexes formed by MTBC strains from Ecuador and Colombia, although no
89 active transmission clusters were found⁹. However, MTBC strains from the northern
90 provinces of Ecuador in the border with Colombia were underrepresented in this study,
91 so the existence of active transmission clusters could not be totally ruled out⁹.

92 The goal of this retrospective study was to assess the population structure of MTBC in
93 the province of Esmeraldas in the border of Ecuador and Colombia to analyze the TB
94 transmission between those countries.

95 **Materials and Methods.**

96 *Mycobacterium tuberculosis strains included in the study.*

97 A collection of 105 MTBC isolates from years 2014 to 2016 stored at "Instituto Nacional
98 de Salud Pública e Investigación Leopoldo Izquieta Pérez" (INSPI) in Guayaquil
99 (Ecuador) were included in the study, distributed in 42, 16 and 47 samples for 2014, 2015
100 and 2016, respectively. MTBC isolates are routinely processed at INSPI laboratories,
101 where culture and antibiotic resistance profiling for first- and second-line drugs used in
102 TB therapy is performed for MTBC cultures following Pan American Health Organization
103 guidelines^{25,26}. The samples were previously inactivated and stored for following the
104 guidelines from this government center. MTBC cultures manipulation prior to inactivation
105 was carried out in a BSL2+ facility.

106 This collection of 105 MTBC isolates included all the MTBC strains available at the time
107 this study was carried out for Esmeraldas, located in the Northern Coastal Region of
108 Ecuador, that borders with Colombia. Nevertheless, according to the reports from
109 Ecuadorian Ministry of Health for TB cases distributions by province, there was 121 and

110 200 TB cases reported in Esmeraldas for years 2017 and 2018, respectively
111 (<https://www.salud.gob.ec/gacetatas-tuberculosis/>). If we estimate an average of 200 TB
112 cases per year in this province, the total number of cases for 2014-2016 would be 600.
113 So, a collection of 105 MTBC strains would represent a 17.5% of the total cases in
114 Esmeraldas province.

115 Additionally, information from MTBC strains from Ecuador and Colombia was retrieved
116 from the bibliography, as it has been done in similar studies^{27,28}. For the phylogenetic
117 analysis described below, 190 MTBC strains from Colombia for years 2012-2014⁴ and
118 385 MTBC strains from Ecuador from years 2012-2016^{9,26} were included in the study.

119 *Ethics statement.*

120 The access to this MTBC strains collection was approved by IRBs from INSPI and
121 University San Francisco de Quito (code 2017-023IN), both certified by Ministry of Public
122 Health from Ecuador. All samples were anonymized, and no personal data of the patients
123 were made available.

124 *Mycobacterium tuberculosis heat inactivation and DNA isolation*

125 A sample from cultures of MTBC was collected and resuspended in TE buffer (10mM
126 Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), then inactivated by boiling at 95°C for 45 min. After this
127 process, samples were centrifuged for 5min at 10000 g and the supernatant was directly
128 used for genotyping^{11,30}.

129 *MTBC strains MIRU-VNTR genotyping.*

130 The method is PCR-based and allows the detection of different Mycobacterial
131 Interspersed Repetitive Units (MIRU) located at multiple loci in the MTBC genome. Each
132 MIRU allele is identified by a number, thus generating a numerical profile which is used
133 for genotyping studies^{5,31,32}. Amplicons were observed in 2% UltraPure™ Agarose
134 (Invitrogen, California, USA) gels of 15 cm x 10 cm in 0.5X Tris-boric acid-EDTA (TBE)
135 buffer at 100V for 3h using a ladder 100bp Plus Opti-DNA Marker (Cat.No.: G016, Applied
136 Biological Materials Inc., British Columbia, Canada) for size determination. MIRU allele
137 identification was performed according to Supply et al.³³.

138 *MTBC strains spoligotyping*

139 Spoligotyping was performed as described elsewhere^{34,35}. The results were compared to
140 those collected in the fourth international spoligotyping database (SpolDB4)^{34,35}.

141 *Phylogenetic analysis of MTB strains.*

142 For phylogenetic analysis, 24 MIRU-VTNR and spoligotyping patterns belonging to the
143 105 MTBC strains from years 2014-2016 from Esmeraldas were used. Also, we retrieved
144 information of MTBC strains from Ecuador and Colombia from the literature: 1) 24 MIRU-
145 VTNR patterns of 385 MTBC isolates for years 2012-2016 from Ecuador^{9,29}; 2) 24 MIRU-
146 VTNR and spoligotyping patterns of 190 MTBC strains for years 2012-2014 from
147 Colombia⁴.

148 Genotyping data were analyzed using the MIRU-VNTRplus web application ([www.miru-
vntrplus.org](http://www.miru-
149 vntrplus.org))³⁶. Lineage identification was performed by similarity search, using MIRU-
150 VNTR and spoligotyping information, by categorical distance measure (MIRU-VNTR
151 weight: 1, Spoligo weight: 1). Calculation of Neighbour-joining Tree (NJT) and Minimum

152 Spanning Tree (MST) were performed using MIRU-VNTR and/or Spoligotyping
153 information when available.

154 **Results.**

155 *Drug susceptibility testing of MTBC strains from Esmeraldas Province of Ecuador.*

156 Regarding to the 105 MTBC strains included in the study, the information for drug
157 susceptibility testing was available for 98 of them: 23/98 (23.5%) were resistant to
158 isoniazid (7/23 were monoresistant), 10/98 (10.2%) were resistant to streptomycin (6/10
159 were monoresistant), 6/98 (6.1%) were resistant to ethambutol, 17/98 (17.3%) were
160 resistant to rifampicin (1/17 was monoresistant), 5/28 (5.1%) were resistant to
161 pyrazinamide. MTBC strains resistant to isoniazid and rifampicin (MDR) were 16/98
162 (16.3%). On the other hand, 71/98 (21.4%) MTBC strains were sensible to all the drugs
163 tested (Table 1).

164 *Population structure of MTBC strains from Esmeraldas province in Ecuador.*

165 The 105 MTBC strains from Esmeraldas were analyzed using 24-loci MIRU-VNTR and
166 spoligotyping. A Neighbor Joining Tree (NJT) based on this genotypic information is
167 shown in Figure 1. The lineage distribution obtained for MTBC strains from Esmeraldas
168 revealed a high degree of diversity, and no active transmission clusters without any single
169 loci variation in 24-loci MIRU-VNTR were found (Figure 1). The lineage distribution for the
170 MTBC strains from Esmeraldas province was 100% L4, with sublineages LAM 52/105
171 (49.5%), Ghana 29/105 (27.6%), Haarlem 12/105 (11.4%), Cameroon 5/105 (4.8%), S
172 3/105 (2.9%), Uganda I 3/105 (2.9%) and X 1/105 (0.95%) (Figure 1 and Figure 2). MTBC

173 LAM strains were more diverse in comparison to Ghana strains, while Haarlem strains
174 resulted not well defined in a branch (Figure 1).

175 *Comparison of population structure of MTBC strains from Esmeraldas province, Ecuador*
176 *and Colombia.*

177 The geographic distribution of MTBC strains and lineage distribution for Esmeraldas
178 province, Ecuador and Colombia are detailed in Figure 2.

179 The 24-loci MIRU-VNTR patterns of 385 MTBC strains from Ecuador from years 2012-
180 2016 were retrieved from our previous studies^{9,29} and included in this analysis (Figure 2).

181 The lineage distribution for the MTBC strains from Ecuador (excluding Esmeraldas
182 province) was: 5/385 Lineage 2 sublineage Beijing (1.3%); and Lineage 4 380/385
183 (98.7%). Within Lineage 4: 173/385 LAM (44.9%), 117/385 Haarlem (30.4%), 27/385
184 Ghana (7%), 26/385 S (6.7%), 18/385 Cameroon (4.7%), 17/385 Uganda I (4.4%), 1/385
185 NEW-1 (0.26%), and 1/385 (0.26%).

186 Spoligotyping and 24-loci MIRU-VNTR information of 190 MTBC strains from Colombia
187 from years 2012-2014 was retrieved from reference 4, obtaining the following MTBC
188 lineage distribution: 2/190 Lineage 1- Sublineage Manu (1.1%); 20/190 Lineage 2-Beijing
189 (10.5%); 158/190 Lineage 4 (83.2%). Within Lineage 4: 71/190 LAM (37.4%); 44/190
190 Haarlem (25.8%); 18/190 T (9.5%); 14/190 X (7.4%); 5/190 S (2.6%); 1/190 Cameroon
191 (0.52%); and 15/190 were of unknown lineage (Figure 2).

192 Figure 3 represents the Minimum Spanning Tree (MST) for MTBC strains from Ecuador
193 (2012-2016) and Esmeraldas (2012-2016) using 24-loci MIRU-VNTR information. This
194 analysis included a total number of 495 MTBC strains, including the 105 MTBC strains

195 for Esmeraldas province. This province is highly represented in this analysis as the
196 number of MTBC strains from the most populated provinces of Pichincha and Guayas
197 were 155 and 59, respectively. A very strong segregation of 99 out of the 105 MTBC
198 strains from Esmeraldas compared to the rest of provinces of Ecuador was observed.
199 Within those 99 strains, two big and clearly delimited groups of MTBC strains belonging
200 to sublineage LAM and Ghana were found. Only one clonal complex was observed from
201 MTBC strains from Esmeraldas, including exclusively 2 MTBC strains sublineage Ghana
202 from Esmeraldas, with a maximum of 2 loci difference in the 24 MIRU-VNTR pattern
203 (Figure 3). On the other hand, 6 MTBC strains from Esmeraldas are clearly dispersed
204 within the MTBC strains from the rest of Ecuador. However, none of the 19 clonal
205 complexes that occur in different groups of lineages of MTBC strains from Ecuador
206 included MTBC strains from Esmeraldas.

207 Figure 4A represents the Minimum Spanning Tree (MST) for MTBC strains from Colombia
208 (2012-2014) and Esmeraldas (2012-2016) using 24-loci MIRU-VNTR information. This
209 analysis included a total number of 190 MTBC strains from Colombia and the 105 strains
210 from Esmeraldas province. There is a strong segregation between all the MTBC strains
211 of Esmeraldas and Colombia in the MST, without any clonal complex including strains
212 from both locations (Figure 3). A consistent result was obtained for the NJT
213 (Supplementary Figure 2) where only 2 MTBC strains from Esmeraldas belonging to
214 sublineage Haarlem and LAM were found more phylogenetically related to MTBC strains
215 from Colombia than to other strains from Esmeraldas, both not clustering in clonal
216 complexes.

217 Figure 4B represents the Minimum Spanning Tree (MST) for MTBC strains from Colombia
218 (2012-2015) and Esmeraldas (2012-2016) using only spoligotyping information. Within
219 the reduced segregation capacity of spoligotyping method for active transmission events,
220 5 well defined clonal complexes (CC1, CC2, CC3, CC7, and CC9) of L4 sublineages
221 including MTBC strains from Esmeraldas and Colombia were observed. Interestingly,
222 three of those clonal complexes (CC1, CC2, CC3) included MTBC strains from the
223 department of Nariño in the south of Colombia in the border with Esmeraldas and Carchi
224 provinces in Ecuador; isolates reported from this department share three clonal
225 complexes with strains from Esmeraldas (CC1, CC2, and CC3).

226 **Discussion.**

227 The rapid identification of highly and active transmission complex of MTBC is crucial to
228 reinforce TB surveillance and control programs. Colombia is one of the countries in Latin
229 America that reports a high burden of MTB of lineages commonly associated to antibiotic
230 resistance and increased transmission^{4,7,13,15,23,24}. We addressed the potential
231 transmission of high risk MTBC strains from Colombia to Ecuador through the
232 identification of the dominant MTBC genotypes in the border province of Esmeraldas.

233 The population structure of MTBC in the province of Esmeraldas showed a high genetic
234 variability itself, as no MTBC active transmission clusters were found in the collection of
235 105 strains for 2014-2016. Additionally, most of MTBC strains from Esmeraldas resulted
236 not phylogenetically closely related to strains from the other Ecuadorian provinces, as no
237 mixed clonal complexes were found. A high level of variability within a reduced rural and
238 isolated geographical area has been also described in Panama and Ecuador^{29,37}, and the

239 lack of active transmission clusters despite the high burden of TB could be explained as
240 a consequence of relapse of latent tuberculosis cases^{9,29,37}. Interestingly, the MTBC
241 lineage distribution in Esmeraldas is exclusively composed of MTBC lineage 4 strains
242 with no presence of Lineage 2- sublineage Beijing. Despite the close proximity to
243 Colombia where Lineage 2-sublineage Beijing represents 5% of the MTBC population^{4,24},
244 we could not find evidence of recent transnational transmission of this lineage. This
245 results confirm previous findings reporting circulation of Beijing lineage only in limited
246 locations of the Americas like Cuba, Colombia and Peru²⁴. Nevertheless, permanent
247 genetic surveillance should be implemented within the Ecuadorian national TB
248 surveillance program to identify active transmission clusters, as it has been described for
249 instance in Panama³⁷ or Tunisia^{27,28}. This is specially relevant considering the presence
250 of hot spots for active transmission clusters like prisons in Latin American region³⁸.

251 Regarding drug resistance results, we found a 16.3% prevalence of MDR-TB in our study
252 population. This value is much higher than the 4.35% MDR TB prevalence estimated for
253 Ecuador by the WHO^{1,8}. However, similar results of higher prevalence of MDR-TB than
254 WHO estimation was also found in the previous study for the whole country⁹. This
255 difference could be explained by a bias in the TB samples that are received by the
256 National Reference Laboratory in Ecuador. In this sense, not all TB patient samples are
257 processed but those defined by a triage protocol that include all the samples with drug
258 treatment failure, increasing the probability of detecting MDR-TB.

259 This study has some limitations. First, the 105 MTBC strains included in the study
260 represented less than 20% percent of total TB cases in Esmeraldas (see details in
261 methods), so we cannot totally rule out the presence of Beijing lineage or active

262 transmission cluster due to sampling bias. Second, as we could only access MTBC
263 strains from 2014-2016, the current TB transmission scenario could have changed,
264 especially considering the high level of migration back and forth across the Ecuador-
265 Colombia border in recent years due to the huge humanitarian and migratory crisis
266 following the economic collapse of Venezuela³⁹. Third, the phylogenetic analysis had
267 different resolutions depending on the data available: while all the MTBC strains from
268 Esmeraldas and Colombia had 24 loci MIRU-VNTR and spoligotyping data available, the
269 MTBC strains from other provinces of Ecuador lacked spoligotyping information. Fourth,
270 either MTBC strains collections from Colombia and Ecuador could also have geographical
271 bias, as most of those strains came from Department of Valle del Cauca in Colombia, and
272 from the main cities of Ecuador (Quito and Guayaquil)^{4,9}. Moreover, the lack of MTBC
273 strains from the other Ecuadorian border provinces with Colombia represents another
274 source of potential sample bias.

275 In conclusion, cheap and easy molecular epidemiology tools are still useful for middle to
276 high burden TB settings in Latin America where Whole Genome Sequencing is still an
277 expensive approach. Further studies with greater MTBC sample sizes from recent years
278 in this region and others in Ecuador are needed to confirm the main findings in our study,
279 so they could be considered for improvements in the TB surveillance program in high
280 burden rural settings like Esmeraldas.

281 **References.**

- 282 1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2022*. Geneva, 2022.
- 283 2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. Ninth. Edinburgh:
284 Elsevier, 2021.

- 285 3. Brites D, Gagneux S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the
286 Mycobacterium tuberculosis Complex. In: Gagneux S (ed) *Strain Variation in the*
287 *Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and*
288 *Control*. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–26.
- 289 4. Rodríguez-Castillo JG, Llerena C, Argoty-Chamorro L, et al. Population structure of
290 multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Colombia.
291 *Tuberculosis*; 125. Epub ahead of print 1 December 2020. DOI:
292 10.1016/j.tube.2020.102011.
- 293 5. Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, et al. Mycobacterial interspersed repetitive
294 units (MIRU) differentiate Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from
295 other species of the Mycobacterium avium complex. *Mol Cell Probes* 2003; 17:
296 157–164.
- 297 6. Coll P, García de Viedma D. Epidemiología molecular de la tuberculosis. *Enferm*
298 *Infec Microbiol Clin* 2018; 36: 233–240.
- 299 7. Woodman M, Haeusler I, Grandjean L. Tuberculosis Genetic Epidemiology: A Latin
300 American Perspective. *Genes (Basel)* 2019; 10: 53.
- 301 8. World Health Organization. Tuberculosis profile: Ecuador,
302 [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22EC%22)
303 [%22&lan=%22EN%22&iso2=%22EC%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22EC%22) (accessed 14 August 2023).
- 304 9. Garzon-Chavez D, Garcia-Bereguain MA, Mora-Pinargote C, et al. Population
305 structure and genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Ecuador. *Sci Rep*;
306 10. Epub ahead of print 1 December 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-62824-z.
- 307 10. Zurita J, Espinel N, Barba P, et al. Genetic diversity and drug resistance of
308 Mycobacterium tuberculosis in Ecuador. *International Journal of Tuberculosis and*
309 *Lung Disease* 2019; 23: 166–173.
- 310 11. Garzon-Chavez D, Zurita J, Mora-Pinargote C, et al. Prevalence, Drug Resistance,
311 and Genotypic Diversity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing Family in
312 Ecuador. *Microbial Drug Resistance* 2019; 25: 931–937.
- 313 12. Morey-León G, Andrade-Molina D, Fernández-Cadena JC, et al. Comparative
314 genomics of drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis in Ecuador. *BMC*
315 *Genomics*; 23. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.1186/s12864-022-
316 09042-1.
- 317 13. World Health Organization. Tuberculosis profile: Colombia,
318 [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22CO%22)
319 [%22&lan=%22EN%22&iso2=%22CO%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22CO%22) (accessed 14 August 2023).

- 320 14. Ranzani OT, Pescarini JM, Martinez L, et al. Increasing tuberculosis burden in Latin
321 America: an alarming trend for global control efforts. *BMJ Glob Health* 2021; 6:
322 e005639.
- 323 15. Castro C, Ricardo A, Zabaleta A, et al. Caracterización de aislamientos clínicos de
324 *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de individuos positivos para HIV en
325 Colombia, 2012. *Biomedica* 2017; 37: 86–95.
- 326 16. World Health Organization. Tuberculosis profile: Peru,
327 [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&iso2=%22PE%22&lan=%22EN%22)
328 [%22&iso2=%22PE%22&lan=%22EN%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&iso2=%22PE%22&lan=%22EN%22) (accessed 13 August 2023).
- 329 17. Del Castillo H, Mendoza-Ticona A, Saravia JC, et al. Epidemia de Tuberculosis
330 Multidrogo Resistente y Extensivamente Resistente a Drogas (TB MDR/XDR) en
331 el Perú: Situación y Propuestas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2009; 26: 380–
332 386.
- 333 18. Wong P, Puray M, Gonzales A, et al. Epidemiología molecular de la tuberculosis en
334 el Peru. *Revista Peruana de Epidemiología* 2011; 15: 6–16.
- 335 19. Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, et al. Genetic Diversity and Transmission
336 Characteristics of Beijing Family Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru.
337 *PLoS One*; 7. Epub ahead of print 21 November 2012. DOI:
338 10.1371/journal.pone.0049651.
- 339 20. Cáceres O, Rastogi N, Bartra C, et al. Characterization of the Genetic Diversity of
340 Extensively-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from
341 Pulmonary Tuberculosis Patients in Peru. *PLoS One* 2014; 9: e112789.
- 342 21. Santos-Lazaro D, Gavilan RG, Solari L, et al. Whole genome analysis of extensively
343 drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Peru. *Sci Rep*; 11. Epub ahead
344 of print 1 December 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-88603-y.
- 345 22. Tarazona D, Galarza M, Levano KS, et al. Comparative genomic analysis of
346 Peruvian strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*
347 2016; 33: 256–263.
- 348 23. Ramirez LMN, Ferro BE, Diaz G, et al. Genetic profiling of *Mycobacterium*
349 *tuberculosis* revealed “modern” Beijing strains linked to MDR-TB from
350 Southwestern Colombia. *PLoS One*; 15. Epub ahead of print 1 April 2020. DOI:
351 10.1371/journal.pone.0224908.
- 352 24. Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Hernández-Pando R, Murcia MI.
353 Circulation of *M. tuberculosis* Beijing genotype in Latin America and the Caribbean.
354 *Pathog Glob Health*. 2019 Dec;113(8):336-351. doi:
355 10.1080/20477724.2019.1710066.

- 356 25. Franco-Sotomayor G, Rivera-Olivero IA, Leon-Benitez M, et al. Fast, Simple, and
357 Cheap: the Kudoh-Ogawa Swab Method as an Alternative to the Petroff–
358 Lowenstein-Jensen Method for Culturing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin*
359 *Microbiol*; 58. Epub ahead of print 25 March 2020. DOI: 10.1128/JCM.01424-19.
- 360 26. Franco-Sotomayor G, Garzon-Chavez D, Leon-Benitez M, et al. A First insight into
361 the katg and rpoB gene mutations of multidrug-resistant Mycobacterium
362 tuberculosis strains from Ecuador. *Microbial Drug Resistance* 2019; 25: 524–527.
- 363 27. Skhairia MA, Dekhil N, Mardassi H. Evolutionary history and spread of the
364 Mycobacterium tuberculosis Latin American and Mediterranean (L4.3/LAM)
365 sublineage, Tunisia. *Tuberculosis (Edinb)*. 2023 Jan;138:102297. doi:
366 10.1016/j.tube.2022.102297. Epub 2022 Dec 20.
- 367 28. Skhairia MA, Dekhil N, Mhenni B, Fradj SB, Mardassi H. Successful expansion of
368 Mycobacterium tuberculosis Latin American and Mediterranean sublineage
369 (L4.3/LAM) in Tunisia mainly driven by a single, long-established clonal complex. *Int*
370 *J Infect Dis*. 2021 Feb;103:220-225. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.195.
- 371 29. Castro-Rodriguez B, León-Ordoñez K, Franco-Sotomayor G, et al. *A first insight*
372 *into tuberculosis transmission between Ecuador and Peru through the population*
373 *structure of Mycobacterium tuberculosis in the border province of ‘El Oro’*. 2023.
- 374 30. Mora-Pinargote C, Garzon-Chavez D, Franco-Sotomayor G, et al. Country-wide
375 rapid screening for the Mycobacterium tuberculosis Beijing sublineage in Ecuador
376 using a single-nucleotide polymorphism-polymerase chain reaction method. *Int J*
377 *Mycobacteriol* 2019; 8: 366–370.
- 378 31. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized
379 mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of
380 Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498–4510.
- 381 32. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, et al. Tuberculosis in Peru: Epidemiological
382 situation, progress and challenges for its control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*
383 2017; 34: 299–310.
- 384 33. Supply P. *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of*
385 *Mycobacterium tuberculosis Technical Guide*,
386 <https://www.researchgate.net/publication/265990159> (2014).
- 387 34. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain
388 differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin*
389 *Microbiol* 1997; 35: 907–914.
- 390 35. García-Jiménez WL, Cortés M, Benítez-Medina JM, et al. Spoligotype diversity and
391 5-year trends of bovine tuberculosis in Extremadura, southern Spain. *Trop Anim*
392 *Health Prod* 2016; 48: 1533–1540.

393 36. Allix-Béguet C, Harmsen D, Weniger T, et al. Evaluation and Strategy for Use of
394 MIRU-VNTRplus, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping
395 Data and Phylogenetic Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex
396 Isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2692–2699.

397 37. Acosta F, Saldaña R, Miranda S, et al. Heterogeneity of Mycobacterium
398 tuberculosis Strains Circulating in Panama’s Western Region. *Am J Trop Med Hyg.*
399 Epub ahead of print 21 August 2023. DOI: 10.4269/ajtmh.23-0039.

400 38. Islam Z, Thada PK, Rahmat ZS, Akhtar S, Ahmad S, Costa ACDS, Hasan MM,
401 Ahmad S, Essar MY. Tuberculosis behind bars in Latin America and Caribbean: A
402 growing public health crisis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2022 Dec;43(12):2000-
403 2002. doi: 10.1017/ice.2021.424.

404 39. Arenas-Suarez NE, Cuervo LI, Avila EF, et al. The impact of immigration on
405 tuberculosis and HIV burden between Colombia and Venezuela and across frontier
406 regions. *Cad Saude Publica*; 37. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1590/0102-
407 311X00078820.

408

409

410

411

412

413

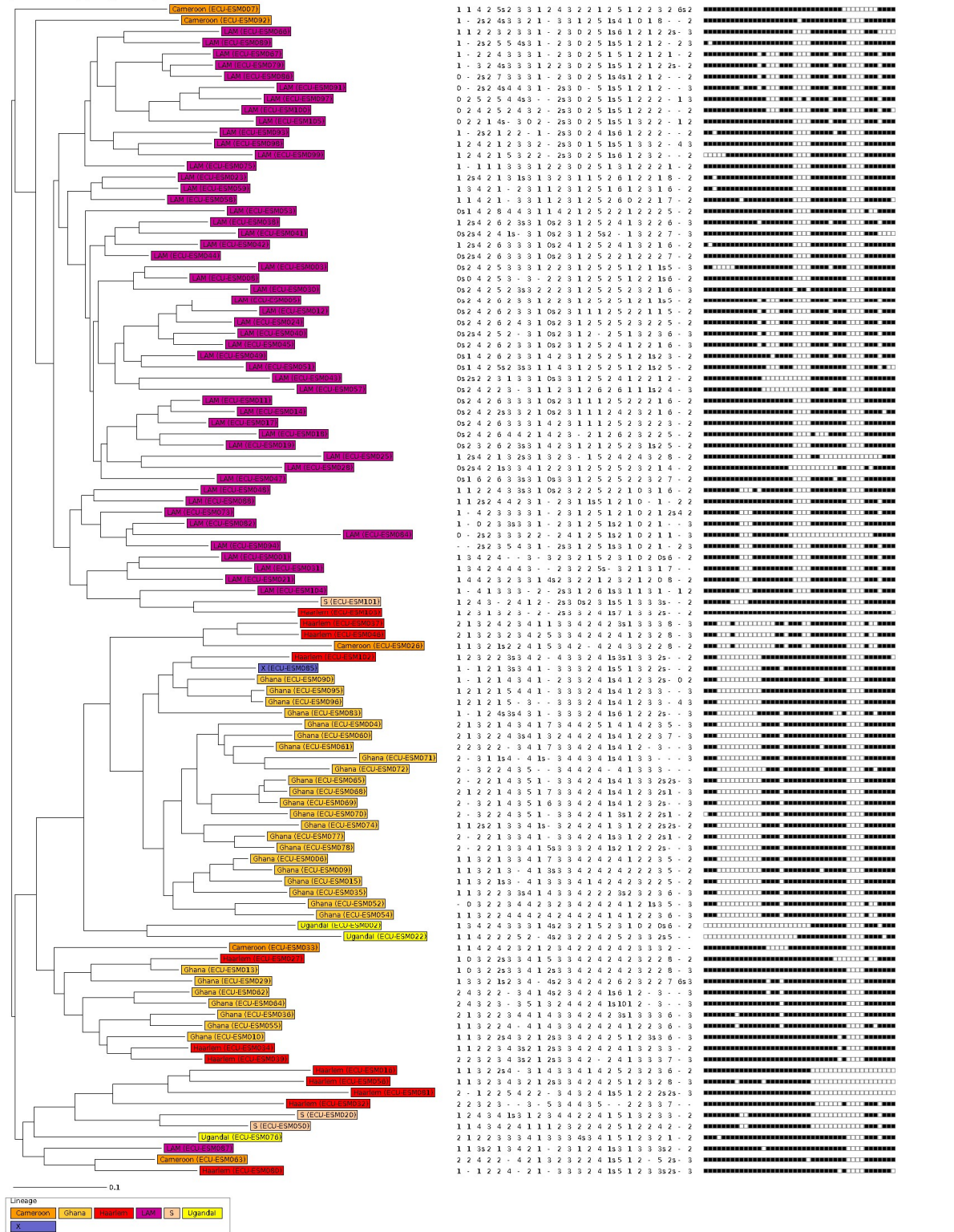
414 **Table 1.** Drug resistance profile for MTBC strains from Esmeraldas included in this
415 study (MDR-TB are strains resistant to Isoniazid+Rifampicin).

Drug Resistance Profile	Isolates	Prevalence (%)
Isoniazid resistant	23	23.5
Streptomycin resistant	10	10.2
Ethambutol resistant	6	6.1
Rifampicin resistant	17	17.3
Pyrazinamide resistant	5	5.1
MDR-TB	16	16.3
Sensible to all tested drugs	71	72.4
Total	98	
Without information	7	6.7

416

417

NJ-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)



418

419 **Figure 1.** Population structure of MTBC from Esmeraldas province. The Neighbor Joining
 420 Tree was done with 24-loci MIRU-VNTR and Spoligotyping data.

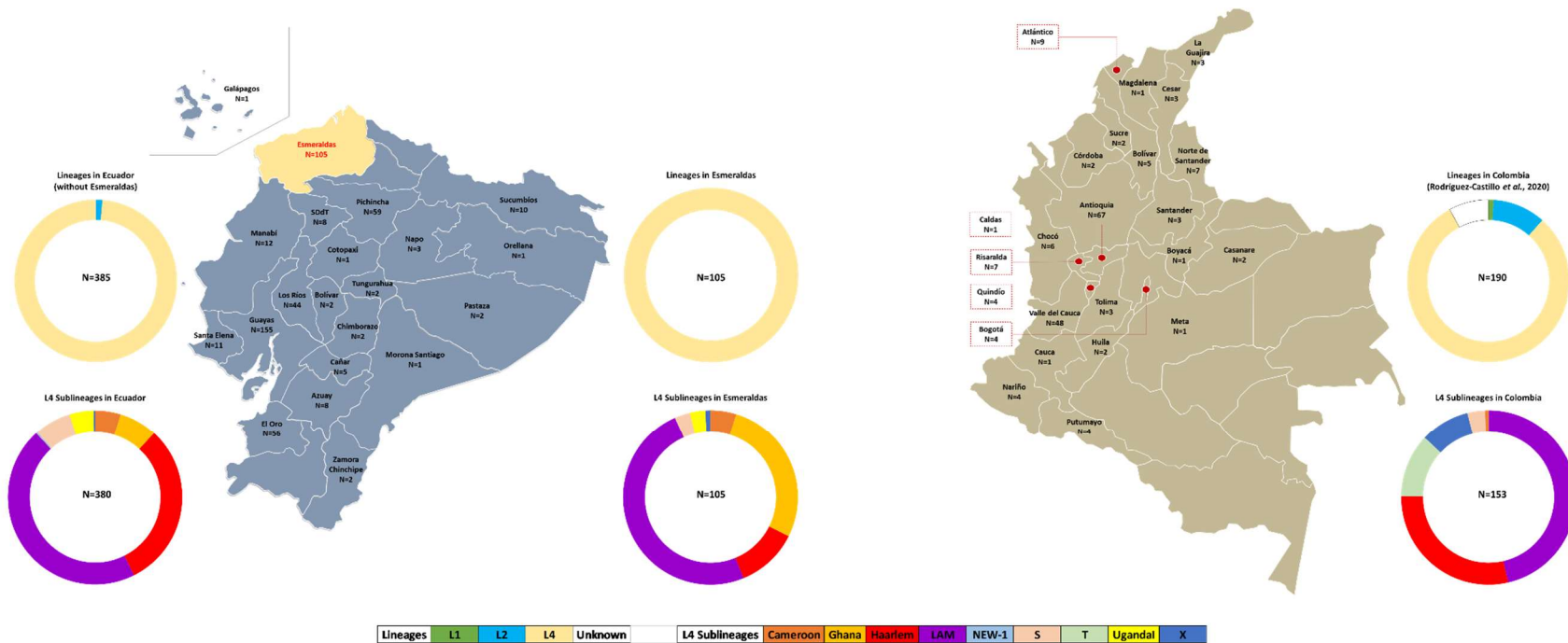


Figure 2. Geographical and sublineage distribution of MTBC strains from Esmeraldas (our study), Ecuador (Garzon et al., 2020) and Colombia (Rodríguez-Castillo et al., 2020). Ring-charts represent occurrence of MTBC lineages in Esmeraldas province, rest of Ecuador and Colombia.

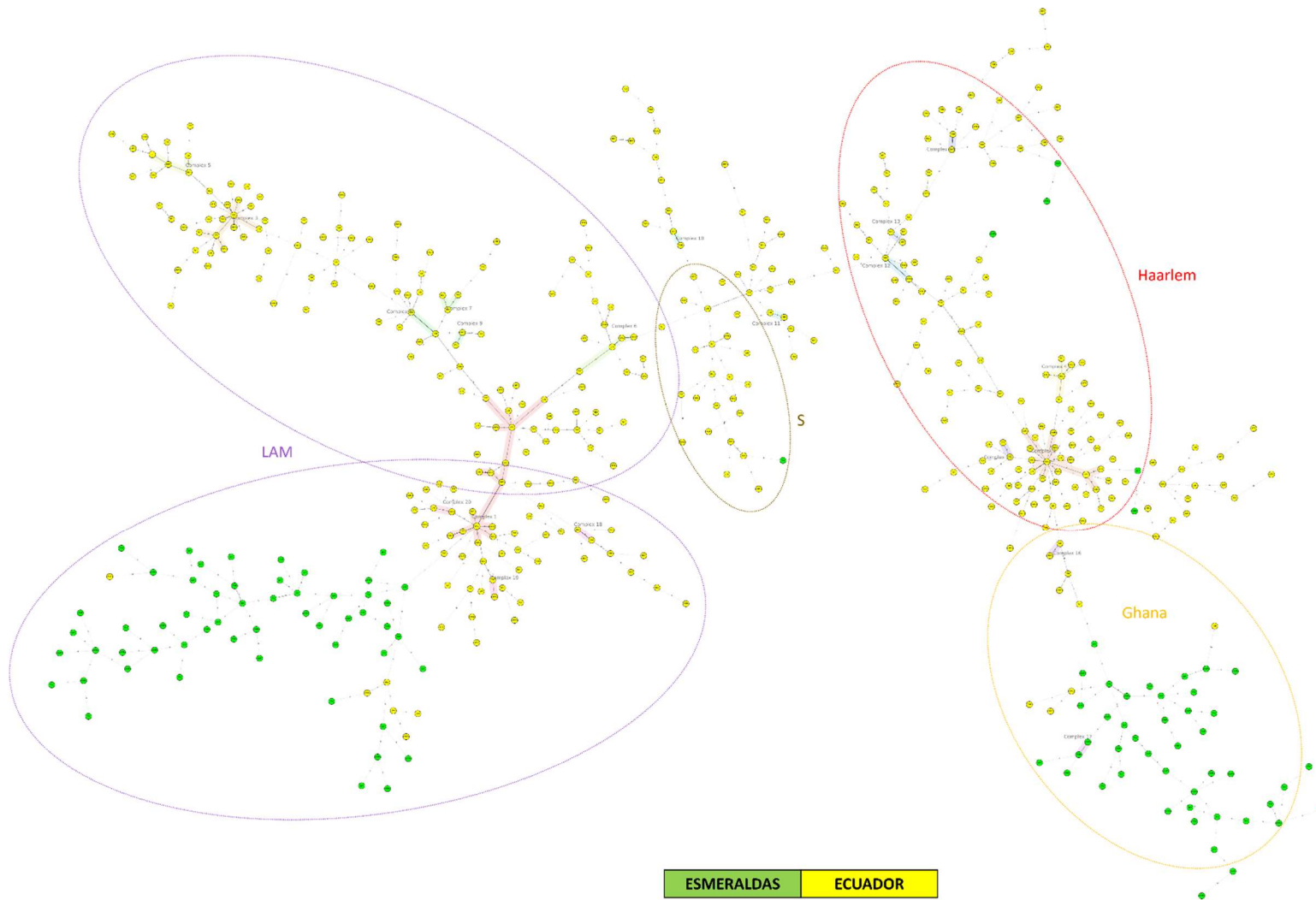


Figure 3. Minimum Spanning Tree of MTBC strains from Ecuador and Esmeraldas included in this study using 24-loci MIRU-VNTR data. Distinction of genotypic lineages is shown by dotted circles of different colors. Maximum locus difference within a clonal complex is 2.

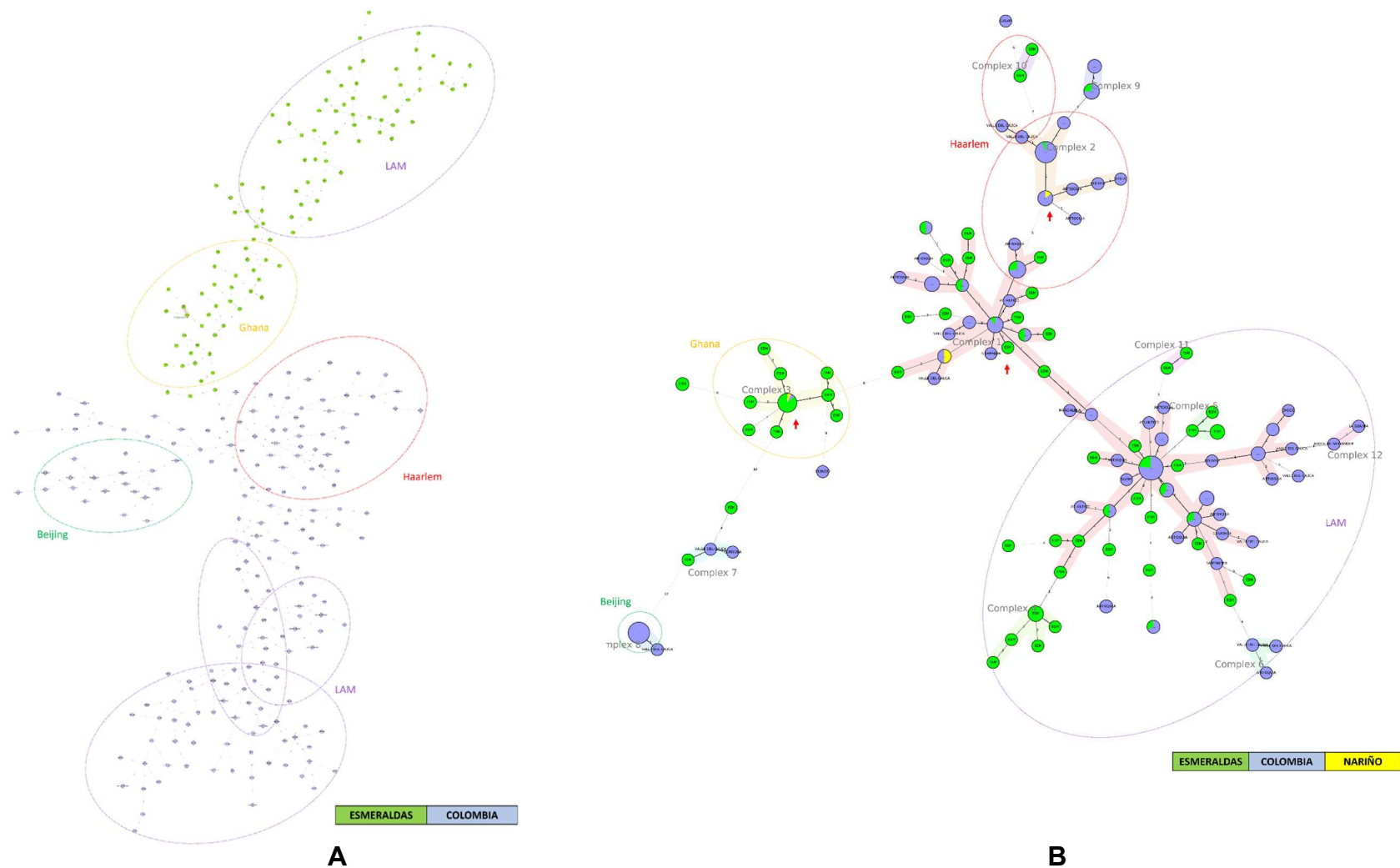
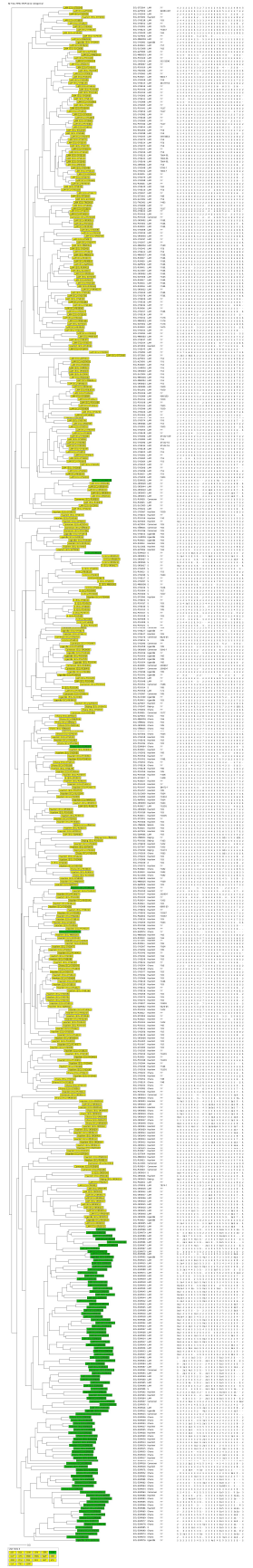
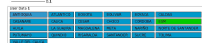
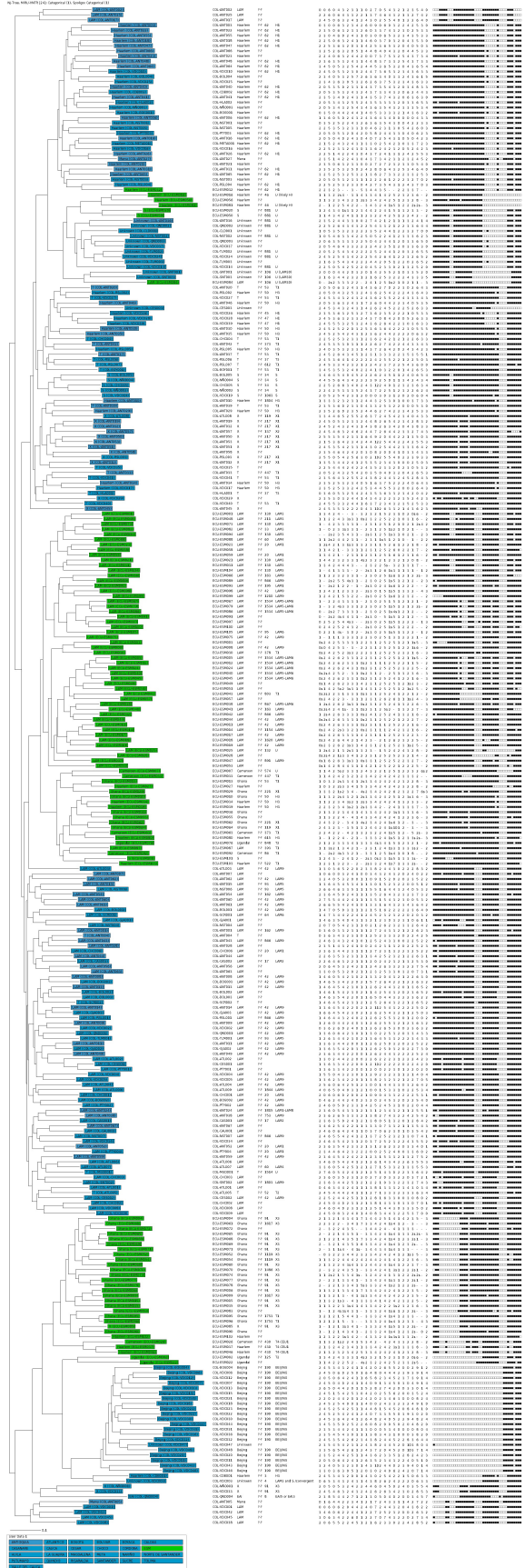


Figure 4. Minimum Spanning Trees of MTBC strains from Esmeraldas and Colombia included in this study: A) using 24-loci MIRU-VNTR data, and B) using Spoligotyping data. Distinction of genotypic lineages is shown by dotted circles of different colors. Red arrows indicate clonal complexes formed between MTBC strains from Esmeraldas province and Colombia (Maximum locus difference within a clonal complex is 2). MTBC strains from the Colombian Department of Nariño, in the border with Esmeraldas, are labelled in yellow.

Supplementary Figure 1: 24-loci MIRU-VNTR based Neighbour-Joining Tree of MTBC strains from Esmeraldas province and Ecuador.

Supplementary Figure 2: Neighbour-joining Tree of MTBC strains from Esmeraldas province and Colombia included in the study. Spoligotyping and 24-loci MIRU-VNTR information was used for the construction of the dendrogram.





8. DISCUSIÓN

8.1. Estructura poblacional de MTB en el Ecuador

El uso de técnicas de epidemiología molecular ha permitido identificar cadenas de transmisión recientes, la incidencia de casos de TB con firmas moleculares idénticas, formación de clústeres y otros elementos asociados a brotes de TB, siendo fundamental para mejorar las estrategias de vigilancia y control en entornos con cargas elevadas de TB [39, 41]. Considerando que la región de América Latina está compuesta principalmente por países en vías de desarrollo con ingresos económicos intermedios y bajos, la implementación de técnicas moleculares asequibles ha contribuido con el desarrollo de la investigación para comprender la filogeografía y la dinámica de transmisión de las cepas MTBC en la región. Sin embargo, existe una variabilidad importante entre los países latinoamericanos en cuanto a la producción científica que permita un conocimiento más profundo del panorama de la TB en cada país. Una revisión bibliográfica realizada en 2023 por Castillos de Ibrahim das Neves y colaboradores en la que recopilaron información de 345 estudios de genotipificación de MTBC publicados entre los años 1993 y 2021, reporta que los países científicamente productivos son Brasil (37.1%), México (15.1%), Argentina y Perú (13% cada uno) y Colombia (10.7%) [41]. Ecuador es un país de alta incidencia de tuberculosis donde se dan condiciones adecuadas para la transmisión y el establecimiento de cepas peligrosas de MTB. Sin embargo, ha tenido un desarrollo muy limitado en cuanto a estudios de epidemiología molecular de MTB. Durante los últimos 20 años, tan solo hay descritos en la bibliografía 6 artículos científicos donde se analizan los genotipos de MTB circulantes en el país: la investigación publicada en el 2023 por Garcés *et al.* determinó la estructura poblacional de 36 aislados MTB recolectados en 2016 de una prisión de la ciudad de Guayaquil [55]; Morey-León *et al.* realizaron una publicación en 2023 analizando 88 aislados de MTB recolectados fundamentalmente en provincias de la Costa y con más del 80% de los aislados resistentes a drogas [115]; en 2022, Morey-León *et al.* publicaron un estudio con 21 cepas MTB drogo resistentes recolectadas en 2020 provenientes de Guayaquil [56]; en 2019, Zurita y colaboradores analizaron 104 muestras de MTB recolectadas entre 2002 y 2014 de un hospital privado de la ciudad de Quito [57]; en 2017, Jiménez y colaboradores detectaron una cepa Beijing dentro de un grupo muy reducido de 28 muestras colectadas entre los años 2006 y 2012 [116]. Finalmente, en 2020, nuestro grupo de investigación publicó el primer estudio sobre la estructura poblacional de MTB en

Ecuador, incluyendo muestras de todas las regiones del país hasta un total de 373 aislados entre los años 2013 y 2016 [22].

8.2. Transmisión de TB a través de las fronteras

Considerando los resultados de los estudios antes citados, se establece que el linaje predominante en el Ecuador es el L4, siendo el sublinaje LAM el más representativo del grupo, mientras que las cepas pertenecientes al linaje L2-genotipo Beijing representan un valor por debajo del 1%, a diferencia de los reportes presentados para Colombia (5%) y Perú (16%) [54], considerados como países de entrada del genotipo Beijing en el continente y que comparten una política de fronteras abiertas con Ecuador. Las características de las cepas que pertenecen a L2 y L4 se asocian con ventajas adaptativas para una transmisión incrementada y mayor virulencia [78, 80], junto con rasgos de la población huésped (factores socioeconómicos, geográficos y genéticos) que se comparten entre los tres países, motivan a pensar que existe un entorno favorable para la distribución de las micobacterias pertenecientes a linajes peligrosos como L4-LAM-RD^{Rio} y L2-Beijing [78]. Por estas razones, el movimiento de personas a través de las fronteras presenta una particularidad cuando se trata de individuos que se dedican a actividades socioeconómicas que les permiten sustentarse, a diferencia del sector de la población que permanece por periodos de tiempo cortos (turistas o visitantes) [117]. De esta manera, la migración a través de la frontera representa un problema de salud pública cuando se trata de enfermedades infecciosas como la TB. Por ejemplo, en países con incidencias bajas de TB, como Canadá o Israel, se ha observado un decrecimiento en la incidencia de la TB en las poblaciones residentes, mientras que la incidencia ha ido en aumento en la población migrante [117]. Desde el punto de vista epidemiológico en países que presentan una gran población migrante, el uso de técnicas de genotipificación estándar puede fallar en diferenciar las nuevas importaciones de la transmisión interna de TB en un país de acogida, por lo que la combinación de técnicas es la mejor aproximación [101, 118]. Por ejemplo, un estudio realizado en España analizó por medio de MIRU-VNTR y WGS las cepas de migrantes provenientes de Rumanía, Marruecos, Senegal, Mali y Nigeria con cepas de residentes de España, identificando que las cepas de cinco de los diez clústeres obtenidos no presentan las distancias genéticas cortas que se esperan en transmisiones recientes, además de un

elevado número de SNPs, lo que sugiere que existen importaciones de TB independientes desde el país de origen. Sin embargo, para la resolución de clústeres más complejos se trabajó con la PCR de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO-PCR) para identificar nuevos casos secundarios [118]. En Brasil, se realizó un estudio en el estado de Roraima que limita con Venezuela y Guyana, una localidad con movimientos poblacionales continuos y con una elevada concentración de individuos vulnerables. Se genotipificaron 80 cepas obtenidas de hospitales del estado de Roraima por IS6110-RFLP, espigotipado y MIRU-VNTR de 24-loci, determinando una elevada diversidad genética de las cepas circulantes en la región por la presencia de perfiles únicos, con tasas de transmisión bajas en comparación con otros estudios realizados en Brasil, debido al flujo constante de migrantes regulares e irregulares [119]. Un resultado similar se encontró en otro estudio realizado en la región de frontera triple de Brasil, Paraguay y Argentina, en el cual analizaron 97 aislados por MIRU-VNTR de 24-loci y espigotipado, identificando 15 de 97 como RD^{Rio} por PCR multiplex. El estudio determinó una elevada variabilidad clonal de las cepas analizadas, aunque no se pudo determinar la transmisibilidad por falta de información [120].

Los estudios antes mencionados son ejemplos del manejo de técnicas moleculares para el análisis de clústeres de MTBC y la definición de la transmisión transfronteriza para establecer programas de vigilancia y control epidemiológico de forma integrada en cada región [118–120]. Sin embargo, no existen estudios sobre la transmisión de tuberculosis en zonas de frontera de Ecuador con Perú y Colombia. En una publicación previa de nuestro grupo, se identificaron la existencia de clústeres de transmisión entre Ecuador y Colombia [22]. En dicho estudio se incluyeron 373 aislados de MTB de todo el Ecuador, aunque solo 23 y 14 aislados correspondieron a las provincias de frontera con Perú y Colombia, respectivamente. Además, debido a la elevada prevalencia del linaje de MTBC L2-Beijing en Perú y Colombia [54], nos planteamos estudiar la posibilidad de que haya transmisión activa de este linaje u otros de MTBC entre Ecuador y sus países vecinos. Para ello, se analizó la estructura poblacional de todos los aislados de las provincias de frontera disponibles en el Centro Nacional de Referencia para Micobacterias de Ecuador en el mismo periodo de estudio de nuestra publicación previa. De esta forma, se identificaron un total de 56 y 105 aislados de MTBC de las provincias de El Oro (frontera con Perú) y Esmeraldas (frontera con Colombia), que se incluyeron en el presente estudio. Por tanto, esta investigación es pionera

en el Ecuador al estudiar el estado de la estructura poblacional de cepas de MTB en dos provincias fronterizas y su análisis conjunto con las cepas de MTBC reportadas en la bibliografía para Perú [121, 122] y Colombia [31].

Los resultados encontrados en nuestros trabajos indican el predominio de cepas de L4 dentro de las provincias de El Oro y Esmeraldas, particularmente de los sublinajes LAM, Haarlem, Cameroon y Ghana. Esto sugiere un proceso de importación durante el periodo colonial de cepas L4 desde Europa y África, seguido por eventos adaptación a la población huésped por diferentes mecanismos adoptados por los diferentes sublinajes. De esta forma, los sublinajes LAM y Haarlem exhiben un nicho ecológico más amplio, con una dispersión geográfica mayor y una capacidad incrementada de producir enfermedad en diferentes poblaciones humanas, mientras que los sublinajes Cameroon y Ghana presentan una mayor adaptabilidad a su población huésped, limitando su expansión geográfica y con una transmisibilidad reducida. Estas condiciones reflejan la diversidad fenotípica y genética de L4 [32]. La elevada variabilidad genética que existen en las cepas analizadas de las provincias de El Oro y Esmeraldas no permite la formación de clústeres de transmisión activa con cepas de otras provincias del Ecuador o con las cepas de Colombia y Perú usadas en el análisis. Estos eventos pueden estar relacionados con las malas condiciones socioeconómicas de estas provincias, zonas rurales extensas, con acceso limitado a la infraestructura sanitaria y elevada presencia de población vulnerable, que hace que los nuevos casos de TB en la población estén asociados principalmente a la reactivación de infecciones latentes de TB más que a eventos recientes de transmisión activa. Estos hallazgos son similares a los reportados por Acosta *et al.* para la región occidental de Panamá, de donde se obtuvieron 87 aislados de MTB colectados en 2017, 2019, y 2021, para ser analizados por medio de ASO-PCR y MIRU-VNTR de 24-loci. Los resultados obtenidos indican una elevada variabilidad genética en los aislados estudiados; sin embargo, no existe la presencia de clústeres de transmisión local en la región occidental de Panamá, una zona rural con condiciones socioeconómicas de pobreza, similar a las provincias ecuatorianas que hemos estudiado en este trabajo [68].

A diferencia de los resultados encontrados en nuestras investigaciones en cepas de provincias de frontera, existen varios estudios que detallan la transmisión activa, ya que los programas de control y vigilancia de TB se enfocan en usar las técnicas de genotipificación

para poder monitorear la importación y transmisión de linajes peligrosos. El uso de clústeres para la identificación de cadenas de transmisión es la manera más común [101]. Por ejemplo, un estudio publicado en 2022 por Castellanos y colaboradores en Guatemala, analizaba por espoligotipado muestras de pacientes con HIV para determinar la transmisión activa de MTB en el país dada la elevada proporción de aislados localizados dentro de clústeres [49]; Chizimu y colaboradores publicaron un trabajo en 2022 acerca de la diversidad genética y la transmisión de 85 cepas de MTB colectadas entre 2013 y 2017, determinando que existen eventos de transmisión reciente por una elevada tasa de clusterización en Lusaka, Zambia [61].

Sin embargo, el uso de epidemiología molecular para la detección de cadenas de transmisión debe combinarse con otras estrategias para romper la transmisibilidad de TB, a base de mejores técnicas de diagnóstico y medidas sanitarias [123]. Considerando que la reducción en la notificación de nuevos casos de TB durante los años de pandemia refleja un problema creciente de casos sin diagnóstico [5], se los debe tomar en cuenta como un foco de transmisión de TB en las comunidades. Las estrategias de los programas de control de TB solamente pueden ser eficientes cuando se considera la verdadera carga de la enfermedad, tomando en cuenta los casos que se perdieron por problemas de subdiagnóstico. Las principales razones por las que puede ocurrir el subdiagnóstico refieren a la falta de acceso a los servicios de TB, inestabilidad financiera en la población vulnerable y afectada, fallas en la detección de MTB, abandono de las terapias de antibióticos, y un manejo pobre en la recolección de datos clínicos y epidemiológicos. Desde el punto de vista del paciente, un diagnóstico errado junto con el abandono de la terapia antituberculosa, son elementos que incrementarán el riesgo de transmisión inadvertida a sus contactos, que pueden mantener un estado LTBI durante años para desarrollar TB activa años después de la infección [123].

De esta manera, el diagnóstico rápido y preciso con pruebas de diagnóstico con sensibilidades sobre el 90%, combinado con el seguimiento del régimen de tratamiento a nivel individual, pueden disminuir las tasas de transmisión de TB. En ambos estudios se sostiene la idea de que los casos que se detectan en estas zonas son procesos de reinfección después del fallo en la continuidad del tratamiento anti-TB o en la reactivación endógena. Una buena parte de las personas infectadas con MTB desarrolla la versión latente de la enfermedad, y los individuos con LTBI tienen un riesgo bajo de desarrollar TB activa; sin

embargo, la LTBI es una condición inestable, intermitente, con episodios progresivos de replicación micobacteriana, por lo que una alteración en el sistema inmune del huésped puede iniciar el desarrollo de TB activa [124]. Por esta razón, los programas de control y vigilancia de TB deben combinarse con programas de promoción de salud para la ruptura de cadenas de transmisión a nivel comunitario, basándose en el manejo de los entornos ambientales que puedan favorecer la viabilidad de MTB, que suelen ser ambientes cerrados con poca ventilación, exposición mínima a la luz y humedad elevada. Estas condiciones junto con la exposición prolongada al individuo infectado por efecto del hacinamiento facilitan la transmisión de la TB [123]. Por otro lado, los factores del huésped humano también juegan un papel importante en el proceso de transmisión: estado inmunológico (heredado y adquirido), modificación epigenética, edad, uso de medicamentos y factores de riesgo como tabaquismo, diabetes y la coinfección con VIH o con otros agentes respiratorios [125]. De esta manera, la promoción de programas de salud para el mejoramiento del estilo de vida también disminuiría la transmisibilidad de TB.

Las limitaciones encontradas en este trabajo se derivan fundamentalmente de la colección de cepas usadas. La disponibilidad de un número mayor de aislados provenientes de las provincias estudiadas se relaciona con la organización de los laboratorios con capacidad de detección, cultivo y almacenamiento de micobacterias. El Centro Nacional de Referencia para Micobacterias (CNR) de donde se pudo acceder a la colección de cepas, pertenece al Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI). Este laboratorio que se encuentra en la ciudad de Guayaquil, provincia del Guayas, presenta las condiciones adecuadas para poder realizar una serie de ensayos relacionados con el diagnóstico, cultivo y almacenamiento de aislados de MTB, por lo que la gran mayoría de muestras sospechosas de TB se derivan hacia este laboratorio, centralizando los procesos de diagnóstico. A pesar de que existen otros laboratorios con condiciones similares para el manejo microbiológico de MTB en la ciudad de Quito y Cuenca, no presentan la capacidad para manejar el volumen de muestras que se reciben en el laboratorio de Guayaquil. Esta condición se relaciona con un sesgo geográfico que afecta la disponibilidad de muestras de otras provincias por dos razones: 1) la mayoría de muestras que se reciben en el CNR provienen de hospitales y centros de salud de la ciudad de Guayaquil, por lo que en la colección existe una sobrerrepresentación de cepas de la provincia del Guayas, y 2) al

centralizarse en el CNR la recepción de muestras sospechosas, muchos de los pacientes residentes en otras provincias que no tienen la capacidad de desplazarse a Guayaquil, entran en el grupo de individuos sin diagnóstico y que no acceden a un tratamiento adecuado. Por esta razón, el acceso a un mayor número de muestras de las provincias de El Oro y Esmeraldas es complicado. Las cepas estudiadas pertenecen a provincias con características importantes que se consideran en los estudios de epidemiología molecular realizados: presentan una población que reside principalmente en zonas rurales, pertenecen a un nivel socioeconómico bajo y, de acuerdo con el último boletín de TB, son provincias con una elevada incidencia de TB [24]. Por otro lado, son las únicas provincias limítrofes con una cantidad relativamente considerable de muestras para poder realizar los estudios, ya que dentro del período de tiempo de recolección de los aislados no se reportaron muestras de otras provincias limítrofes con Colombia (Carchi y Sucumbíos) y con Perú (Loja y Zamora Chinchipe). Actualmente nos encontramos trabajando para poder acceder a colecciones de MTB más grandes y recientes, donde esperamos contar con datos de las otras provincias limítrofes que complementarán los resultados obtenidos en nuestros estudios.

8.3. Resistencia a antibióticos usados en el tratamiento contra TB

Aunque la incidencia global de la TB muestra una disminución lenta, la enfermedad continúa fuera de control en áreas con cargas elevadas del patógeno. Por esta razón, muchos países que han logrado avances en la reducción de casos de TB presentan un problema grave con la aparición de cepas resistentes a los antibióticos usados en terapia contra la TB [5]. Si bien la MDR-TB representa sólo el 6%-7% de la carga total de TB, es un problema importante de salud pública por varias razones: en primer lugar, la TB drogo resistente tarda más tiempo en ser diagnosticada y se asocia con diferentes morbilidades pulmonares; en segundo lugar, la DR-TB se asocia con un incremento en la mortalidad, por lo que alcanzar una reducción global importante de la mortalidad por TB puede ser muy difícil. Además, la MDR-TB y la XDR-TB también se asocian con un coste económico considerable que puede desestabilizar los presupuestos y los recursos sanitarios destinados para el control de la TB [126]. Sin embargo, existen otros factores del patógeno y del huésped que afectan a la distribución de las micobacterias drogo resistentes [78]. Las cepas que pertenecen a los linajes L2 y L4 están comúnmente asociadas con el desarrollo de características que favorecen la

transmisibilidad, la virulencia, la supervivencia al tratamiento antituberculoso, y la tendencia a incrementar la tasa de CM para la adquisición de resistencia [78, 80]. La drogo resistencia en el Ecuador se ha reportado en varias publicaciones que definen a las cepas del linaje L4 como las más comunes entre los aislados resistentes, siendo el sublinaje LAM el más representativo en Ecuador, seguido por Haarlem y S [22, 56, 57]. El desarrollo de mutaciones asociadas a la resistencia a antibióticos antituberculosos es un factor importante para la supervivencia de las micobacterias en sus huéspedes, por lo que diversos estudios han realizado asociaciones entre los linajes de MTBC y la ocurrencia de mutaciones de resistencia [79, 80]. Las mutaciones en los codones 445, 450, 531, 515, 516 y 526 del gen *rpoB* son las más frecuentes en las cepas ecuatorianas resistentes a la rifampicina, mientras que las mutaciones en el codón 315 del gen *katG* son comunes en las cepas ecuatorianas resistentes a la isoniazida, ambos genes altamente relacionados con las cepas de Beijing (L2) [56, 57, 115]. De acuerdo con los estudios realizados previamente por nuestro equipo de trabajo, no existe una asociación fuerte entre la drogo resistencia y el genotipo Beijing reportado para Ecuador [72]. Por otro lado, las cepas RD^{Rio} pueden tener ventajas biológicas que mejoren su virulencia y transmisibilidad debido a deleciones que se encuentran en dos proteínas de prolina-ácido glutámico (PPE5y PPE6) que están asociadas la modulación inmune [127–129], y que podrían explicar la transmisión de RD^{Rio} en países con alta prevalencia de este genotipo, como Venezuela y Brasil [130, 131]. La prevalencia del genotipo RD^{Rio} en Ecuador reportada por nuestro equipo es la más baja de la región hasta la fecha (2.1%), a pesar de que los países vecinos de Colombia y Perú reportan prevalencias sobre el 30% [65]. Sin embargo, en este grupo de aislados RD^{Rio} ecuatorianos, el 29.4% se reportan como cepas MDR. Además, las cepas RD^{Rio} reportadas en nuestro trabajo presentan una diversidad genética mayor en comparación con otros aislados de la región, lo que sugiere una introducción temprana del genotipo en el Ecuador antes de la aparición de la cepa RD^{Rio} altamente transmisible que actualmente circula en algunos países de América Latina. De esta manera, la ocurrencia de características genéticas que afectan a las cepas MTBC o a la población huésped podrían explicar la transmisión reducida del sublinaje en el Ecuador a diferencia de otros países de América del Sur [22, 65]. Por estas razones, es importante considerar las condiciones epidemiológicas del país, ya que podrían facilitar la propagación de cepas altamente virulentas y resistentes a los medicamentos, como Beijing y RD^{Rio}, ya que a la fecha el Ecuador reporta prevalencias bajas para ambos genotipos y que

podrían variar en poco tiempo, debido a la política de fronteras abiertas con diversos países de la región, específicamente Perú y Colombia que reportan prevalencias elevadas para ambos genotipos [54, 55, 65, 72], además de Venezuela que presenta una de las prevalencias más altas de RD^{Rio} para la región [60]. La crisis económica, política y humanitaria que todavía ocurre en Venezuela, ha obligado a más de 2-3 millones de personas a salir del país desde 2017. Según la publicación de Torres y Castro en 2019, solamente en el año 2017 ingresaron un total de 225 000 migrantes venezolanos de manera irregular al Ecuador [132]. Actualmente, la crisis en Venezuela involucra componentes socioeconómicos, políticos, logísticos y humanitarios complejos que produjeron una ola migratoria masiva de gran impacto, difícil de medir en su magnitud debido a la falta de acceso a información epidemiológica oficial, el estado migratorio irregular de los migrantes, la falta de cifras sobre el costo de los servicios sanitarios y los recursos gastados por los países de destino [132]. Durante el proceso migratorio, es común que los migrantes se vean sometidos a situaciones de alto estrés como escasez de alimentos, viviendas con condiciones sanitarias deficientes, hacinamiento y falta de acceso a servicios de salud, lo que los vuelve particularmente vulnerables a la TB y facilita la diseminación de la enfermedad [133]. De esta manera, las áreas de baja incidencia en los países de acogida pueden convertirse en nuevos focos de transmisión activa de TB y de MDR-TB por una posible escasez de medicamentos y un incremento de individuos que han abandonado el tratamiento de la TB en Venezuela, contribuyendo al incremento de casos de TB/MDR-TB y promoviendo problemas imprevistos en los programas nacionales de control en los países de destino [17]. Por esta razón, nuestro equipo está trabajando en el acceso a las colecciones más recientes de aislados MTB (años 2017 – 2022) para observar el impacto que haya podido tener la migración venezolana en los últimos años en el Ecuador, utilizando la evolución temporal de la prevalencia del linaje RD^{Rio} como potencial marcador de importación de TB. De esta manera, la implementación de herramientas de epidemiología molecular en los programas de vigilancia y monitoreo de TB es crucial en las áreas ubicadas en las fronteras, donde el intercambio económico, cultural y social influye en las condiciones de salud [12].

8.4. Detección de MTBC y NTM

Estudios previos establecen que el poder de resolución y de discriminación de técnicas clásicas y baratas, como por ejemplo MIRU-VNTR de 24-loci o espoligotipado, cuando se usan en conjunto proveen de información importante para la resolución a nivel de linaje, sublinaje o cepas [39, 134–137]; además de considerar la introducción de sistemas rápidos y certeros para la detección de micobacterias diferentes a MTBC, que son microorganismos oportunistas que se desarrollan en el ambiente y que pueden generar enfermedades, especialmente en individuos con un sistema inmune comprometido [85, 86].

Como se ha mencionado previamente, uno de los problemas en el control de la TB en el Ecuador es el subdiagnóstico de la enfermedad asociado al acceso limitado a pruebas de diagnóstico, personal sanitario sin entrenamiento, ausencia de un seguimiento y vigilancia de casos, además del uso de técnicas microbiológicas que consumen tiempo y que requieren experiencia por parte del operador [24–26]. Por ejemplo, la baciloscopía y el cultivo son métodos de referencia que se usan comúnmente para la detección de MTBC y otras micobacterias, pero carecen de la velocidad y la capacidad de diferenciación que otras técnicas moleculares pueden proveer, por lo que el uso conjunto de ambas metodologías aumenta el poder discriminatorio para diferenciar NTM de MTBC, favoreciendo la reducción de tiempos de entrega de resultados y el establecimiento de tratamientos acordes para la infección micobacteriana a tratar [82]. Sin embargo, Ecuador es un país que depende únicamente de los recursos económicos públicos para invertir en la actualización de metodologías, equipos e infraestructura destinados para la detección y el diagnóstico de micobacterias [25], por lo que el uso de técnicas microbiológicas de referencia todavía es la herramienta principal para la diferenciación entre micobacterias, lo que favorece el desconocimiento de la prevalencia, incidencia y distribución de NTM en el país, debido que estas infecciones micobacterianas no suelen reportarse o se confunden con MTBC por el desconocimiento de la microbiología y epidemiología de las NTM [85]. A la fecha existen tres estudios realizados en NTM en el Ecuador que reportan reidentificaciones en casos clínicos antiguos de hospitales privados y la detección de NTM en tuberías de agua en consultorios dentales privados [138–140], lo que demuestra un profundo desconocimiento de la incidencia y distribución de este tipo de micobacterias en el país. Sin embargo, no es un evento que se asocia únicamente con países en vías de desarrollo, ya que la incidencia y

prevalencia de las enfermedades ocasionadas por NTM son difíciles de determinar por las variaciones en los sistemas de notificación de cada país [85, 141]. Esto se observa en el trabajo realizado por Corbett *et al.* en el 2023 con información de 11430 aislados NTM de los años 2016 a 2020, proporcionados por 22 laboratorios de toda Alemania, en el que indican una prevalencia de 5.1 a 5.6 por cada 100 000 habitantes entre los años 2016 a 2020, respectivamente; con una incidencia de pacientes con enfermedades pulmonares causadas por NTM entre 3.6-3.9 por cada 100 000 habitantes [142].

En definitiva, las micobacterias no tuberculosas (NTM) son un problema de salud pública a nivel mundial, ya que las características asociadas a estos microorganismos dificultan su detección debido a la dificultad de su cultivo, manejo y diferenciación microscópica [86, 143, 144]. Actualmente existen varios kits comerciales basados en PCR que permiten la detección/diferenciación rápida de NTM y MTBC [145–147]. Existen varios reportes que determinan el desempeño clínico de algunos kits comerciales disponibles, por ejemplo, el Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection V2.0 (Seegene, South Korea) con valores de sensibilidad para la detección de MTB entre 71% a 86% y especificidades de 94.9% a 99%, mientras que la detección de NTM reportó sensibilidades entre 44.9% y 100%, además de especificidades entre 97% y 97.7% [94, 148–150], o el Advansure™ TB/NTM Real-Time PCR Kit (LG Life Sciences, South Korea) que reporta valores de sensibilidad para la detección de MTB entre 78.1% y 96.2%, y especificidades entre 93.8% y 96.2%, mientras que la detección de NTM reportó sensibilidades entre 25% a 51.7%, y especificidades entre 97.8% y 98.3 25% [148, 150]. Considerando que los valores se obtuvieron al realizar ensayos de PCR con el ADN extraído de muestras clínicas, comparando con los resultados obtenidos de cultivo como el estándar de oro para el diagnóstico micobacteriano [94, 151], los reportes demuestran que el uso de métodos basados en PCR son técnicas adecuadas para la detección rápida y confiable de micobacterias, especialmente para la identificación de MTBC. Sin embargo, los resultados deben compararse con el análisis microbiológico para un diagnóstico definitivo [145, 147], especialmente con el amplio rango de sensibilidades y especificidades reportadas para la detección de NTM, ya que la cantidad y la calidad del espécimen clínico puede variar y afectar los resultados [94, 147]. Los kits de las marcas comerciales Viasure y Sansure analizados en nuestro estudio presentan un buen desempeño clínico para la detección de MTBC con una sensibilidad del 100% en comparación los

métodos de referencia. A pesar de que se observó una pequeña reducción en la especificidad del kit de Viasure, la coinfección de MTBC y NTM no se puede excluir. Sin embargo, la detección de NTM tiene una fuerte variación entre los kits: la sensibilidad reportada para el kit de Viasure es de 94% (95% IC: 87%-100%) con una especificidad del 100%, a diferencia de la sensibilidad obtenida para el kit de Sansure de 75.6% (95% IC: 62%-89%). A pesar de que los kits son recomendados para ser usados en la detección directa de micobacterias en muestras clínicas, nosotros realizamos los ensayos de PCR con ADN extraído de cultivo, por lo que anticipamos un desempeño clínico pobre para el kit Sansure para la detección de NTM en muestras clínicas, considerando que se deben realizar más ensayos para definir el desempeño clínico del kit de Viasure con muestras clínicas. Estos son resultados preliminares de un estudio más amplio en el que trabajamos con muestras clínicas de pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar para determinar el desempeño de los kits antes mencionados y compararlos con el kit de PCR Anyplex MTB/NTM Real-Time Detection Assay V2.0 (Seegene, Corea del Sur), considerado como una buena herramienta para la detección y diferenciación de MTBC y NTM en una variedad de tipos de especímenes [94, 152, 153].

9. CONCLUSIONES

1. Con respecto a las características genéticas de MTB en Ecuador, la presencia de los genotipos LAM-RD^{Río} y L2-Beijing es muy baja en comparación con los países vecinos de Colombia y Perú.
2. El genotipo LAM-RD^{Río} presenta una fuerte asociación a MDR-TB en Ecuador, por lo que la evolución de este sublinaje en el país debiera ser considerada dentro de la estrategia de vigilancia de TB.
3. La variabilidad genética de las cepas de MTBC analizadas es muy elevada tanto en la provincia de Esmeraldas como en la provincia del El Oro, sugiriendo una importante contribución a los casos de TB que se reportan en estas zonas de eventos de reactivación de TB latente.
4. No se han detectado clústeres de transmisión activa en las provincias de frontera analizadas que incluyan cepas de MTB de los países vecinos de Colombia y Ecuador, aunque se sugiere profundizar este tipo de estudios con un mayor número de aislados de MTB y en fechas más recientes.
5. Los kits comerciales de PCR disponibles en Ecuador permiten un diagnóstico diferencial de alta sensibilidad y especificidad para cultivos de MTBC, aunque la sensibilidad varía notablemente según la marca comercial para el diagnóstico diferencial de NTM.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Donoghue HD. Tuberculosis and leprosy associated with historical human population movements in Europe and beyond—an overview based on mycobacterial ancient DNA. *Ann Hum Biol* 2019; 46: 120–128.
- [2] Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, et al. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. *Tuberculosis* 2015; 95: S122–S126.
- [3] Nelson EA, Buikstra JE, Herbig A, et al. Advances in the molecular detection of tuberculosis in pre-contact Andean South America. *Int J Paleopathol* 2020; 29: 128–140.
- [4] World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2022*. Geneva, 2022.
- [5] World Health Organization. *Global tuberculosis report 2023*. Geneva, <https://iris.who.int/>. (2023).
- [6] Trauer JM, Dodd PJ, Gomes MGM, et al. The Importance of Heterogeneity to the Epidemiology of Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* 2019; 69: 159–166.
- [7] Chaw L, Chien L-C, Wong J, et al. Global trends and gaps in research related to latent tuberculosis infection. *BMC Public Health* 2020; 20: 352.
- [8] Shah M, Dorman SE. Latent Tuberculosis Infection. *New England Journal of Medicine* 2021; 385: 2271–2280.
- [9] World Health Organization. *The End TB Strategy*. Geneva, 2015.
- [10] Zimmer AJ, Klinton JS, Oga-Omenka C, et al. Tuberculosis in times of COVID-19. *J Epidemiol Community Health (1978)* 2022; 76: 310–316.
- [11] Woodman M, Haeusler I, Grandjean L. Tuberculosis Genetic Epidemiology: A Latin American Perspective. *Genes (Basel)* 2019; 10: 53.
- [12] Ortiz-Rico C, Aldaz C, Sánchez-Pérez HJ, et al. Conformance contrast testing between rates of pulmonary tuberculosis in Ecuadorian border areas. *Salud Publica Mex* 2015; 57: 496.

- [13] Mclvor A, Koornhof H, Kana BD. Relapse, re-infection and mixed infections in tuberculosis disease. *Pathog Dis*; 75. Epub ahead of print 1 April 2017. DOI: 10.1093/femspd/ftx020.
- [14] Pan American Health Organization. *Tuberculosis in the Americas. Regional Report 2021*. Washington D.C. Epub ahead of print 2023. DOI: <https://doi.org/10.37774/9789275126493>.
- [15] Pan American Health Organization. *Guidance for Tuberculosis Prevention and Control in Indigenous Populations in the Region of the Americas*. Washington D.C.: Pan American Health Organization. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.37774/9789275122778.
- [16] Cobo AEG, Betancourt MIF, Flores LCG, et al. Unsuccessful treatment tuberculosis in ecuadorian prisoners: Overcrowding and other factors associated. *Bol Malarial Salud Ambient* 2021; 61: 409–419.
- [17] Arenas-Suarez NE, Cuervo LI, Avila EF, et al. The impact of immigration on tuberculosis and HIV burden between Colombia and Venezuela and across frontier regions. *Cad Saude Publica*; 37. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1590/0102-311X00078820.
- [18] Datta Gupta S, Das P, Gahlot G, et al. Pathology of Tuberculosis. In: Sharma SK, Mohan A (eds) *Textbook of Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Diseases*. New Dehli: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2020.
- [19] De La Cruz CS, Seaworth B, Bothamley G. Pulmonary Tuberculosis. In: Friedman LN, Dedicat M, Davies PDO (eds) *Clinical Tuberculosis*. Boca Raton: CRC Press, 2020, pp. 237–2489.
- [20] Sharma SK, Mohan A. Tuberculosis: From an incurable scourge to a curable disease - journey over a millennium. *Indian J Med Res* 2013; 137: 455–93.
- [21] Reddy DB, Ellner JJ. Pathogenesis of Tuberculosis. In: Friedman LN, Dedicat M, Davies PDO (eds) *Clinical Tuberculosis*. Boca Raton: CRC Press, 2020, pp. 51–76.

- [22] Garzon-Chavez D, Garcia-Bereguain MA, Mora-Pinargote C, et al. Population structure and genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Ecuador. *Sci Rep*; 10. Epub ahead of print 1 December 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-62824-z.
- [23] Villacís B, Carrillo D. *País atrevido: la nueva cara sociodemográfica del Ecuador*. Quito: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2012.
- [24] Ministerio de Salud Pública del Ecuador. *Boletín Anual Tuberculosis 2018*. Quito, 2018.
- [25] World Health Organization. Tuberculosis profile: Ecuador, https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22EC%22 (accessed 14 August 2023).
- [26] Silva G, Pérez F, Marín D. Tuberculosis in children and adolescents in Ecuador: Analysis of reporting, disease characteristics and treatment outcome. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*; 43. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.26633/RPSP.2019.104.
- [27] Sánchez-Domínguez J, Nicola-Salas E, Morey-León G. Determinación de la mutación S315T del gen katG en aislados resistentes a Isoniacida de Mycobacterium tuberculosis mediante PCR-RFLP. *Infectio* 2018; 22: 178.
- [28] Franco-Sotomayor G, Garzon-Chavez D, Leon-Benitez M, et al. A First insight into the katg and rpob gene mutations of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Ecuador. *Microbial Drug Resistance* 2019; 25: 524–527.
- [29] World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2021*. Geneva, 2021.
- [30] Brites D, Gagneux S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the Mycobacterium tuberculosis Complex. In: Gagneux S (ed) *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–26.
- [31] Rodríguez-Castillo JG, Llerena C, Argoty-Chamorro L, et al. Population structure of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Colombia. *Tuberculosis*; 125. Epub ahead of print 1 December 2020. DOI: 10.1016/j.tube.2020.102011.

- [32] Stucki D, Brites D, Jeljeli L, et al. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet* 2016; 48: 1535–1543.
- [33] Ngabonziza JCS, Loiseau C, Marceau M, et al. A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat Commun* 2020; 11: 2917.
- [34] Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 581–591.
- [35] Click ES, Moonan PK, Winston CA, et al. Relationship Between Mycobacterium tuberculosis Phylogenetic Lineage and Clinical Site of Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 54: 211–219.
- [36] Barbier M, Wirth T. The Evolutionary History, Demography, and Spread of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Microbiol Spectr*; 4. Epub ahead of print 12 August 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0008-2016.
- [37] Chiner-Oms Á, López MG, Moreno-Molina M, et al. Gene evolutionary trajectories in Mycobacterium tuberculosis reveal temporal signs of selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 119. Epub ahead of print 26 April 2022. DOI: 10.1073/pnas.2113600119.
- [38] Lazzarini LCO, Huard RC, Boechat NL, et al. Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3891–3902.
- [39] Merker M, Kohl TA, Niemann S, et al. The Evolution of Strain Typing in the Mycobacterium tuberculosis Complex. In: Gagneux S (ed) *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 43–78.
- [40] Joseph SK, Lindo J. The evolutionary history of infectious disease in the ancient Americas and the pathogenic consequences of European contact. *American Journal of Biological Anthropology*. Epub ahead of print 21 July 2022. DOI: 10.1002/ajpa.24595.

- [41] Castillos de Ibrahim das Neves Y, Reis AJ, Xavier Maio N, et al. Genotyping methods and their contributions to the study of tuberculosis dynamic in Latin America. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2023; 17: 1373–1386.
- [42] Wiens KE, Woyczynski LP, Ledesma JR, et al. Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2018; 16: 196.
- [43] Huber FD, Sánchez A, Gomes HM, et al. Insights into the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* using spoligotyping and RDRio in a southeastern Brazilian prison unit. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 26: 194–202.
- [44] De Almeida IN, Vasconcellos SEG, De Assis Figueredo LJ, et al. Frequency of the *Mycobacterium tuberculosis* RDRio genotype and its association with multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis*; 19. Epub ahead of print 25 June 2019. DOI: 10.1186/s12879-019-4152-7.
- [45] Díaz Acosta CC, Russomando G, Candia N, et al. Exploring the ‘Latin American Mediterranean’ family and the RDRio lineage in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Paraguay, Argentina and Venezuela. *BMC Microbiol*; 19. Epub ahead of print 13 June 2019. DOI: 10.1186/s12866-019-1479-6.
- [46] Monteserin J, Paul R, Gravina E, et al. Genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Buenos Aires, Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 2018; 62: 1–7.
- [47] Monteserin J, Camacho M, Barrera L, et al. Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in patients at risk of drug resistance in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution* 2013; 17: 195–201.
- [48] Cerezo I, Jiménez Y, Hernandez J, et al. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infection, Genetics and Evolution* 2012; 12: 657–663.
- [49] Castellanos ME, Lau-Bonilla D, Moller A, et al. Characterization of the Proportion of Clustered Tuberculosis Cases in Guatemala: Insights from a Molecular Epidemiology Study, 2010–2014. *Am J Trop Med Hyg* 2022; 106: 1173–1181.

- [50] Duchêne V, Ferdinand S, Filliol I, et al. Phylogenetic reconstruction of Mycobacterium tuberculosis within four settings of the Caribbean region: tree comparative analyse and first appraisal on their phylogeography. *Infection, Genetics and Evolution* 2004; 4: 5–14.
- [51] Ocheretina O, Merveille YM, Mabou M-M, et al. Use of Luminex MagPlex Magnetic Microspheres for High-Throughput Spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis Isolates in Port-au-Prince, Haiti. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2232–2237.
- [52] Merker M, Blin C, Mona S, et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat Genet* 2015; 47: 242–249.
- [53] Acosta F, Norman A, Sambrano D, et al. Probable long-term prevalence for a predominant Mycobacterium tuberculosis clone of a Beijing genotype in Colon, Panama. *Transbound Emerg Dis* 2021; 68: 2229–2238.
- [54] Cerezo-Cortés M, Rodríguez-Castillo J, Hernández-Pando R, et al. Circulation of M. tuberculosis Beijing genotype in Latin America and the Caribbean. *Pathog Glob Health* 2019; 113: 336–351.
- [55] Garcés E, Cifuentes L, Franco G, et al. Study of the distribution of lineages of Mycobacterium tuberculosis in a prison in Guayaquil, Ecuador. *Enfermedades Emergentes* 2023; 22: 7–14.
- [56] Morey-León G, Andrade-Molina D, Fernández-Cadena JC, et al. Comparative genomics of drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis in Ecuador. *BMC Genomics*; 23. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.1186/s12864-022-09042-1.
- [57] Zurita J, Espinel N, Barba P, et al. Genetic diversity and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in Ecuador. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2019; 23: 166–173.
- [58] Skhairia MA, Dekhil N, Mhenni B, et al. Successful expansion of Mycobacterium tuberculosis Latin American and Mediterranean sublineage (L4.3/LAM) in Tunisia mainly driven by a single, long-established clonal complex. *International Journal of Infectious Diseases* 2021; 103: 220–225.

- [59] Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, et al. Global expansion Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Sci Adv* 2018; 4: 5869–5886.
- [60] Méndez MV, Abadía E, Sequera M, et al. Most LAM Mycobacterium tuberculosis strains in Venezuela, but not SIT605, belong to the RDRio subfamily. *Infection, Genetics and Evolution*; 84. Epub ahead of print 1 October 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104380.
- [61] Chizimu JY, Solo ES, Bwalya P, et al. Genetic Diversity and Transmission of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Lusaka, Zambia. *International Journal of Infectious Diseases* 2022; 114: 142–150.
- [62] Mokrousov I, Jiao WW, Wan K, et al. Stranger in a strange land: Ibero-American strain of Mycobacterium tuberculosis in Tibet, China. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 26: 323–326.
- [63] Mokrousov I, Vyazovaya A, Narvskaya O. Mycobacterium tuberculosis Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary markers. *J Bacteriol* 2014; 196: 1833–1841.
- [64] Bocanegra-García V, Cortez-de-la-Fuente LJ, Nakamura-López Y, et al. RDRio Mycobacterium tuberculosis strains associated with isoniazid resistance in Northern Mexico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2021; 39: 399–402.
- [65] Mokrousov I, Vyazovaya A, Iwamoto T, et al. Latin-American-Mediterranean lineage of Mycobacterium tuberculosis: Human traces across pathogen’s phylogeography. *Mol Phylogenet Evol* 2016; 99: 133–143.
- [66] Puerto G, Erazo L, Wintaco M, et al. Mycobacterium tuberculosis genotypes determined by spoligotyping to be circulating in Colombia between 1999 and 2012 and their possible associations with transmission and susceptibility to first-line drugs. *PLoS One*; 10. Epub ahead of print 11 June 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0124308.
- [67] Taype CA, Agapito JC, Accinelli RA, et al. Genetic diversity, population structure and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in Peru. *Infection, Genetics and Evolution* 2012; 12: 577–585.

- [68] Acosta F, Saldaña R, Miranda S, et al. Heterogeneity of Mycobacterium tuberculosis Strains Circulating in Panama's Western Region. *Am J Trop Med Hyg*. Epub ahead of print 21 August 2023. DOI: 10.4269/ajtmh.23-0039.
- [69] Borrell S, Trauner A. Strain Diversity and the Evolution of Antibiotic Resistance. In: Gagneux S (ed) *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 263–279.
- [70] Luo T, Comas I, Luo D, et al. Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112: 8136–8141.
- [71] Couvin D, Rastogi N. Tuberculosis – A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage. *Tuberculosis* 2015; 95: S177–S189.
- [72] Mora-Pinargote C, Garzon-Chavez D, Franco-Sotomayor G, et al. Country-wide rapid screening for the Mycobacterium tuberculosis Beijing sublineage in Ecuador using a single-nucleotide polymorphism-polymerase chain reaction method. *Int J Mycobacteriol* 2019; 8: 366–370.
- [73] Mabhula A, Singh V. Drug-resistance Mycobacterium tuberculosis: where we stand. *Medchemcomm* 2019; 10: 1342–1360.
- [74] World Health Organization. *Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update*. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [75] Mandimika C, Friedland G. Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus Coinfection. In: Friedman LN, Dedicoat M, Davies PDO (eds) *Clinical Tuberculosis*. Boca Raton: CRC Press, 2020, pp. 267–300.
- [76] Singla R, Gupta S, Sharma A. Treatment of Tuberculosis. In: Sharma SK, Mohan A (eds) *Textbook of Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Diseases*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2020.

- [77] World Health Organization. *WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment*. Geneva, 2019.
- [78] Nimmo C, Millard J, Faulkner V, et al. Evolution of Mycobacterium tuberculosis drug resistance in the genomic era. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*; 12. Epub ahead of print 7 October 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.954074.
- [79] Alame Emame AK, Guo X, Takiff HE, et al. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* 2021; 129: 102091.
- [80] Alame Emame AK, Guo X, Takiff HE, et al. Highly transmitted M. tuberculosis strains are more likely to evolve MDR/XDR and cause outbreaks, but what makes them highly transmitted? *Tuberculosis* 2021; 129: 102092.
- [81] Ektefaie Y, Dixit A, Freschi L, et al. Globally diverse Mycobacterium tuberculosis resistance acquisition: a retrospective geographical and temporal analysis of whole genome sequences. *Lancet Microbe* 2021; 2: e96–e104.
- [82] Vashistha H, Chopra KK. TB Diagnostics: Journey from Smear Microscopy to Whole Genome Sequencing. In: *Mycobacterium Tuberculosis: Molecular Infection Biology, Pathogenesis, Diagnostics and New Interventions*. Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 419–450.
- [83] World Health Organization. *Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis*. Geneva, 2018.
- [84] Chin KL, Sarmiento ME, Norazmi MN, et al. DNA markers for tuberculosis diagnosis. *Tuberculosis* 2018; 113: 139–152.
- [85] Katoch V, Mohan Kumar T, Babban J. Nontuberculous Mycobacterial Infections. In: Sharma SK, Mohan A (eds) *Textbook of Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Diseases*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2020.
- [86] Sharma S, Upadhyay V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. *Indian Journal of Medical Research* 2020; 152: 185.

- [87] Baldwin SL, Larsen SE, Ordway D, et al. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13: e0007083.
- [88] Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *European Respiratory Journal* 2020; 56: 2000535.
- [89] Kalaiarasan E, Thangavelu K, Krishnapriya K, et al. Diagnostic performance of real time PCR and MALDI-TOF in the detection of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *Tuberculosis* 2020; 125: 101988.
- [90] Neuschlova M, Vladarova M, Kompanikova J, et al. Identification of Mycobacterium Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry. 2017, pp. 37–42.
- [91] Alcolea-Medina A, Fernandez MTC, Montiel N, et al. An improved simple method for the identification of Mycobacteria by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption- Ionization mass spectrometry). *Sci Rep* 2019; 9: 20216.
- [92] Mediavilla-Gradolph MC, De Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, et al. Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 1–6.
- [93] Cho SY, Kim MJ, Suh J-T, et al. Comparison of Diagnostic Performance of Three Real-Time PCR Kits for Detecting Mycobacterium Species. *Yonsei Med J* 2011; 52: 301.
- [94] Sawatpanich A, Petsong S, Tumwasorn S, et al. Diagnostic performance of the Anyplex MTB/NTM real-time PCR in detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria from pulmonary and extrapulmonary specimens. *Heliyon* 2022; 8: e11935.
- [95] Lee S, Hwang K-A, Ahn J-H, et al. Evaluation of EZplex MTBC/NTM Real-Time PCR kit: diagnostic accuracy and efficacy in vaccination. *Clin Exp Vaccine Res* 2018; 7: 111.
- [96] CerTest Biotec SL. VIASURE Real Time PCR Detection Kit - M. tuberculosis Complex + non-tuberculous mycobacteria.

- [97] Sansure Biotech. Mycobacterium Multiplex Nucleic Acid Diagnostic Kit (Multiplex PCR – Fluorescence Probing).
- [98] Coll F, Phelan J, Hill-Cawthorne GA, et al. Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Nat Genet* 2018; 50: 307–316.
- [99] World Health Organization. *Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis Complex and their association with drug resistance*. Geneva, 2023.
- [100] Sachdeva KS, Raizada N, Sreenivas A, et al. Use of Xpert MTB/RIF in Decentralized Public Health Settings and Its Effect on Pulmonary TB and DR-TB Case Finding in India. *PLoS One* 2015; 10: e0126065.
- [101] Talarico S, Anderson LF, Silk BJ. Using Genotyping and Molecular Surveillance to Investigate Tuberculosis Transmission. In: Friedman LN, Dedicoat M, Davies PDO (eds) *Clinical Tuberculosis*. Boca Raton: CRC Press, 2020, pp. 79–95.
- [102] Coll P, García de Viedma D. Epidemiología molecular de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018; 36: 233–240.
- [103] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907–914.
- [104] Demay C, Liens B, Burguière T, et al. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 2012; 12: 755–766.
- [105] Couvin D, David A, Zozio T, et al. Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the Mycobacterium tuberculosis genotyping database. *Infection, Genetics and Evolution* 2019; 72: 31–43.
- [106] Supply P. *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of Mycobacterium tuberculosis Technical Guide*, <https://www.researchgate.net/publication/265990159> (2014).

- [107] Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, et al. Evaluation and Strategy for Use of MIRU-VNTRplus, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping Data and Phylogenetic Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2692–2699.
- [108] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537–544.
- [109] Katale BZ, Mbebele PM, Lema NA, et al. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis isolates and clinical outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis in Tanzania. *BMC Genomics* 2020; 21: 174.
- [110] Iketleng T, Lessells R, Dlamini MT, et al. Mycobacterium tuberculosis Next-Generation Whole Genome Sequencing: Opportunities and Challenges. *Tuberc Res Treat* 2018; 2018: 1–8.
- [111] Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med* 2015; 7: 51.
- [112] Schleusener V, Köser CU, Beckert P, et al. Mycobacterium tuberculosis resistance prediction and lineage classification from genome sequencing: comparison of automated analysis tools. *Sci Rep* 2017; 7: 46327.
- [113] Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, et al. PhyResSE: a Web Tool Delineating Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 1908–1914.
- [114] Yang T, Gan M, Liu Q, et al. SAM-TB: a whole genome sequencing data analysis website for detection of Mycobacterium tuberculosis drug resistance and transmission. *Brief Bioinform* 2022; 23: 1–11.
- [115] Morey-León G, Mejía-Ponce P, Granda-Pardo JC, et al. A precision overview of genomic resistance screening in isolates of Mycobacterium tuberculosis using web-based bioinformatics tools. *bioRxiv*. Epub ahead of print 2023. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.01.10.523521>.

- [116] Jiménez P, Calvopiña K, Herrera D, et al. Identification of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage in Ecuador. *Biomedica* 2017; 37: 233–237.
- [117] Wang Y, Zhang M, Zhang J, et al. Epidemiology of Tuberculosis in Migrating Population. In: *Tuberculosis Control in Migrating Population*. Singapore: Springer Singapore, 2020, pp. 11–38.
- [118] Abascal E, Pérez-Lago L, Martínez-Lirola M, et al. Whole genome sequencing-based analysis of tuberculosis (TB) in migrants: Rapid tools for crossborder surveillance and to distinguish between recent transmission in the host country and new importations. *Eurosurveillance*; 24. Epub ahead of print 24 January 2019. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.4.1800005.
- [119] Tatara MB, Perdigão J, Viveiros M, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of mycobacterium tuberculosis in Roraima State, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2019; 101: 774–779.
- [120] de Almeida AL, Scodro RB de L, de Carvalho HC, et al. RD Rio Mycobacterium tuberculosis lineage in the Brazil/Paraguay/Argentina triple border. *Tuberculosis* 2018; 110: 68–78.
- [121] Cáceres O, Rastogi N, Bartra C, et al. Characterization of the Genetic Diversity of Extensively-Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Peru. *PLoS One* 2014; 9: e112789.
- [122] Santos-Lazaro D, Gavilan RG, Solari L, et al. Whole genome analysis of extensively drug resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Peru. *Sci Rep*; 11. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-88603-y.
- [123] Singh P, Samal J, Zarin S, et al. Breaking the Transmission of TB: A Roadmap to Bridge the Gaps in Controlling TB in Endemic Settings. In: *Mycobacterium Tuberculosis: Molecular Infection Biology, Pathogenesis, Diagnostics and New Interventions*. Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 451–461.
- [124] Zellweger JP, Sotgiu G, Corradi M, et al. The diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI): currently available tests, future developments, and perspectives to eliminate tuberculosis (TB). *Med Lav* 2020; 111: 170–183.

- [125] Nardell EA. Tuberculosis Transmission Control. In: Friedman LN, Dedicat M, Davies PDO (eds) *Clinical Tuberculosis*. Boca Raton: CRC Press, 2020, pp. 97–111.
- [126] Dheda K, Theron G, Calligaro G, et al. Drug-resistant Tuberculosis. In: Sharma SK, Mohan A (eds) *Textbook of Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Diseases*. New Dehli: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2020.
- [127] Gibson AL, Huard RC, Gey Van Pittius NC, et al. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio sublineage of the Latin American-Mediterranean Mycobacterium tuberculosis spoligotype family. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1259–1267.
- [128] Reynaud Y, Millet J, Rastogi N. Genetic structuration, demography and evolutionary history of mycobacterium tuberculosis LAM9 sublineage in the Americas as two distinct subpopulations revealed by Bayesian analyses. *PLoS One*; 10. Epub ahead of print 30 October 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0140911.
- [129] Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, et al. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in Mycobacterium tuberculosis clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol*; 9. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1186/1471-2180-9-39.
- [130] Moraes EB, Slompo L, Finardi AJ, et al. Tuberculosis associated factors caused by Mycobacterium tuberculosis of the RDRio genotype. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; 112: 182–187.
- [131] Lazzarini LCO, Huard RC, Boechat NL, et al. Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3891–3902.
- [132] Torres JR, Castro JS. Venezuela’s migration crisis: a growing health threat to the region requiring immediate attention. *J Travel Med*; 26. Epub ahead of print 1 February 2019. DOI: 10.1093/jtm/tay141.

- [133] de Almeida Soares D, Placeres A, Arcêncio RA, et al. Evidence on tuberculosis in migrants at Brazil's international borders: A scoping review. *J Migr Health* 2023; 7: 100167.
- [134] Kremer K, Au BKY, Yip PCW, et al. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 314–320.
- [135] Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607–2618.
- [136] Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498–4510.
- [137] Supply P, Lesjean S, Savine E, et al. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3563–3571.
- [138] Moreno-Izquierdo C, Zurita J, Contreras-Yametti FI, et al. *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* infection associated with cosmetic surgical procedures: Case series. *IDCases* 2020; 22: e00992.
- [139] Echeverria G, Rueda V, Espinoza W, et al. First Case Reports of Nontuberculous Mycobacterial (NTM) Lung Disease in Ecuador: Important Lessons to Learn. *Pathogens* 2023; 12: 507.
- [140] Castellano Realpe OJ, Gutiérrez JC, Sierra DA, et al. Dental Unit Waterlines in Quito and Caracas Contaminated with Nontuberculous Mycobacteria: A Potential Health Risk in Dental Practice. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17: 2348.
- [141] Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis* 2014; 6: 210–20.

- [142] Corbett C, Finger P, Heiß-Neumann M, et al. Development of prevalence and incidence of non-tuberculous mycobacteria in German laboratories from 2016 to 2020. *Emerg Microbes Infect*; 12. Epub ahead of print 8 December 2023. DOI: 10.1080/22221751.2023.2276342.
- [143] Sharma P, Singh D, Sharma K, et al. Are We Neglecting Nontuberculous Mycobacteria Just as Laboratory Contaminants? Time to Reevaluate Things. *J Pathog* 2018; 2018: 1–5.
- [144] Zulu M, Monde N, Nkhoma P, et al. Nontuberculous Mycobacteria in Humans, Animals, and Water in Zambia: A Systematic Review. *Frontiers in Tropical Diseases*; 2. Epub ahead of print 16 July 2021. DOI: 10.3389/fitd.2021.679501.
- [145] Brankin A, Seifert M, Georghiou SB, et al. In silico evaluation of WHO-endorsed molecular methods to detect drug resistant tuberculosis. *Sci Rep* 2022; 12: 17741.
- [146] Bigio J, van Gemert W, Kaiser B, et al. Asia emerges as a hotbed of diagnostic innovations for tuberculosis. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 2021; 25: 100267.
- [147] Dicks K V, Stout JE. Annual Review of Medicine Molecular Diagnostics for Mycobacterium tuberculosis Infection. *Annu Rev Med* 2019 2018; 70: 77–90.
- [148] Choe W, Kim E, Park SY, et al. Performance Evaluation of Anyplex plus MTB/NTM and AdvanSure TB/NTM for the Detection of Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria. *Annals of Clinical Microbiology* 2015; 18: 44.
- [149] Perry MD, White PL, Ruddy M. Potential for Use of the Seegene Anyplex MTB/NTM Real-Time Detection Assay in a Regional Reference Laboratory. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1708–1710.
- [150] Lee JH, Kim BH, Lee M-K. Performance Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM and MDR-TB Detection Kit for Detection of Mycobacteria and for Anti-Tuberculosis Drug Susceptibility Test. *Annals of Clinical Microbiology* 2014; 17: 115.
- [151] Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. *Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica - Parte 2: Cultivo*, <https://iris.paho.org/handle/10665.2/18616> (2008).

- [152] Mpanyane D, Maguga-Phasha TibelloNC, Mashinya F, et al. The diagnostic utility of Anyplex plus™ MTB/NTM cycle threshold for detection of Mycobacterium tuberculosis complex among new and retreatment cases from a referral hospital in Limpopo Province, South Africa. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)* 2017; 1: 141.
- [153] Sali M, De Maio F, Caccuri F, et al. Multicenter Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM MDR-TB Assay for Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Multidrug-Resistant Isolates in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 59–63.