

ARTÍCULO ORIGINAL

ESTRUCTURA GENÉTICA DE CEPAS DROGORRESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* EN PERÚ BASADA EN HAPLOTIPOS OBTENIDOS DE UN ENSAYO CON SONDAS EN LÍNEA

David Santos-Lazaro^{1,a}, Zully M. Puyen^{1,2,b}, Ronnie G. Gavilán^{1,c}¹Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.²Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima, Perú.^a Bachiller en Genética y Biotecnología; ^b doctora en Microbiología; ^c doctor en Biología Molecular.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la estructura genética de las cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* que circularon en todo el Perú durante los años 2011-2015 a través de haplotipos obtenidos de un ensayo con sondas en línea. **Materiales y métodos.** Se analizaron 6589 muestras que ingresaron al Instituto Nacional de Salud para el diagnóstico rutinario mediante el ensayo GenoType® MTBDRplus v2, durante el periodo de estudio. Se crearon haplotipos resistentes mediante la concatenación de 21 sitios polimórficos de los genes evaluados por el ensayo con sondas en línea, y se realizó el análisis de asociación con fenotipos obtenidos por el método de proporciones agar 7H10. **Resultados.** Las mutaciones de mayores frecuencias fueron: *rpoB* S531L (55,4%) y *rpoB* D516V (18,5%) para la resistencia a rifampicina, y *katG* S315T (59,5%) e *inhA* c-15t (25,7%) para la resistencia a isoniazida. Se obtuvieron 13 haplotipos representativos (87,8% de muestras analizadas) de los cuales seis correspondieron al genotipo multidrogorresistente, cuatro al genotipo monorresistente a isoniazida y tres al genotipo monorresistente a rifampicina. Dieciocho departamentos, y la provincia del Callao, presentaron una alta diversidad haplotípica; cuatro presentaron moderada diversidad y dos presentaron baja diversidad. **Conclusiones.** Existe una alta diversidad haplotípica en la mayoría de los departamentos, además de una concentración de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes en las ciudades de Lima y Callao. Asimismo, las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con perfil drogorresistente que circulan en el Perú contienen principalmente los marcadores genéticos de mayor prevalencia a nivel mundial asociados con la resistencia frente a rifampicina e isoniazida.

Palabras clave: Tuberculosis; Farmacorresistencia Bacteriana; Técnicas de Diagnóstico Molecular; Epidemiología Molecular; Variación Genética; ADN Bacteriano; Genotipo; Haplotipos; Mutación Puntual; Perú (fuente: DeCS BIREME).

GENETIC STRUCTURE OF DRUG-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS IN PERU BASED ON HAPLOTYPES OBTAINED FROM A LINE PROBE ASSAY

ABSTRACT

Objective. To determine the genetic structure of drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* that circulated throughout Peru during the years 2011-2015, by using haplotypes obtained from a line probe assay. **Materials and methods.** A total of 6589 samples that were admitted to the Instituto Nacional de Salud for routine diagnosis using the GenoType® MTBDRplus v2 assay were analyzed during the study period. Resistant haplotypes were created by concatenating 21 polymorphic sites of the evaluated genes using the line probe assay; and the association analysis was carried out with phenotypes obtained by the 7H10 agar ratio method. **Results.** The most frequent mutations were: *rpoB* S531L (55.4%) and *rpoB* D516V (18.5%) for rifampicin resistance, and *katG* S315T (59.5%) and *inhA* c-15t (25.7%) for isoniazid resistance. We obtained 13 representative haplotypes (87.8% of analyzed samples), 6 corresponded to the multidrug-resistant genotype, 4 to the isoniazid mono-resistant genotype and 3 to the rifampicin mono-resistant genotype. Eighteen regions and the province of Callao showed high haplotype diversity; four showed moderate diversity and two showed low diversity. **Conclusions.** Most regions showed high haplotype diversity; in addition, most drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* were concentrated in the cities of Lima and Callao. Likewise, drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Peru mainly contain the genetic markers with the highest prevalence worldwide, which are associated with resistance to rifampicin and isoniazid.

Citar como: Santos-Lazaro D, Puyen ZM, Gavilán RG. Estructura genética de cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en Perú basada en haplotipos obtenidos de un ensayo con sondas en línea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2021;38(4):577-86. doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.384.7834>.

Correspondencia: David Santos-Lázaro; edavid.sant@gmail.com

Recibido: 08/04/2021
Aprobado: 12/11/2021
En Línea: 20/12/2021

Keywords: Tuberculosis; Drug Resistance, Bacterial; Molecular Diagnostic Techniques; Molecular Epidemiology; Genetic Variation; DNA, Bacterial; Genotype; Haplotypes; Point Mutation; Peru (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y es considerada una de las enfermedades infecciosas prevenibles y curables causante de importantes tasas de morbilidad y mortalidad en diferentes países de América y el mundo. En el 2019 se diagnosticaron diez millones de casos de pacientes con TB, y hubo 1,4 millones de muertes a nivel mundial⁽¹⁾. Esta enfermedad toma aun mayor relevancia cuando el bacilo de MTB presenta resistencia a los principales fármacos utilizados en su tratamiento. Así, la TB multidrogorresistente (TB-MDR, aquella TB con resistencia a isoniacida [H] y rifampicina [R]), y la TB extensamente drogorresistente (TB-XDR, aquella TB-MDR con resistencia adicional a alguna fluoroquinolona y a algún fármaco inyectable de segunda línea)⁽¹⁾ son formas complejas de manejar que requieren un tratamiento muy costoso, prolongado y que, a su vez, producen una mayor morbilidad, toxicidad, recaídas y pobres resultados clínicos⁽²⁾.

En el Perú la TB es considerada uno de los principales problemas de salud pública que aqueja a la población. Esta enfermedad, en conjunto con sus formas resistentes, se encuentra distribuida en los 24 departamentos del Perú; sin embargo, el departamento de Lima (capital del Perú) y la provincia constitucional del Callao albergan alrededor del 61% de los casos de TB y el 78% de los casos de TB-MDR⁽³⁾. La detección temprana de la TB drogorresistente es una de las piezas claves para el control de esta enfermedad, es por esto que; siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a partir del 2011 en el Perú se implementó el uso del ensayo con sondas en línea (ESL) GenoType® MTBDR \textit{plus} v2 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) para la detección de la TB, TB monorresistente a H (TB-rH), TB monorresistente a R (TB-rR) y TB-MDR⁽⁴⁾.

Específicamente, este ESL detecta la resistencia a rifampicina e isoniacida mediante la visualización de patrones de hibridación reversa. Asimismo, determina directa o indirectamente las mutaciones de ADN localizadas en regiones específicas de los genes *rpoB* (resistencia a rifampicina) y *katG* e *inhA* (resistencia a isoniacida), lo cual brinda un valor agregado al ensayo molecular, ya que dicha información permite el estudio espaciotemporal de las principales mutaciones presentes en las cepas drogorresistentes de MTB que circulan en el país.

En este mismo sentido, una ventaja que resaltar del genoma de MTB es su naturaleza conservadora, la cual permite el análisis de todas las mutaciones acumuladas a través de los años⁽⁵⁾. Debido a esto, diferentes estrategias han sido implementadas para la evaluación de la diversidad genética en MTB, tales como el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción del gen IS6110 (IS6110-RFLP), la tipificación de oligonucleótidos espaciadores (*spoligotyping*) y el número variable de repeticiones en tándem de las unidades repetitivas

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio: la tuberculosis drogorresistente continúa afectando los esfuerzos por erradicar la tuberculosis en el Perú. Ante esto, es necesaria la caracterización de los marcadores genéticos asociados con la drogorresistencia en las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que circulan a nivel nacional.

Principales hallazgos: las cepas peruanas contienen los marcadores genéticos de mayor prevalencia a nivel mundial asociados con la resistencia a rifampicina e isoniacida. Asimismo, existe una concentración de las cepas drogorresistentes en las ciudades de Lima y Callao.

Implicancias: en el Perú se debe trabajar con pruebas diagnósticas moleculares que, al menos, evalúen los principales genes asociados con resistencia frente a isoniacida y rifampicina.

intercaladas de micobacterias (MIRU-VNTR)⁽⁶⁾, obteniendo la variabilidad genética de MTB en base al grado de polimorfismo de determinados genes diana. Por otro lado, el estudio de la diversidad genética bacteriana ha sido abordado también mediante la creación de haplotipos genéticos^(7,8). Además, la adecuada selección de los principales genes de resistencia ha permitido determinar y extrapolar la estructura genética de la resistencia en una determinada comunidad bacteriana^(9,10). Es así que estudios realizados en Perú han caracterizado las frecuencias de mutaciones que causan la resistencia farmacológica a isoniacida y rifampicina; sin embargo, se llegaron a obtener resultados no concordantes entre ellos, posiblemente debido a que trabajaron con distintos grupos poblacionales y únicamente usando cepas de MTB circulando en la capital del país^(11,12).

El presente estudio plantea la creación de haplotipos de genes resistentes basados en la información genética obtenida por el ESL GenoType® MTBDR \textit{plus} v2, el cual caracteriza los principales genes asociados a la resistencia, con la finalidad de evaluar la estructura genética subyacente a los principales marcadores asociados a la resistencia de rifampicina e isoniacida. Esta aproximación genética también busca determinar la distribución geográfica de los principales haplotipos, y marcadores de resistencia, asociados a la resistencia de rifampicina e isoniacida presentes en la población peruana de MTB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

El presente estudio fue de tipo descriptivo transversal en el cual se analizaron 6589 resultados válidos de muestras de esputo o cultivos de MTB que ingresaron al Laboratorio de Referencia

Nacional de Micobacterias (LRNM) del Instituto Nacional de Salud (INS) para la evaluación de rutina mediante el ESL GenoType® MTBDRplus v2. Todas las muestras que ingresaron en el presente estudio presentaron diagnósticos genotípicos con perfil de drogoresistencia, y provinieron de aislamientos realizados en los 24 departamentos del Perú y la provincia constitucional del Callao, entre los años 2011-2015. Se recabó la información de resultados de sensibilidad fenotípica para drogas de primera y segunda línea, obtenidas mediante el método de proporciones en agar 7H10 (MP 7H10) según las concentraciones críticas establecidas por la OMS⁽¹³⁾.

Análisis descriptivo de las mutaciones

Se realizó el análisis descriptivo de las mutaciones asociadas con la detección directa (ausencia de hibridación de sonda *wild type* y presencia de hibridación de sondas *mut*) y la detección inferida (ausencia de hibridación de sonda *wild type* y ausencia de hibridación de sondas *mut*) de la resistencia genotípica, a través de los cinco años de estudio y de los distintos lugares de procedencia, usando el programa estadístico R v3.6.3. El comportamiento de las frecuencias de las mutaciones a lo largo de los años fue evaluado estadísticamente mediante la prueba exacta de Bondad de ajuste usando el paquete XNomial v1.0.4 del programa R v3.6.3.

Obtención y clasificación de haplotipos

La estructura y diversidad genética de los marcadores de resistencia a nivel nacional fue evaluada mediante la creación de haplotipos resistentes. Los haplotipos fueron creados mediante la concatenación manual de los patrones de hibridación de 21 sondas de ADN (11 *wild type* y 10 *mut*), presentes en el ESL GenoType® MTBDRplus v2, usando el programa GeneAEx v6.5. Los haplotipos fueron clasificados en cuatro grupos en función de sus frecuencias (n): haplotipos comunes ($n > 5\%$), haplotipos menos comunes ($5\% \geq n > 1\%$), haplotipos raros ($1\% \geq n; n \neq 1$) y haplotipos huérfanos ($n=1$)⁽¹⁴⁾.

Evaluación de la diversidad haplotípica

La similaridad de los haplotipos fue evaluada mediante la realización de un agrupamiento jerárquico a través del método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) para los haplotipos más representativos, usando el programa R v3.6.3. La diversidad local de los haplotipos fue evaluada usando el programa Past v3.25 y se determinaron los índices de riqueza haplotípica (S), diversidad de Simpson (1-D) y la equitatividad de Shannon-Weiner (H'). Estos índices fueron determinados con intervalos de confianza al 95% (9999 *bootstraps*). Finalmente, se establecieron de manera arbitraria puntos de corte para la determinación de baja ($1-D < 0,25$), moderada ($0,25 \leq 1-D < 0,75$) y alta ($1-D \geq 0,75$) diversidad.

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis descriptivos de la edad, año de obtención de resultados y frecuencia de los haplotipos. La normalidad

de las frecuencias haplotípicas fue evaluada usando la prueba de Shapiro-Wilks. Se ejecutaron pruebas de asociación estadística entre cada uno de los haplotipos y los resultados de susceptibilidad fenotípica obtenidos por el MP 7H10. Para esto, se utilizó el protocolo estandarizado para la evaluación de mutaciones asociadas a la resistencia adoptadas por la OMS⁽¹⁵⁾. Las asociaciones entre los haplotipos y las variables de interés fueron evaluadas mediante el valor de p de la prueba exacta de Fisher, estableciendo un nivel de significancia del 5%. El control de la tasa de falsos positivos (FDR, del inglés *False Discovery Rate*) para comparaciones múltiples fue realizado usando el método de Benjamini-Hochberg. La fuerza de asociación fue determinada usando los valores de la tasa de momios (OR, del inglés *Odds ratio*). Las asociaciones significantes fueron clasificadas según su «confianza de asociación» en alta ($OR > 10$), moderada ($5 < OR \leq 10$) o mínima ($1 < OR \leq 5$)⁽¹⁵⁾. Todos los cálculos estadísticos fueron realizados en el programa R v3.6.3.

Aspectos éticos

El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación del INS (código: OT-025-19). Además, contó con el conocimiento y permiso del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del INS para el uso y análisis de la información de resultados emitidos en el periodo 2011-2015. No se utilizaron identificadores personales de los pacientes y los resultados obtenidos en este documento fueron tratados de forma anónima por los investigadores mediante el uso de un sistema de doble codificación. El estudio está inscrito en el Registro Nacional de Investigaciones en Salud (PRISA) con código: EI00002157.

RESULTADOS

Características de la población

Los distritos de Lima y Callao abarcaron un total de 4582 (69,5%) muestras, mientras que el número de muestras varió desde 1 hasta 269 ($x=87$) para los departamentos restantes (Figura 1). La mayor parte de muestras provino de aislamientos obtenidos en hombres (69,6%). Asimismo, 3262 (49,5%) y 1767 (26,8%) muestras pertenecieron a pacientes nunca y previamente tratados contra la TB, respectivamente. El rango de edad con la mayor proporción (45,5%) de muestras fue el de 16 a 30 años, y se obtuvo una media de 34 años ($\sigma = 15,3$). Las muestras procedentes de los años 2013-2015 comprendieron el 82,8% de casos, mientras que el 13,9 y 3,3% restantes, procedieron de los años 2012 y 2011, respectivamente (Tabla 1).

Respecto a la resistencia genotípica, 5920 (89,8%) fueron resistentes a isoniácida, 4371 (66,3%) a rifampicina y 3702 (56,2%) a ambas drogas. Se determinó que 6,3 de cada 10 casos con resistencia a isoniácida y 8,5 de cada 10 casos con resistencia a rifampicina fueron casos de TB-MDR. Además, en el periodo 2011-2015 el LRNM obtuvo también 30 375

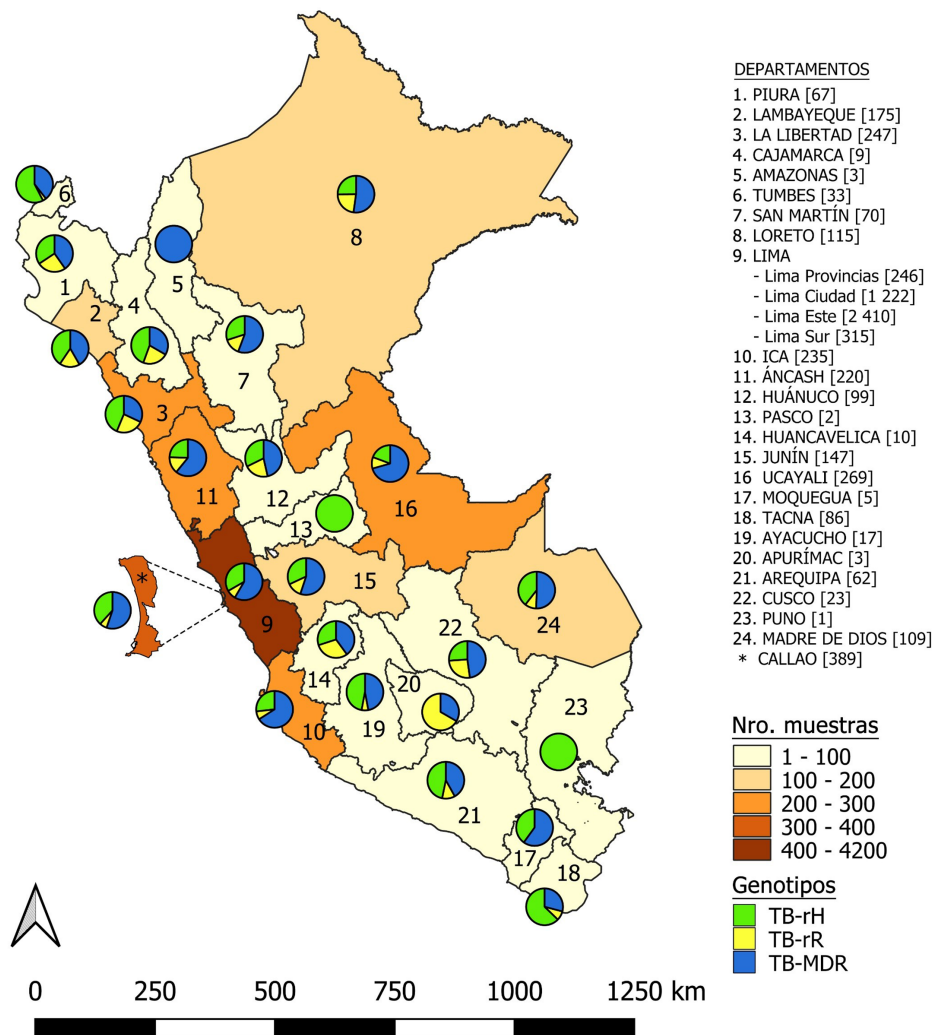


Figura 1. Distribución nacional de las muestras drogorresistentes de esputo o cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas por el ensayo de sondas en línea (ESL), Perú, 2011-2015. El mapa incluye 6589 muestras analizadas en el presente estudio. El número de muestras procedentes de cada departamento del Perú es especificado entre corchetes. Los diagramas de tortas detallan los genotipos obtenidos por el ESL para cada lugar de procedencia. Imagen obtenida usando el programa QGIS v3.14.15.

resultados genotípicamente sensibles a ambas drogas, por lo que se estableció que las proporciones para la TB-MDR, TB-rH y TB-rR fueron 10%, 6% y 1,8%, respectivamente.

Respecto a la resistencia fenotípica, 4773 (72,4%) tuvieron resultados válidos de susceptibilidad fenotípica mediante el MP 7H10. El fenotipo dominante fue la TB-MDR (41,6%) seguido de la TB-rH (24,3%) y, por último, la TB-rR (3,1%). Se evidenciaron 226 muestras con fenotipo sensible para ambas drogas, los cuales representarían resultados discordantes entre el MP 7H10 y el ESL. Estas muestras discordantes comprenderían el 0,6% del total de muestras de TB (genotipos resistentes y sensibles) evaluadas mediante el ensayo molecular a nivel nacional en el periodo 2011-2015.

Mutaciones asociadas con resistencia

La resistencia a la rifampicina estuvo principalmente determinada por las mutaciones *rpoB* S531L y *rpoB* D516V. Con frecuencias

menores se evidenciaron mutaciones detectadas indirectamente (resistencia inferida) que afectaron a los codones 530-533 (ausencia WT8), 526-529 (ausencia WT7), 514-515 (ausencia WT3), 516 (ausencia simultánea del WT3 y WT4) y 510-512 (ausencia WT2). En menor proporción, se encontraron las dos restantes mutaciones detectadas directamente *rpoB* H526D y *rpoB* H526Y. La resistencia a isoniacida estuvo principalmente determinada por las mutaciones *katG* S315T1 e *inhA* c-15t. Más del 90% de muestras resistentes a isoniacida presentaron una o ambas mutaciones. A nivel de genes, 3 574 muestras presentaron únicamente mutaciones en el gen *katG*, seguido de 2061 muestras con mutaciones únicamente en la región promotora del gen *inhA*, y 285 con mutaciones simultáneas en ambos genes (Tabla 2). Las mutaciones detectadas directamente en los tres genes analizados no presentaron variaciones en sus frecuencias a través de los 5 años. De este modo, las mutaciones de mayor frecuencia a través de los años fueron *rpoB* S531L, *katG* S315T1 e *inhA* c-15t.

Tabla 1. Características de los pacientes con TB drogorresistente sometidos al ensayo de sondas en línea, Perú, 2011-2015.

Características	n (%)
Sexo	
Masculino	4589 (69,6)
Femenino	2000 (30,4)
Tipo de muestra	
Espuito	3924 (59,6)
Cultivo	2665 (40,4)
Antecedente de tratamiento	
Antes tratado	1767 (26,8)
Nunca tratado	3262 (49,5)
Sin datos	1560 (23,7)
Edad	
≤15 años	190 (2,9)
16-30 años	2995 (45,5)
31-45 años	1492 (22,6)
>45 años	1268 (19,2)
Sin datos	644 (9,8)
Media [DE]	34 [15,3]
Fenotipo (MP 7H10)	
TB-Sensible	226 (3,4)
TB-rR	204 (3,1)
TB-rH	1604 (24,3)
TB-MDR	2739 (41,6)
Sin datos	1816 (27,6)
Año de emisión de resultado	
2015	2006 (30,4)
2014	1834 (27,8)
2013	1619 (24,6)
2012	915 (13,9)
2011	215 (3,3)

DE: desviación estándar; MP 7H10: método de proporciones en agar 7H10; TB-rH: tuberculosis monorresistente a isoniácida; TB-rR: tuberculosis monorresistente a rifampicina; TB-MDR: tuberculosis multidrogorresistente.

Obtención y análisis descriptivo de haplotipos

Se obtuvieron 134 haplotipos resistentes cuyas frecuencias no presentaron una distribución normal ($p < 0,05$). Se obtuvo una media de 49,2 muestras por cada haplotipo con un rango de 1 a 1396 muestras. El 75% de haplotipos evidenció una frecuencia menor a diez muestras (haplotipos raros o huérfanos). Se identificaron seis haplotipos comunes (Hap 41, 109, 115, 123, 126 y 134) y siete haplotipos menos comunes (Hap 34, 51, 83, 101, 102, 116 y 125), que en conjunto comprendieron 5788 (87,8%) muestras, dando lugar a los trece haplotipos más representativos. Estos haplotipos estuvieron conformados por seis genotipos TB-MDR, cuatro genotipos TB-rH y tres

Tabla 2. Frecuencias de las mutaciones asociadas con la resistencia a rifampicina e isoniácida obtenidas mediante el ensayo de sondas en línea, Perú, 2011-2015.

Mutaciones ^a	n (%)
gen <i>rpoB</i> ^b	
S531L [S450L]	2422 (55,4)
D516V [D435V]	809 (18,5)
ΔWT8	295 (6,8)
ΔWT7	190 (4,4)
ΔWT3	146 (3,3)
ΔWT3,4	125 (2,9)
ΔWT2	88 (2)
H526D [H445D]	82 (1,9)
H526Y [H445Y]	80 (1,8)
Otros	134 (3)
Total	4371 (100,0)
gen <i>katG</i> ^c	
S315T1	3525 (59,5)
ΔWT	32 (0,5)
S315T2	17 (0,3)
-	c-15t
-	ΔWT1
-	t-8c
S315T1	c-15t
S315T1	t-8c
S315T1	ΔWT1
Otros	67 (1,1)
Total	5920 (100,0)
gen <i>inhA</i>	

^a ΔWT: ausencia de hibridación de sonda *wild type*, sin presencia de sonda *mut*.

^b En corchetes se reporta la nomenclatura del codón afectado según el genoma referencial H37Rv (NC_000962.3).

^c S315T1 (AGC -> ACC), S315T2 (AGC -> ACA).

genotipos TB-rR. Asimismo, se obtuvieron 62 haplotipos raros y 59 haplotipos huérfanos (Figura 2).

Distribución geográfica de haplotipos

Todos los departamentos evidenciaron la presencia de al menos uno de los haplotipos más representativos. Ningún haplotipo estuvo restringido a un solo departamento. La mayoría de los departamentos presentaron al menos tres de los haplotipos más representativos, con excepción de Pasco y Puno, donde únicamente se evidenciaron los haplotipos monorresistentes Hap-134 (*katG* S315T) y Hap-126 (*inhA* c-15t), respectivamente.

Los haplotipos con genotipos TB-MDR y TB-rH presentaron una mayor distribución nacional a diferencia de los haplotipos TB-rR. Asimismo, se observó que los haplotipos comunes mostraron una mayor distribución nacional a comparación de los menos comunes. La mayoría de los haplotipos representativos

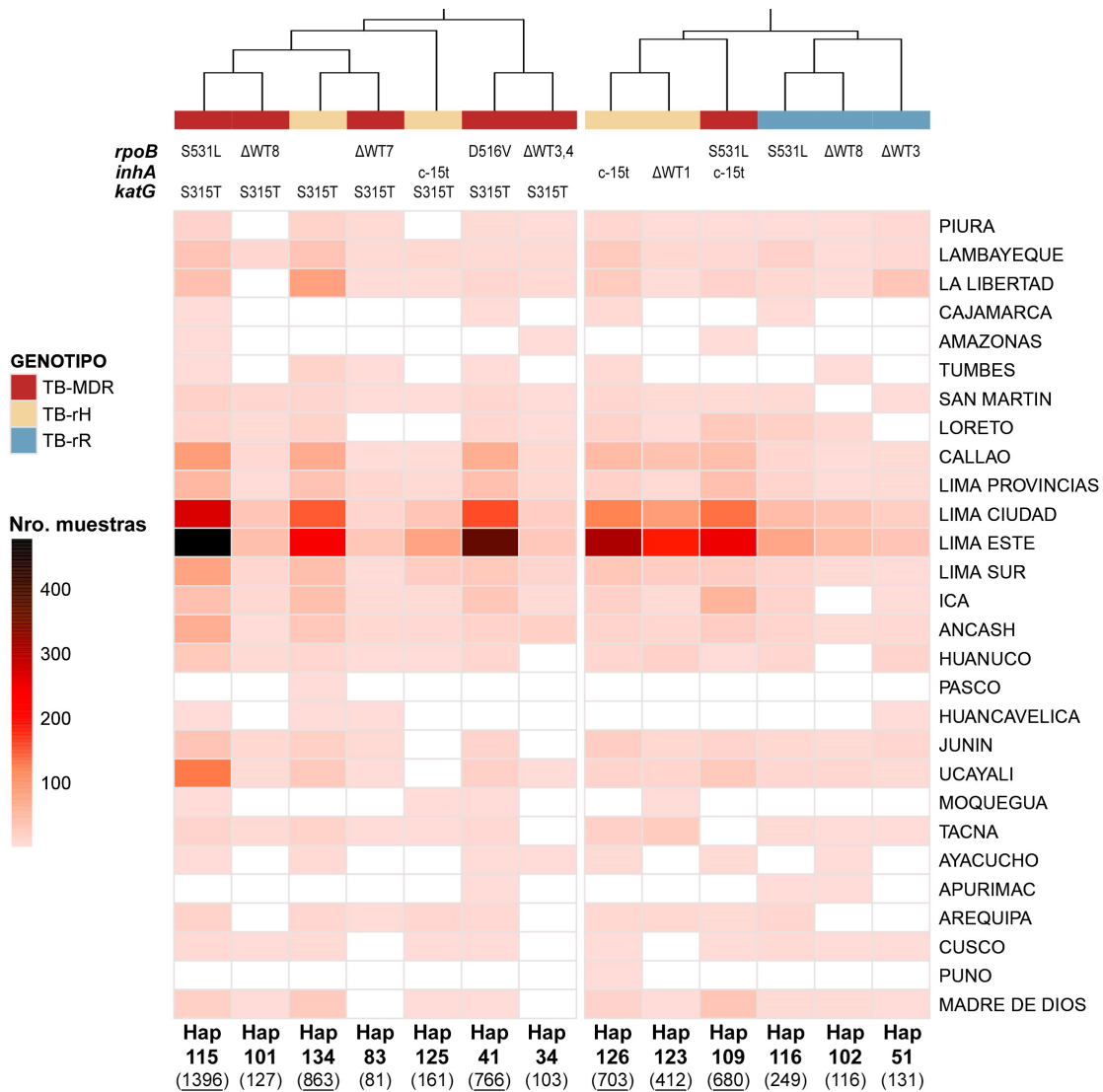


Figura 2. Mapa de calor de la distribución nacional de haplotipos más representativos obtenidos mediante el ensayo de sondas en línea, Perú, 2011-2015. El dendrograma señala la similitud genética de los haplotipos obtenido por el método UPGMA. Se detallan las mutaciones de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* que conforman los trece haplotipos más representativos (seis comunes y siete menos comunes). Las frecuencias absolutas de los haplotipos son especificadas entre paréntesis (se subrayan las frecuencias correspondientes a los haplotipos comunes). Las posiciones en blanco denotan la ausencia de haplotipos representativos para un lugar de procedencia. ΔWT: ausencia de hibridación de sonda *wild type*, sin presencia de hibridación de sonda *mut* correspondiente. S315T: S315T1 (AGC→ ACC). Mapa de calor obtenido usando el paquete *Gplots* v3.1.1 del programa R.

presentaron una mayor carga en Lima y Callao, en específico, en las direcciones de salud de Lima Este, Lima Ciudad y Callao. El análisis en conjunto de los 134 haplotipos determinó que 18 departamentos y la provincia del Callao presentaron alta diversidad ($S=25,8$; $1-D=0,9$; $H^2=2,4$); Cajamarca, Amazonas, Moquegua y Apurímac presentaron una diversidad moderada ($S=3,8$; $1-D=0,7$; $H^2=1,2$) y solo Pasco y Puno tuvieron una baja diversidad ($S=1$; $1-D=0$; $H^2=0$) (Figura 2).

Asociación de haplotipos

En general, los haplotipos formados por resultados de resistencia directa presentaron altas confianzas de asociación; mientras que

los haplotipos formados con resultados de resistencia inferida tuvieron confianzas de asociación moderadas y mínimas. No se evidenciaron asociaciones significativas con haplotipos huérfanos. La monorresistencia fenotípica a rifampicina se asoció con haplotipos que presentaron patrones de ausencia de hibridación solo en las bandas WT 3, 4, 7 y 8. La monorresistencia fenotípica a isoniácida estuvo asociada con tres haplotipos que presentaron solo mutaciones en el gen *inhA*, dos haplotipos con mutaciones solo en el gen *katG*, y un haplotipo con mutaciones en ambos genes. Igualmente, se observó la asociación discordante del haplotipo 21 (ausencia de la sonda WT2 del gen *rpoB*) con el fenotipo resistente a isoniácida. Respecto al fenotipo TB-

A

Fenotipo (MP 7H10)	Haplotipo	Confianza de asociación	<i>rpoB</i>									<i>inhA</i>					<i>katG</i>			Clase													
			WT1	WT2	WT3	WT4	WT5	WT6	WT7	WT8	MUT1	MUT2A	MUT2B	MUT3	Variante	WT1	WT2	MUT1	MUT2		MUT3A	MUT3B	Variante	WT	MUT1	MUT2	Variante						
TB-rR	Hap-35	●	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	ΔWT3,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Raro			
	Hap-42	●	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	D516V	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Raro			
	Hap-51	●	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	ΔWT3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Menos común			
	Hap-84	●	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	ΔWT7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Raro			
	Hap-88	●	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	H526D	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Raro				
	Hap-93	●	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	H526Y	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Raro				
	Hap-102	●	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	ΔWT8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Menos común				
	Hap-116	●	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	S531L	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Menos común					
TB-rH	Hap-21	●	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	ΔWT2	0	0	1	0	0	0	0	c-15t	1	0	0	Raro					
	Hap-123	●	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	ΔWT1	0	0	1	0	0	0	0	ΔWT1	1	0	0	Común					
	Hap-125	●	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	S315T	0	1	0	Menos Común				
	Hap-126	●	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Común			
	Hap-132	●	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	ΔWT	0	0	0	Raro			
	Hap-134	●	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Común			
TB-MDR	Hap-13	●	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	ΔWT2,3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Raro
	Hap-34	●	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	ΔWT3,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Menos Común
	Hap-36	●	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	D516V	0	0	1	0	0	0	0	c-15t	0	1	0	S315T	0	1	0	Raro	
	Hap-41	●	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	D516V	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Común
	Hap-80	●	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	ΔWT7	0	0	1	0	0	0	0	c-15t	0	1	0	S315T	0	1	0	Raro	
	Hap-87	●	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	H526D	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Raro	
	Hap-90	●	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	H526Y	0	0	1	0	0	0	0	c-15t	1	0	0	S315T	0	1	0	Raro		
	Hap-92	●	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	H526Y	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Raro	
	Hap-101	●	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	ΔWT8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Menos Común
	Hap-107	●	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	S531L	0	0	1	0	0	0	0	0	ΔWT1	1	0	0	S315T	0	1	0	Raro		
	Hap-109	●	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	S531L	0	0	1	0	0	0	0	c-15t	1	0	0	S315T	0	1	0	Común			
	Hap-115	●	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	S531L	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Común		
	TB-XDR	Hap-41	●	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	D516V	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S315T	0	1	0	Común
Hap-80		●	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	ΔWT7	0	0	1	0	0	0	0	c-15t	0	1	0	S315T	0	1	0	Raro		
Hap-106		●	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	S531L	0	0	1	0	0	0	0	ΔWT1	0	1	0	S315T	0	1	0	Raro			

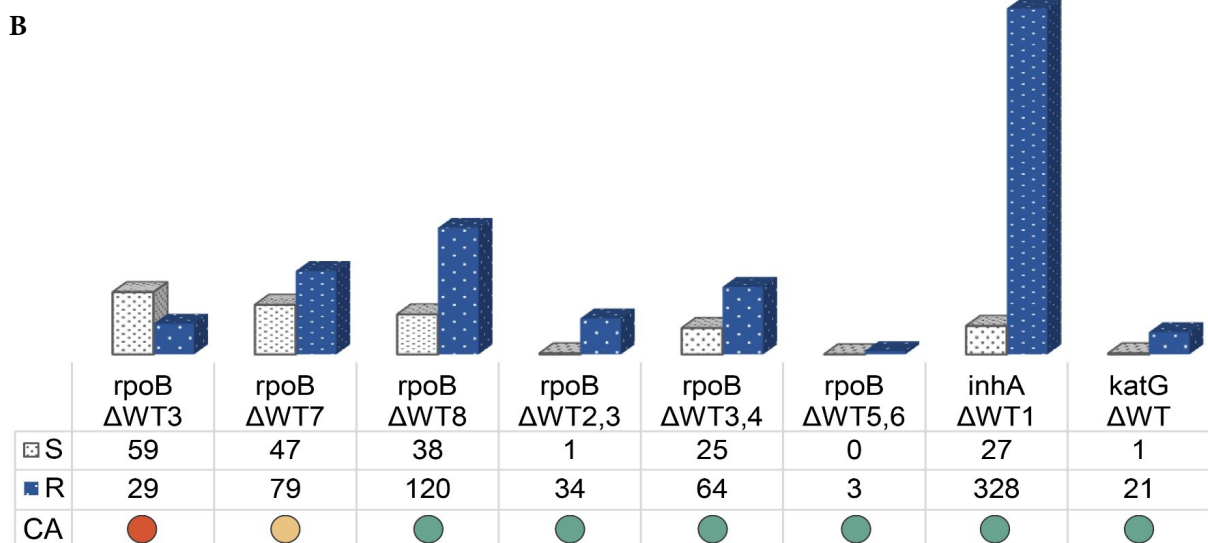


Figura 3. Asociaciones positivas entre la resistencia fenotípica y haplotipos resistentes (A) o resistencia inferida (B) detectados en Perú mediante el ensayo de sondas en línea, periodo 2011-2015. La confianza de asociación (CA) es clasificada en: alta (●), moderada (●) o mínima (●). S: sensible a rifampicina o isoniacida por MP 7H10. R: resistente a rifampicina o isoniacida por MP 7H10. ΔWT: ausencia de hibridación de sonda *wild type*, sin presencia de hibridación de sonda *mut* correspondiente. S315T: S315T1 (AGC →ACC). 1: presencia de hibridación. 0: ausencia de hibridación.

MDR, ocho haplotipos presentaron las mutaciones de detección directa del gen *rpoB*, siendo la S531L la más frecuente presente en tres haplotipos, seguido de D516V y H526Y presentes en dos haplotipos cada uno y H526D con un haplotipo. La TB-XDR estuvo asociada con tres haplotipos conteniendo la mutación *katG* S315T1 (Figura 3A). Finalmente, seis patrones de «drogorresistencia inferida» en el gen *rpoB* (ausencia de sondas WT: 3, 7, 8, 2-3, 3-4, 5-6), uno en el gen *inhA* (ausencia de WT1) y uno en el gen *katG* (ausencia de WT) tuvieron asociaciones positivas con la resistencia fenotípica a rifampicina o isoniácida; de las cuales, seis presentaron una alta confianza de asociación (Figura 3B). El resto de los patrones de drogorresistencia inferida obtuvieron resultados indeterminados de asociación.

DISCUSIÓN

El uso de información de los patrones de hibridación del ESL GenoType® MTBDRplus v2 permitió determinar la estructura genética, así como la frecuencia de las principales mutaciones asociadas con la resistencia a rifampicina e isoniácida en las cepas de MTB que circulan en el Perú. El uso de los haplotipos resistentes permitió obtener un conocimiento amplio sobre la distribución de cepas drogorresistentes de MTB en todo el país.

Según el reporte global de la tuberculosis del 2020, el Perú es considerado como uno de los 30 países a nivel mundial con mayor carga de TB-MDR⁽¹⁾, razón por la que el análisis de nuestros resultados reveló la existencia de una mayor proporción de cepas TB-MDR (10%) a nivel nacional. Por otro lado, la detección de tres haplotipos comunes con genotipo TB-rH (Hap-123, Hap-126 y Hap-134) evidencia la alta carga de resistencia a isoniácida presente en el país. Esta mayor proporción de casos TB-rH, a comparación de los casos TB-rR, ha sido observado desde la década pasada y continúa extendiéndose hasta la actualidad en el Perú y en el mundo^(16,17).

En el Perú, el uso del ESL permite detectar los casos de TB-rH adecuadamente; sin embargo, a nivel global la resistencia a rifampicina siempre ha sido priorizada y las tecnologías de diagnóstico han sido dirigidas a dicho objetivo, esto debido a la importancia de esta droga en el tratamiento. La no evaluación de la resistencia a isoniácida, provocaría que los pacientes con TB-rH sean erróneamente diagnosticados como TB sensible a los medicamentos, trayendo consigo malos resultados en el tratamiento, recaídas y el desarrollo de resistencia a medicamentos adicionales durante el tratamiento⁽¹⁸⁾. Por otro lado, la TB-rR es rara a nivel mundial y también está asociada con malos resultados en el tratamiento, además de evolucionar fácilmente a casos de TB-MDR y TB-XDR⁽¹⁹⁾. Los resultados determinan que en el Perú la TB-rR exhibe solo una proporción del 1,8%, lo cual coincide con las tendencias globales⁽²⁰⁾. De esta manera, nuestras estadísticas revelan que 8,5 de cada 10 casos con resistencia a rifampicina son casos TB-MDR; sin embargo,

el uso del ESL en los algoritmos nacionales de diagnóstico asegura una correcta detección de esta forma de resistencia.

La inexistencia de una estructuración geográfica de los marcadores de resistencia establece que en el Perú continúan prevaleciendo los marcadores genéticos asociados con resistencia de isoniácida y rifampicina de mayor incidencia en América y el resto del mundo (*rpoB* D516V, *rpoB* S531L, *katG* S315T, *inhA* c-15t), las cuales son detectadas de manera directa mediante el ESL⁽¹¹⁾. La elevada frecuencia de estas mutaciones puede estar asociada con el hecho de que estas alteraciones no tienen un costo, o presentan un muy bajo costo, en el *fitness* biológico de las cepas, ya que se ha evidenciado la existencia de mutaciones compensatorias en otros genes que están asociadas con estas mutaciones prevalentes, ayudando a la diseminación de las cepas resistentes incluso con mayor éxito a comparación de las cepas sensibles⁽²¹⁾.

Las muestras analizadas revelan también la existencia de una moderada cantidad de cepas con resistencia inferida. Respecto al gen *rpoB*, los genotipos evidenciando resistencia inferida por ausencia de hibridación en las sondas WT2, WT3, WT2-WT3, WT3-4, WT7 y WT8 comprenden poco más del 20% del total de cepas resistentes a rifampicina. Muchas de estas mutaciones han sido evaluadas en estudios previos y han sido determinadas como ocurrencia de inserciones, deleciones y variantes de nucleótido simple, tales como: D516A, D516T, N518del, L533P y S450W⁽²²⁻²⁴⁾. Respecto al gen *katG*, se observa que solo el 0,5% del total de muestras resistentes a isoniácida presenta una determinación inferida de la resistencia. Este comportamiento puede deberse a las distintas variaciones naturales del codón 315 reportadas en estudios previos: S315I, S315N, S315G y S315R⁽²³⁻²⁵⁾. Distinto fue para el análisis de la región promotora del gen *inhA*, donde la determinación inferida de la resistencia comprende al menos un considerable 8% del total de cepas resistentes a isoniácida (ausencia WT1). De acuerdo con estudios previos en el Perú y el mundo, el cambio nucleotídico más probable localizado en esta región génica comprendería la mutación asociada a resistencia g-17t^(26,27).

Finalmente, el análisis de asociación evidenció una alta concordancia entre las mutaciones encontradas y los respectivos fenotipos de resistencia. Sin embargo, se observaron discordancias entre determinados genotipos de resistencias inferidas con sus respectivos resultados fenotípicos. Estos genotipos evidenciaron la existencia de mutaciones controversiales en estas regiones génicas, tales como los cambios no sinónimos: L511P (Δ WT2), D516Y/G (Δ WT3,4), H526N/L/C/S (Δ WT7), S531C (Δ WT8) y L533P (Δ WT8), las cuales dan como resultado fenotipos sensibles en medios de cultivo sólido (7H10, Lowenstein-Jensen) y/o líquido (MGIT)⁽²⁸⁻³⁰⁾. Este tipo de mutaciones causan bajos niveles de resistencia (concentraciones críticas menores a las dispuestas por la OMS), por lo que han sido asociadas con pobres resultados en el tratamiento, así como un retraso en el crecimiento en los medios de cultivo⁽²⁸⁾.

Las fortalezas del presente estudio fueron el número de muestras incluidas a quienes se le realizó el ESL en el Perú durante los años seleccionados, así como la representatividad nacional de estas muestras. Adicionalmente, la participación del LRNM en rondas anuales de evaluación de desempeño para esta metodología que asegura la confiabilidad de los resultados obtenidos. En correspondencia a las limitaciones, la determinación de la estructura genética se basó solo en las regiones nucleotídicas evaluadas por el ESL, por lo que no se evalúan las regiones completas de los tres genes analizados. Además, la diversidad genética hallada no contempla la inclusión de otros genes asociados en menor grado a la drogorresistencia de ambos fármacos. Sin embargo, el uso de los marcadores de mayor prevalencia en el Perú y el mundo, caracterizados en el presente estudio, aseguran que se haya logrado captar la mayor diversidad genética de las principales regiones asociadas a resistencia en las cepas de MTB circulantes en el territorio peruano.

Adicionalmente, existe la limitación de que el estudio evalúa principalmente la diversidad genética de genes asociados con resistencia, pero no abarca el uso de marcadores genéticos presentes en todo el genoma micobacteriano, lo que puede llevar el riesgo de una subestimación o sobrestimación de la diversidad total de MTB. Sin embargo, el uso de los marcadores genéticos evaluados en el ESL, al igual que otras metodologías convencionales tales como el *spoligotyping* y MIRU-VNTR, serviría como una aproximación inicial de la diversidad genética. Finalmente, el aprovechamiento secundario de la información genética disponible mediante el método diagnóstico ESL brinda un valor agregado y se obtiene una ventaja costo-beneficio frente a otros métodos convencionales. De este modo, es posible realizar la caracterización genética de las cepas de MTB sin tener que recurrir a la implementación de ajustes dramáticos en los laboratorios nacionales.

En conclusión, el análisis de mutaciones y haplotipos obtenidos mediante el ensayo con sondas en línea permitió determinar la estructura genética, subyacente a las principales regiones de resistencia, de las cepas drogorresistentes de MTB que circulan en Perú, evidenciando que a través de los años la resistencia a rifampicina e isoniacida están dirigidas por las mutaciones de mayor prevalencia en América y el resto del mundo. Asimismo, existe una alta diversidad genética en la mayoría de los departamentos del Perú y una concentración de las cepas drogorresistentes en las ciudades de Lima y Callao. Además, se recomienda que el Perú y otros países de la región que poseen una importante carga de cepas con perfil monorresistente a isoniacida deben continuar incluyendo, en los algoritmos de diagnóstico nacional, pruebas que incorporen el análisis de la resistencia a este fármaco a fin de obtener un diagnóstico preciso de la drogorresistencia.

Agradecimientos: agradecemos a todo el personal del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias y a la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, por el trabajo rutinario en el aislamiento e identificación de las diferentes muestras que fueron incluidas en este estudio.

Contribuciones de los autores: DSL, ZMP y RGG realizaron la conceptualización, análisis formal e interpretación de resultados. DSL y ZMP elaboraron el borrador del manuscrito. DSL, ZMP y RGG leyeron y aprobaron el manuscrito final.

Financiamiento: esta investigación fue subvencionada por el Instituto Nacional de Salud del Perú, el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - INNOVATE Perú (contrato: 353-PNCP-PIAP-2014) y la Dirección de Investigación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (código: B-074-2021).

Conflictos de interés: los autores declaran no tener relación alguna con la marca comercial GenoType®, así como ningún conflicto de interés que revelar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. 2020 [citado el 20 de diciembre de 2020]; Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
- Johnston JC, Shahidi NC, Sadatsafavi M, Fitzgerald JM. Treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2009;4(9):e6914. doi:10.1371/journal.pone.0006914.
- Ministerio de Salud. Portal de Información [Internet]. [citado el 2 de febrero de 2021]. Lima: MINSAL; 2021. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/MapasTB.aspx>
- Puyén ZM, Acosta J, Obregon G, Pacheco E, Ramirez H, Mendoza A, *et al.* Use and evaluation of a line probe assay in patients with tuberculosis in Peru: 2011–2013. *Rev Panam Salud Pública*. 2016;39(1):19–25.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLoS ONE*. 2009;4(11):e7815. doi:10.1371/journal.pone.0007815.
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):658–85. doi:10.1128/CMR.00061-05.
- Arnold B, Sohail M, Wadsworth C, Corander J, Hanage WP, Sunyaev S, *et al.* Fine-Scale Haplotype Structure Reveals Strong Signatures of Positive Selection in a Recombining Bacterial Pathogen. *Mol Biol Evol*. 2020;37(2):417–28. doi:10.1093/molbev/msz225.
- Pulido-Tamayo S, Sánchez-Rodríguez A, Swings T, Van den Bergh B, Dubey A, Steenackers H, *et al.* Frequency-based haplotype reconstruction from deep sequencing data of bacterial populations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(16):e105. doi:10.1093/nar/gkv478.
- Bengtsson-Palme J. The diversity of uncharacterized antibiotic resistance genes can be predicted from known gene variants—but not always. *Microbiome*. 2018;6(1):125. doi:10.1186/s40168-018-0508-2.
- Walker ES, Levy F. Genetic trends in a population evolving antibiotic resistance. *Evol Int J Org Evol*. 2001;55(6):1110–22. doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb00631.x.
- Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, *et al.* Molecular test GenoType® MTBDRplus, an alternative to rapid detection of multidrug resistance tuberculosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2012;29(1):92–8.
- Agapito J, Neyra V, Castro J, Accinelli R, Rodríguez I, Espinoza JR. Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a la

- rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2002;19(3):117-23.
13. World Health Organization. Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB. 2018 [citado el 20 de diciembre de 2020]; Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260470>.
 14. Bomba L, Walter K, Soranzo N. The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease. *Genome Biol*. 2017;18(1):77. doi:10.1186/s13059-017-1212-4.
 15. Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, *et al*. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J*. 2017;50(6):1701354. doi:10.1183/13993003.01354-2017.
 16. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2017;34(2):299-310.
 17. Jenkins HE, Zignol M, Cohen T. Quantifying the burden and trends of isoniazid resistant tuberculosis, 1994-2009. *PloS One*. 2011;6(7):e22927. doi:10.1371/journal.pone.0022927.
 18. Stagg HR, Lipman MC, McHugh TD, Jenkins HE. Isoniazid-resistant tuberculosis: a cause for concern?. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 2017;21(2):129-39. doi:10.5588/ijtld.16.0716.
 19. Mvelase NR, Balakrishna Y, Lutchminarain K, Mlisana K. Evolving rifampicin and isoniazid mono-resistance in a high multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis region: a retrospective data analysis. *BMJ Open*. 2019;9(11):e031663. doi:10.1136/bmjopen-2019-031663.
 20. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. 2019 [citado el 22 de diciembre de 2020]; Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714>.
 21. Munir A, Kumar N, Ramalingam SB, Tamilzhalagan S, Shanmugam SK, Palaniappan AN, *et al*. Identification and Characterization of Genetic Determinants of Isoniazid and Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Southern India. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-13. doi:10.1038/s41598-019-46756-x.
 22. Arandjelović I, Merker M, Richter E, Kohl TA, Savić B, Soldatović I, *et al*. Longitudinal Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis in a Hospital Setting, Serbia. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(3):555-8. doi:10.3201/eid2503.181220.
 23. San LL, Aye KS, Oo NAT, Shwe MM, Fukushima Y, Gordon SV, *et al*. Insight into multidrug-resistant Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar. *Int J Infect Dis*. 2018;76:109-19. doi:10.1016/j.ijid.2018.06.009.
 24. Vigo A, Solari L, Santos D, Puyén ZM. Mutaciones que confieren resistencia a fármacos antituberculosis de primera línea en Perú: una revisión sistemática de la literatura. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2019;36(4):636-45. doi:10.17843/rpmesp.2019.364.4722.
 25. Unissa AN, Doss C GP, Kumar T, Swathi S, Lakshmi AR, Hanna LE. Analysis of interactions of clinical mutants of catalase-peroxidase (KatG) responsible for isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* with derivatives of isoniazid. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;11:57-67. doi:10.1016/j.jgar.2017.06.014.
 26. Solari L, Santos-Lazaro D, Puyen ZM. Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Discordant Results for Drug-Susceptibility Testing in Peru. *Int J Microbiol*. 2020;2020:8253546. doi:10.1155/2020/8253546.
 27. Santos-Lazaro D, Gavilan RG, Solari L, Vigo AN, Puyen ZM. Whole genome analysis of extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Peru. *Sci Rep*. 2021;11(1):9493. doi:10.1038/s41598-021-88603-y.
 28. Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, Degano M, Cirillo DM. Role of Disputed Mutations in the rpoB Gene in Interpretation of Automated Liquid MGIT Culture Results for Rifampin Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5):e01599-17. doi:10.1128/JCM.01599-17.
 29. Rigouts L, Gumusboga M, de Rijk WB, Nduwamahoro E, Uwizeye C, de Jong B, *et al*. Rifampin Resistance Missed in Automated Liquid Culture System for *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Specific rpoB Mutations. *J Clin Microbiol*. 2013;51(8):2641-5. doi:10.1128/JCM.02741-12.
 30. Al-Mutairi NM, Ahmad S, Mokaddas E, Eldeen HS, Joseph S. Occurrence of disputed rpoB mutations among *Mycobacterium tuberculosis* isolates phenotypically susceptible to rifampicin in a country with a low incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):3. doi:10.1186/s12879-018-3638-z.