



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Análisis genómico comparativo de linajes de
Mycobacterium tuberculosis extensamente
drogorresistentes en Perú, periodo 2011-2015**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Elias David SANTOS LÁZARO

ASESOR

Dr. Mario MONTEGHIRFO GOMERO

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Santos, E. (2023). *Análisis genómico comparativo de linajes de Mycobacterium tuberculosis extensamente drogorresistentes en Perú, periodo 2011-2015*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas/Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Elias David Santos Lázaro
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44645298
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-1450-2039
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mario Monteghirfo Gomero
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08795755
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1292-1187
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Ruth Hortensia García de la Guarda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06041081
Nombres y apellidos	Gina Nilda Salvador Lujan
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08694713
Nombres y apellidos	Roger Alberto Palomino Huarcaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25841842
Miembro del jurado 3	
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1

Grupo de investigación	Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud
Agencia de financiamiento	Perú. Programa Nacional de Desarrollo Tecnológico e Innovación (Innovate). Contrato N° 353-PNICP-PIAP-2014
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto Nacional de Salud País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Chorrillos Latitud: -12.182561 Longitud: -77.016715
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2021
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Genética, Herencia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 227v-UPG-FCB-2022

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO
ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las ~~15:05~~ horas del día viernes 14 de abril de 2023, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dra. Ruth Hortensia García de la Guarda e integrado por
Mg. Gina Nilda Salvador Lujan (Miembro)
Mg. Roger Alberto Palomino Huarcaya (Miembro)
Dr. Mario Monteghirfo Gomero (Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el señor Bachiller Don **ELIAS DAVID SANTOS LÁZARO**.

Después de darse lectura al **Expediente N° 227v-UPG-FCB-2022**, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

“Análisis genómico comparativo de linajes de *Mycobacterium tuberculosis* extensamente drogorresistentes en Perú, periodo 2011-2015”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: EXCELENTE..... con la nota de VEINTE (20).....

A continuación, la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular, al señor Bachiller **ELIAS DAVID SANTOS LÁZARO**.

Siendo las 16:45... se levantó la sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día 14 de abril del año 2023.

Dra. Ruth H. García de la Guarda
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE
rgarciad@unmsm.edu.pe
RENACYT P0001951

Dr. Mario Monteghirfo Gomero
Profesor Principal D.E.
ASESOR
mmonteghirfog@unmsm.edu.pe
RENACYT P0094066

Mg. Gina N. Salvador Lujan
Profesora Auxiliar a T.P.
MIEMBRO
jsalvadorl@unmsm.edu.pe

Mg. Roger A. Palomino Huarcaya
Profesor Auxiliar a T.C.
MIEMBRO
rpalominoh@unmsm.edu.pe



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. Facultad: CIENCIAS BIOLÓGICAS
2. UNIDAD DE POSGRADO
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad:
Evaluadores de la originalidad de los documentos de investigación conducentes a los grados académicos de la UPG (RD N° 564-D-FCB-2018):
_ Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
_ Dra. Mónica Arakaki Makishi
4. Apellidos y Nombres de la autoridad académica: Dra. Liz Erika Cruz Pio, Directora de la Unidad de Posgrado
5. Operador del Programa Informático de Similitudes:
X Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
_ Dra. Mónica Arakaki Makishi
6. Documento evaluado: "Análisis genómico comparativo de linajes de *Mycobacterium tuberculosis* extensamente drogorresistente en el Perú, periodo 2011-2015"
7. Tesis para Grado Académico de: Magíster en Biología Molecular
8. Autor del documento:
Apellidos: **SANTOS LÁZARO**
Nombres: **ELIAS DAVID**
9. Fecha de recepción de documento: 15 de mayo de 2023
10. Fecha de aplicación del programa informático de similitud:
15 de mayo de 2023
11. SOFTWARE UTILIZADO
- Turnitin
12. Configuración del programa detector de similitudes
X Excluye texto entrecomillado
X Excluye bibliografía
X Excluye cadenas menores a 40 palabras
- Otros criterios (especificar)
13. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes
- Porcentaje en letras y números: OCHO por ciento de similitud (8%)
14. Fuentes originales de las similitudes encontradas
- Indicarlas en decreciente y su respectivo porcentaje: Se adjunta Informe respectivo
15. Observaciones
Ninguna
16. Calificación de originalidad
- Documento cumple criterios de originalidad, según la normativa del VRIP.
17. Fecha del informe
1° Informe: 07 de setiembre de 2022
2° Informe: 17 de setiembre de 2022
3° Informe: 15 de mayo de 2023



Firmado digitalmente por SILVA
DAVILA Diana Fernanda FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 29.05.2023 12:05:34 -05:00

DRA. DIANA F. SILVA DÁVILA
Miembro Evaluador



Firmado digitalmente por CRUZ PIO
Liz Erika FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 29.05.2023 17:27:57 -05:00

DRA. LIZ ERIKA CRUZ PIO
Directora de la Unidad de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por todo lo que he conseguido y que conseguiré en las distintas áreas de mi vida. Él es mi guía y cada etapa de mi vida está en sus manos.

En segundo lugar, agradezco a mis padres quienes son una bendición grande en mi vida. Agradezco todo el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de mi preparación profesional en estudios de pregrado y posgrado. Este proyecto de investigación no es mi éxito, sino el de mis padres. Asimismo, agradezco a todos los demás miembros de mi familia quienes con sus consejos y paciencia me apoyaron para el logro de mis metas, motivándome a esforzarme cada día más.

Agradezco a la Dra. Zully Puyen Guerra, coordinadora del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y poder concretar este estudio de investigación.

Agradezco al Dr. Mario Monteghirfo Gomero, Dr. Ronnie Gavilán Chávez y Dra. Lely Solari Zerpa por las directivas brindadas en el desarrollo de la tesis, la confianza brindada y el apoyo continuo.

Agradezco a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud, ya que tanto profesionales de salud como técnicos de laboratorio, me brindaron su apoyo incondicional en las diversas metodologías de trabajo que realizan, conocimiento sin el cual no hubiese podido concretar este estudio.

DEDICATORIA

*A mi papá, **Rodolfo Misael Santos Canto***

*Quien fue mi ejemplo y apoyo incondicional para conseguir todos mis logros, y
que ahora ya se encuentra disfrutando en la presencia de nuestro Dios*

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 La tuberculosis en la historia.....	11
2.2 Origen de la Tuberculosis	12
2.3 Diagnóstico y susceptibilidad de la TB	13
2.4 Linajes de MTB	15
2.5 Epidemiología molecular	16
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1 Hipótesis	20
3.2 Objetivos	20
3.2.1 Objetivo general.....	20
3.2.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 Selección de cepas	21
4.2 Confirmación genotípica y fenotípica	21
4.3 Extracción de ADN y Secuenciamiento de Genoma Completo	22
4.4 Análisis bioinformático.....	22
4.4.1 Control de calidad y limpieza de <i>reads</i>	22
4.4.2 Ensamblaje, anotación y llamada de variantes.....	23
4.4.3 Marcadores de resistencia genética	24
4.4.4 Tipificación.....	24
4.4.5 Análisis evolutivo	24
4.4.6 Determinación de grupos de transmisión	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Confirmación genotípica y fenotípica	26
5.2 Valores epidemiológicos	28
5.3 Evaluación de secuenciamiento y ensamblaje genómico	32

5.4	Resistencia antimicrobiana	35
5.5	Linajes y relaciones evolutivas.....	39
5.6	Determinación del grupo de transmisión	43
6.	DISCUSIÓN.....	48
7.	CONCLUSIONES	53
8.	RECOMENDACIONES.....	53
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
10.	ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fotografía de 1899, Hospital Nacional Jewish	12
Figura 2: Bacilos de MTB a través del microscopio electrónico de barrido	13
Figura 3: Árbol filogenético de cepas del complejo Mycobacterium tuberculosis .	19
Figura 4: Distritos con cepas de TB-XDR en la región Lima y la provincia del Callao	31
Figura 5: Distribución de familias génicas en los linajes MTB	40
Figura 6: Distribución nacional de los linajes y sublinajes de las cepas TB-XDR.	41
Figura 7: Árbol filogenómico de máxima probabilidad de cepas TB-XDR peruanas	42
Figura 8: Árbol filogenómico global de 289 cepas TB-XDR.....	43
Figura 9: Análisis de grupos de transmisión de las cepas TB-XDR.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de fármacos y concentraciones críticas evaluadas a través del MP 7H10.....	22
Tabla 2: Procedencia de las cepas TB-XDR extranjeras utilizadas en el estudio.	25
Tabla 3: Resultados de confirmación genotípica (ESL GenoType MTBDRplus) y fenotípica (MP 7H10)	26
Tabla 4: Características de los pacientes	29
Tabla 5: Lugar de procedencia de las cepas TB-XDR confirmadas.....	29
Tabla 6: Métricas de secuenciamiento y mapeo genómico	32
Tabla 7: Lista de mutaciones asociadas a resistencia frente a fármacos de primera línea detectadas en cepas peruanas de TB-XDR	36
Tabla 8: Lista de mutaciones asociadas a resistencia frente a fármacos de segunda línea detectadas en cepas peruanas de TB-XDR.....	37
Tabla 9: Información epidemiológica básica y de tipificación genética de las cepas TB-XDR genéticamente agrupadas.....	47

RESUMEN

Introducción: La tuberculosis (TB) constituye un problema permanente de salud pública que afecta a varios países del mundo. Perú ocupa el primer lugar en el continente americano con alta carga de TB extensamente drogorresistente (TB-XDR). **Objetivo:** Caracterizar genómicamente los linajes de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) obtenidas de pacientes peruanos con TB-XDR detectadas en el periodo 2011-2015. **Métodos:** Se seleccionaron 74 cepas TB-XDR, determinadas fenotípicamente mediante el trabajo de rutina, almacenadas en el banco de criopreservación del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud entre los años 2011 al 2015. El fenotipo de las cepas reactivadas fue confirmado mediante la prueba molecular GenoType® MTBDR*plus* y el método de proporciones en Agar Middlebrook 7H10. Se secuenciaron los genomas completos de las cepas confirmadas utilizando la plataforma MiSeq de Illumina. **Resultados:** Se secuenciaron 68 cepas TB-XDR procedentes de diversas partes del Perú, de las cuales 58 (85,3%) procedieron de los lugares más poblados de Lima y Callao. 62 (91,2%) cepas pertenecieron al linaje euro-americano, mientras que los 6 restantes (8,8%) pertenecieron al linaje este-asiático. La mayoría de las cepas (promedio del 90%) presentaron mutaciones de resistencia de alta confianza. Los resultados discordantes entre las metodologías fenotípicas y genotípicas se debieron a mutaciones (*rpoB*_I491F e *inhA*_S94A) fuera de las regiones de “puntos calientes” analizadas por el método genotípico. El análisis de clusters con un valor de corte de 10 SNPs reveló que solo 23 (33,8%) cepas evidenciaron eventos de transmisión recientes. **Conclusión:** Las cepas peruanas de TB-XDR son representadas mayormente por el linaje euro-americano, y en menor grado por el linaje este-asiático. Estas cepas presentan mutaciones de gran prevalencia a nivel mundial asociados con la resistencia a fármacos antituberculosis. Asimismo, presentan un bajo grado de agrupamiento genético.

Palabras clave: Grupos de transmisión, Linajes, Secuenciamiento de genoma Completo, Tuberculosis extensamente drogorresistente.

ABSTRACT

Background: Tuberculosis (TB) is a permanent public health problem that affects several countries in the world. Peru ranks first in the Americas with a high burden of multidrug-resistant TB (MDR-TB) and since 1999 there has been a continuous increase in extensively drug-resistant TB (XDR-TB). **Objective:** genomic characterization of the lineages of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains obtained from Peruvian patients with XDR-TB detected in the period 2011-2015. **Methods:** 74 XDR-TB strains, phenotypically determined by routine work, and stored in the cryopreservation bank of the National Reference Laboratory for Mycobacteria of the National Institute of Health between 2011 and 2015 were selected. The phenotype of the reactivated strains was confirmed using the GenoType® MTBDR*plus* molecular test and the proportion method on Middlebrook 7H10 Agar. The complete genomes of the confirmed strains were sequenced using the Illumina MiSeq platform. **Results:** 68 XDR-TB strains from various parts of Peru were sequenced, of which 58 (85.3%) came from the most populated areas of Lima and Callao. 62 (91.2%) strains belonged to the Euro-American lineage, while the remaining 6 (8.8%) belonged to the East Asian lineage. Most of the strains (average 90%) appeared to be of high confidence resistance. The discordant results between the phenotypic and genotypic methodologies are due to mutations (*rpoB*_I491F and *inhA*_S94A) present outside the “*hot spot*” regions analyzed by the genotypic method. Cluster analysis with a cut-off value of 10 SNPs revealed that only 23 (33.8%) strains evidenced recent transmission events. **Conclusion:** Peruvian XDR-TB strains are mostly represented by the euro-American lineage, and to a lesser degree by the east-Asian lineage. These strains have highly prevalent mutations worldwide associated with resistance to anti-tuberculosis drugs. Likewise, they present a low degree of genetic grouping.

Keywords: Lineages, extensively drug resistant tuberculosis, Transmission groups, Whole genome sequencing.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es considerada la segunda enfermedad infecto-contagiosa causante de muerte después de la COVID-19 (por encima del VIH/SIDA) (World Health Organization, 2021a). Se estima que en 2019 se diagnosticó TB a 10 millones (rango 8,9-11 millones) de personas y 1,4 millones fallecieron en todo el mundo a causa de esta enfermedad (World Health Organization, 2020). La tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) y la tuberculosis extensamente drogorresistente (TB-XDR) (World Health Organization, 2020) constituyen formas de esta patología que van en aumento y necesitan de un tratamiento más costoso y extenso; además, los fármacos utilizados producen niveles de toxicidad altos junto con una mayor mortalidad (Günther et al., 2015). Así, para 2019, a nivel mundial se informó que el 3,3% de casos nuevos de TB y el 17.7% de casos tratados previamente fueron diagnosticados con TB-MDR. Así mismo, se estima que el 6.2% (Intervalo de confianza del 95%: 4,4% a 8,2%) de casos TB-MDR son también casos TB-XDR (World Health Organization, 2019). La última forma grave tiene la tasa de éxito del tratamiento más baja (39%) en comparación con otras formas de TB (World Health Organization, 2019). Las consecuencias económicas de estas formas drogorresistentes se ven reflejadas en la gran cantidad de años de vida perdidos para los países, debido a que en su mayoría son los adultos quienes más se contagian de TB y los costos asociados con los tratamientos de pacientes con TB drogorresistente son muy altos (Günther et al., 2015).

En el 2018, al menos un caso de TB-XDR fue reportado por los 131 Estados miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 2019); y en el 2019 se reportaron 12,350 casos de TB-XDR a nivel mundial. Sin embargo, la región de las américas también alberga casos de TB-XDR, de entre los cuales Perú es el país que contiene la mayor carga (Mendoza-Ticona & Gotuzzo, 2008; World Health Organization, 2018a). Así, en 1999 se detectó la primera cepa de TB-XDR en Perú (Bonilla Asalde, 2008). En el periodo 2011-2021 el número de casos se ha mantenido en el rango de 77 a 109 casos por año (excepto el año 2020, donde solo se registraron 51 casos por falta de un adecuado tamizaje debido a la llegada

de la pandemia Covid-19) (MINSA-DPCTB, 2021). Además, solo las ciudades de Lima y Callao albergan alrededor del 83% de toda la carga de TB-XDR nacional (DPCTB-MINSA, 2022).

La resistencia a los fármacos utilizados en el tratamiento contra la TB es una gran amenaza para las estrategias que se están desarrollando para lograr la erradicación de la epidemia de TB. La única forma de detectarlo es mediante pruebas de laboratorio genotípicas o fenotípicas que detectan la presencia de ADN o el crecimiento del microorganismo, respectivamente. Asimismo, se han aplicado diferentes metodologías para el estudio epidemiológico de la TB en un área geográfica específica a nivel mundial, dentro de las principales técnicas convencionales utilizadas para tal fin se encuentran los análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica del gen IS6110 (IS6110 RFLP), análisis de espaciador tipificación de oligonucleótidos (spoligotyping) y número variable de repeticiones en tándem de unidades micobacterianas repetitivas interespaciadas (MIRU-VNTR). Asimismo, se han realizado estudios en Perú donde se han utilizado estas metodologías (Barletta et al., 2013; Cáceres et al., 2014; Capcha A et al., 2005); de estos, solo uno ha evaluado la diversidad genética de las cepas de TB XDR usando Spoligotyping y MIRU-VNTR (Cáceres et al., 2014). Sin embargo, el problema con el genotipado usando estas técnicas convencionales es el uso limitado de algunas regiones genéticas polimórficas que comprenden menos del 1% de las micobacterias. genoma, que en cierta medida limita su poder de diferenciación entre diferentes cepas (Brown et al., 2016; Roetzer et al., 2013).

Recientemente, la revolución de la tecnología del Secuenciamiento de Próxima Generación (NGS) y su reducción de costos han permitido que el Secuenciamiento de Genoma Completo (WGS) sea utilizado a nivel mundial. El WGS permite obtener información sobre especiación, predicción de farmacoresistencia y mejor resolución de parentesco (Gilchrist et al., 2015; Walker et al., 2013a, 2015), permitiendo el desarrollo de epidemiología genómica con alto rendimiento (Gilchrist et al., 2015; Walker et al., 2013a, 2015). De esta forma es posible obtener una mayor cantidad de información que permite una completa caracterización y discriminación de cepas con

patrones genotípicos convencionales repetidos o ambiguos (Niemann et al., 2009; Schürch et al., 2010).

Frente a esto, el presente estudio busca realizar la caracterización genómica de los linajes de las cepas TB-XDR que circularon en el Perú en el periodo 2011-2015; poniendo énfasis en la detección de marcadores genéticos de resistencia antimicrobiana, determinación de grupos de transmisión y determinación de los linajes y familias génicas de MTB.

2. ANTECEDENTES

2.1 La tuberculosis en la historia

La enfermedad de la TB viene siendo registrada desde Grecia donde el historiador Hipócrates reconoció la enfermedad y la denominó como 'Phthisis'. Mientras que en Inglaterra y Francia se encontraron registro de la TB pero fue llamada el 'Mal del Rey', ya que se tuvo la creencia de que las personas con TB solo conseguían sanarse a través del "Toque real", la cual consistía de la imposición de manos por parte de los reyes de Inglaterra y Francia (Murray et al., 2016). En Europa Occidental (siglo XVIII) la TB fue considerada una epidemia de resultados mortales con tasas de 900 decesos por cada 100,000 habitantes cada año. Además, se observó una mayor afección a la población de jóvenes, por lo que fue llamada 'El ladrón de los jóvenes'. El uso de "casas de curación", comúnmente conocidos como sanatorios, fue realizada en el siglo XIX y fueron usadas como una de las primeras medidas en la lucha contra la enfermedad (Figura 1). En 1865, el médico francés Jean-Antoine Villemin, descubrió que la TB era una enfermedad infecciosa transmisible, logrando infectar conejos de laboratorio al usar líquidos extraídos de las cavidades pulmonares de pacientes que murieron a causa de TB (Villemin, 1865). En el año de 1882, el científico Robert Koch logró aislar por vez primera al bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), causante de la TB. Posteriormente, se descubrieron los exámenes de tuberculina de Pirquet y Mantoux, así como la vacuna del Bacilo de Calmette y Camille Guérin (conocida hasta la actualidad como la vacuna BCG). La vacuna BCG fue probada en humanos en el año de 1921 y, hasta

la actualidad, viene siendo inoculada en los infantes (Somasundaram et al., 2014).

El tratamiento y control moderno de la TB se inició con el uso de fármacos en 1944, específicamente la estreptomina el cual fue el primer fármaco usado contra la TB (Daniel, 2006; Luca & Mihaescu, 2013). A través de los años se observó que el uso único de la estreptomina dio como resultado que las cepas de MTB desarrollaran resistencia a la misma, haciéndose inefectivo el tratamiento farmacológico con la estreptomina. Por lo tanto, a través de los años, diversos estudios dieron las directivas para que la TB sea tratada mediante la combinación de diversos fármacos. Por esto, inicialmente se adicionó el fármaco de ácido para-aminosalicílico. Luego, en el año de 1952 se incorporó el fármaco de isoniacida y se demostró que era más eficaz que las drogas usadas previamente. Así mismo, en el año de 1967, el fármaco de rifampicina fue adicionado al tratamiento combinado con las otras drogas antituberculosis (Somasundaram et al., 2014).



Figura 1: Fotografía de 1899, Hospital Nacional Jewish

2.2 Origen de la Tuberculosis

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa producida por especies comprendidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB): *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. suricattae* y *M. mungii* (Sinha et al., 2016). La especie de mayor interés es *Mycobacterium tuberculosis* debido a que a través de los

años ha causado que más de un tercio de la población mundial sea infectada con TB; además, que también tiene la capacidad de infectar a distintos animales producto de la cercanía con personas infectados (Forrellad et al., 2013) (Figura 2).

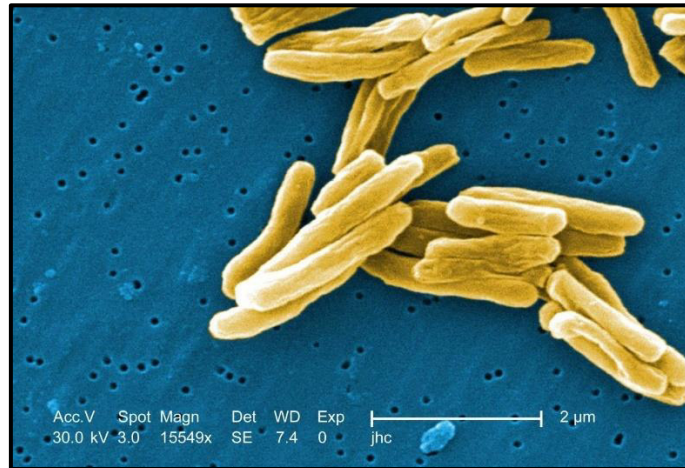


Figura 2: Bacilos de MTB a través del microscopio electrónico de barrido (Fuente: Centers for Disease Control and Prevention).

Pese a esto, los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) son relativamente raros en el CMTB ya que ocurren aproximadamente cada 3kb (Comas et al., 2010). Por esto, MTB ha sido considerado como una bacteria monomórfica en conjunto con otras especies bacterianas tales como: *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium leprae* o *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (Achtman, 2008) debido a que en general el CMTB exhibe una limitada variación génica y no existe una significativa tasa de transferencia horizontal, los SNPs homoplásicos son extremadamente raros, lo que hace que los SNPs sean marcadores filogenéticos ideales (Comas et al., 2009)

2.3 Diagnóstico y susceptibilidad de la TB

Durante años la única manera de realizar el diagnóstico y detección de resistencia de la tuberculosis fue a través del uso de pruebas fenotípicas. Las pruebas convencionales son basadas en el crecimiento del bacilo de MTB en la presencia de un medicamento antituberculosis a una concentración crítica

establecida. Además, la duplicación de MTB se lleva a cabo en un intervalo de 18 a 20 horas causando un retraso en la obtención de resultados. Debido a esto, se espera como mínimo 2 semanas (en cultivos líquidos) o 3 semanas (cultivos sólidos) para realizar el aislamiento de la micobacteria y la prueba fenotípica de susceptibilidad (Boehme et al., 2011; Cudahy & Sheno, 2016).

Frente a esto, en los últimos años implementaron pruebas genotípicas rápidas (pruebas moleculares) para el análisis directo del ADN micobacteriano y la detección de mutaciones asociadas a resistencia frente a los principales medicamentos antituberculosis (Asencios et al., 2012; Bai et al., 2016; Brossier et al., 2010; Steingart et al., 2014). Actualmente, las pruebas recomendadas por la OMS y de mayor uso son: el ensayo de sonda en línea (ESL) GenoType MTBDR*plus*, ESL GenoType MTBDR*sl* (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) y el ensayo de amplificación automatizada en tiempo real, GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). Estas pruebas moleculares son rápidas y presentan una alta especificidad y sensibilidad; sin embargo, presentan la limitación de que únicamente evalúan mutaciones y regiones cromosómicas de alta prevalencia a nivel mundial.

De la misma manera, frente a los resultados discordantes en las pruebas de diagnóstico molecular también surge como medida final el análisis de SNPs de DNA, tal es así que en Bélgica se detectó un caso de falso resistente a rifampicina utilizando las pruebas moleculares rápidas de Gene Xpert MTB/RIF y GenoType MTBDR*plus*, sin embargo, el cultivo líquido arrojó un resultado de sensible a rifampicina. Ante esto, se realizó la confirmación final realizando Secuenciamiento del gen *rpoB* y se detectó que la mutación causante del falso diagnóstico era provocado por un SNP que causaba una mutación silenciosa (Mathys et al., 2014). Además, en el año 2012 se reportó casos de TB causadas por alteraciones nucleotídicas en el gen *rpoB* que aumentaban la posibilidad de fracaso en el tratamiento pero que no fueron detectados oportunamente por las concentraciones mínimas de rifampicina en las pruebas de susceptibilidad fenotípica. Posteriormente estos SNPs fueron detectados usando amplificación y Secuenciamiento (Williamson et al., 2012).

A nivel mundial, se ha demostrado el uso eficaz del NGS para el diagnóstico de susceptibilidad a drogas anti-tuberculosis (Daum et al., 2018; Ko et al., 2019; Walker et al., 2015). Por esta razón, en el 2018 el NGS fue recomendado por la OMS para la lucha contra la TB (World Health Organization, 2018b).

2.4 Linajes de MTB

Mycobacterium tuberculosis surgió como un patógeno humano hace 75-150 mil años y se propagó por expansión clonal entre las comunidades humanas desde entonces, dando lugar a siete linajes filogeográficos que muestran una variabilidad genética relativamente limitada, consistiendo de polimorfismos de secuencia grande (LSP) y SNPs (Hershberg et al., 2008; Wirth et al., 2008). El CMTB está conformado por *Mycobacterium tuberculosis* sensu stricto (Linajes 1, 2, 3, 4 y 7) y *M. tuberculosis* var. *africanum* (Linajes 5 y 6), que causan la enfermedad en humanos. Así mismo, los linajes se distinguen en antiguos y modernos. Los antiguos comprenden cuatro linajes (Linajes 1, 5, 6 y 7). Los linajes modernos 2, 3 y 4 consisten en cepas de MTB responsables de las epidemias más grandes y mortales de los últimos siglos y que están impulsando las pandemias actuales en los países de la región de África subsahariana, del sudeste de Asia, de América y del este de Europa, mientras que el antiguo Linaje 1 causa la TB principalmente en las regiones Indo-Oceánicas y Filipinas (Coscolla & Gagneux, 2014). A pesar de la variabilidad genética limitada dentro de CMTB, las cepas que pertenecen a diferentes linajes muestran diferencias significativas en términos de patogenicidad, transmisibilidad y especificidad del huésped, como lo destacan las diferencias entre las cepas de *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis*. Los linajes del CMTB varían en su distribución geográfica y propagación, siendo endémicos en diferentes lugares del mundo, lo que supone de que los tipos de cepas se adaptan específicamente a diferentes poblaciones humanas (Brites & Gagneux, 2015). El Linaje 2 es particularmente móvil con evidencia de una expansión reciente desde Asia a Europa, América y África. El Linaje 4 es común en Europa, América y el sur

de África, con regiones de alta incidencia de TB y altos niveles de coinfección por VIH, mientras que los Linajes 5, 6 y 7 aparecen aislados en África Occidental y Etiopía (Coll et al., 2014). Así mismo, se tiene evidencia que sugiere que los linajes del CMTB pueden determinar la transmisión, el control y el resultado clínico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. En particular, las variaciones en los fenotipos incluyen diferencias en la aparición de resistencia a los medicamentos, transmisibilidad, virulencia, respuesta del huésped, sitio de la enfermedad y gravedad (Ford et al., 2013; Reiling et al., 2013). Dichos fenotipos confieren ventajas para los linajes del CMTB y pueden conducir a una mayor probabilidad de propagación de la enfermedad y un peor pronóstico para los pacientes. No está claro si el aumento de la virulencia se asocia con un peor pronóstico; sin embargo, algunos estudios informan un mayor riesgo de mortalidad con cepas que se cree que son menos virulentas (Smittipat et al., 2019). Sin embargo, existe una variación considerable entre cepas dentro de los linajes. Por ejemplo, al comparar dos sublinajes diferentes de Beijing, las cepas "antiguas" (atípicas) y "modernas" (típicas) muestran diferencias en la distribución geográfica, el patrón de susceptibilidad a los medicamentos y factores de virulencia (Forrellad et al., 2013). En particular, el sublinaje "moderno" es el de distribución mundial y se encuentra fuertemente asociado con la TB-MDR, la TB-XDR y la hipervirulencia (Forrellad et al., 2013).

2.5 Epidemiología molecular

El estudio de los mecanismos de propagación de los linajes es de gran importancia en la investigación y control de la TB. La identificación rápida del linaje permite el análisis de asociaciones fenotípicas, informa sobre la probable procedencia y puede ayudar en la predicción de posibles brotes futuros.

Históricamente, la identificación de cepas ha implicado el genotipado de repeticiones en tándem (p. ej., espoligotipos) y grandes deleciones (regiones de diferencia [RD]) (Jagielski et al., 2014). A nivel mundial, las principales técnicas convencionales en los estudios epidemiológicos de la TB estuvieron

basados en el estudio génico de fragmentos de restricción de longitud polimórfica del gen IS6110 (IS6110 RFLP), análisis de tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping) y, análisis del número variable de repeticiones en tándem de unidades micobacteriales repetitivas interespaciadas (MIRU-VNTR). En el Perú, sólo en el 2014, la diversidad genética de la TB-XDR fue evaluada mediante los métodos de Spoligotyping y MIRU-VNTR (Cáceres et al., 2014). A la fecha, no existe algún otro estudio que abarque el análisis genético de las cepas TB-XDR. La principal limitación de las técnicas convencionales es el uso de menos del 1% de la información contenida en el genoma micobacterial, lo cual en cierto grado limita su poder de diferenciación entre cepas distintas (Brown et al., 2016; Roetzer et al., 2013).

La revolución en tecnologías de secuenciamiento de ADN y la disminución de costos de los mismos han permitido que el Secuenciamiento de Genoma Completo (WGS) esté al alcance de diversos laboratorios a nivel mundial, permitiendo establecer no solo la secuencia genómica de especies referenciales, sino las secuencias de diversas cepas de una misma especie. Con esto último, el WGS dio lugar al desarrollo de la epidemiología genómica la cual busca analizar todo el contenido genómico entre las distintas cepas de una misma especie (Gilchrist et al., 2015). Así, la caracterización genética de cepas a través del WGS permite utilizar la información de variabilidad nucleotídica comprendida a lo largo de todo el genoma. De este modo es posible obtener una mayor cantidad de información que permita una caracterización completa y discriminación de cepas con patrones genotípicos convencionales repetidos o ambiguos (Niemann et al., 2009; Schürch et al., 2010). Por lo tanto, a la fecha el WGS está siendo utilizado en la detección directa de MTB partiendo de muestras clínicas, detección de infecciones mixtas, detección de reinfecciones y análisis de brotes (Gilchrist et al., 2015; Walker et al., 2013b; Witney et al., 2016).

Recientemente, se realizó WGS en tres aislamientos de MTB que poseían el mismo patrón de RFLP-IS6110. Debido a esto, los eventos de transmisión no pudieron ser determinados; sin embargo, el análisis por secuenciamiento de DNA determinó la existencia de 8 SNPs entre las tres muestras (Schürch

et al., 2010). En otro estudio, se realizó un WGS de dos aislamientos clínicos de MTB que coincidían en su patrón de RFLP-IS6110 y en Spoligotype (familia *Beijing*) y un similar perfil de VNTR-MIRU, dando como resultado que una de las cepas era sensible a isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida y estreptomina; mientras que la otra cepa era resistente a estas cinco drogas (Niemann et al., 2009). Debido al análisis de secuencias genómicas se determinó que ambos aislamientos diferían en 130 SNPs y una gran delección, sugiriendo que la conexión epidemiológica entre estas cepas pudo haber sido remota. Así mismo, en un estudio de cluster de transmisión de cepas de MTB detectadas en Lima, se secuenciaron 61 de 148 cepas perteneciendo a un solo cluster de transmisión MIRU-NVTR. Los resultados de WGS identificaron muchos vínculos genómicos (utilizando el umbral de distancia $\text{SNP} \leq 5$) que no se descubrieron dentro de la investigación de contactos domiciliarios, proporcionando evidencia de que la investigación de contactos domiciliarios no es suficiente para identificar y tratar casos secundarios de TB, ya que la transmisión puede ocurrir en cualquier lugar de la comunidad (Dixit et al., 2019).

En los últimos años se están desarrollando enfoques que solo analizan determinadas regiones génicas. Estos enfoques incluyen métodos *in silico* de spoligotyping y la detección de RDs, la caracterización de SNPs asociados a linajes y métodos de mayor resolución como la Tipificación multilocus de secuencia (MLST) del genoma central. Los enfoques basados en SNPs pueden aplicarse *in silico* o implementarse dentro de un ensayo de tipificación de laboratorio (Cancino-Muñoz et al., 2019). Aunque los linajes definidos por SNPs no ofrecen la misma resolución que usar el genoma completo, brindan información valiosa sobre la epidemiología de las cepas circulantes. Así, en el 2014 se desarrolló un código de barras 62 SNPs usando datos de WGS para 1601 aislados del CMTB (Coll et al., 2014). Posteriormente, en el 2020 se validaron 90 SNPs con el potencial de ser utilizados para la detección y determinación de linajes del CMTB a fin de ayudar en la vigilancia genómica en salud pública (Figura 3) (Napier et al., 2020).

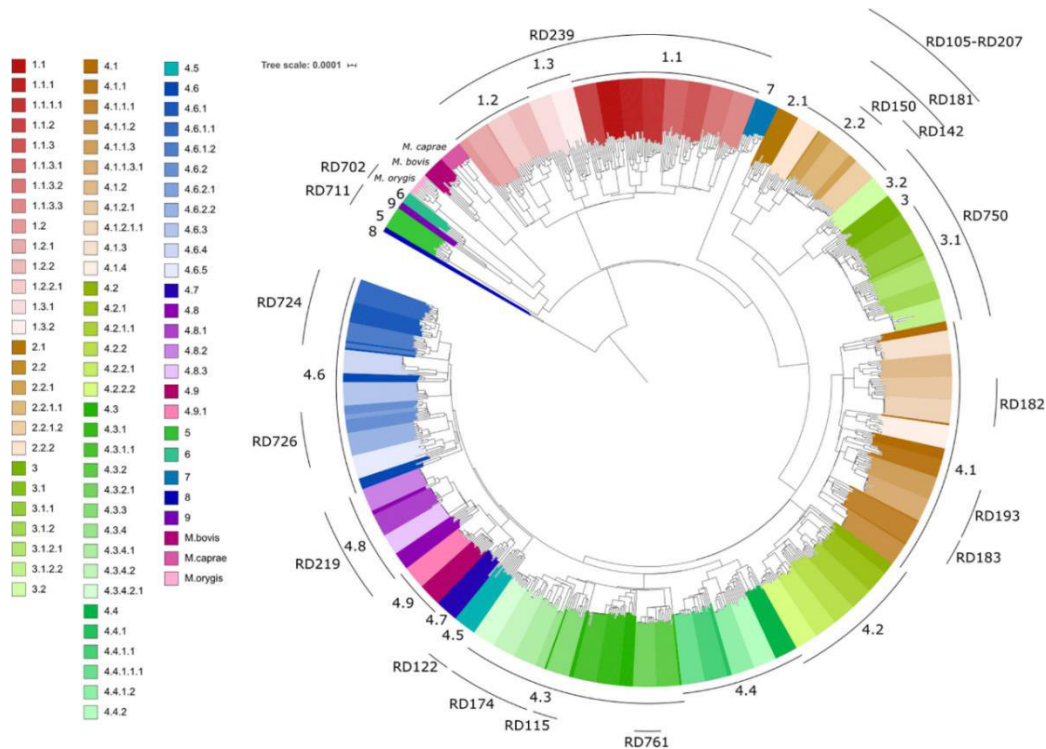


Figura 3: Árbol filogenético de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Árbol representativo conformado con un máximo de 10 aislamientos por sublinaje. Se destacan las principales regiones de diferencia (RD). (Fuente: <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00817-3>).

En particular, el uso de WGS en investigaciones epidemiológicas ha permitido una resolución profunda de los eventos de transmisión, en comparación con las investigaciones epidemiológicas tradicionales (Gardy et al., 2011; Gilchrist et al., 2015; Walker et al., 2013b). Esto es importante para la coordinación y optimización de las medidas de control de TB locales y globales, especialmente en la detección temprana de brotes de TB-MDR y TB-XDR. Por lo tanto, las funciones principales de WGS se superponen con respecto a la salud pública y sirven para: 1) la detección de variantes de secuencias genómicas para predecir los fenotipos de resistencia a los medicamentos de la TB y guiar las decisiones clínicas con respecto al tratamiento; 2) la identificación del linaje de cepas y bases genéticas causantes de resistencia para vigilar el progreso de la TB; y 3) el reconocimiento de cepas genéticamente relacionadas para la resolución de cadenas de transmisión para dirigir los esfuerzos de control de la TB (Witney et al., 2016).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

- Los linajes de cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en el Perú, en el periodo 2011-2015, pueden ser caracterizados mediante el Secuenciamiento de Genoma Completo.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

- Caracterizar genómicamente los linajes de *Mycobacterium tuberculosis* extensamente drogorresistentes circulantes en el Perú, aislados durante los años 2011 al 2015.

3.2.2 Objetivos específicos

- Secuenciar y evaluar el genoma completo de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes peruanos con tuberculosis extensamente drogorresistente para la identificación de SNPs asociados con resistencia a medicamentos antituberculosis de primera y segunda línea.
- Determinar los principales linajes y familias genéticas de cepas extensamente drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* presentes en el territorio peruano durante los años 2011 al 2015.
- Identificar los grupos de transmisión de cepas extensamente drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* presentes en el territorio peruano durante los años 2011 al 2015.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Selección de cepas

Se realizó la selección, mediante muestreo subjetivo por decisión razonada, de 74 cepas TB-XDR a nivel nacional, de acuerdo con los resultados de diagnóstico rutinario del Método de proporciones en placas BD™ de Agar Middlebrook 7H10 (MP 7H10) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania) realizados en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) del Instituto Nacional de Salud (INS). Todas las cepas fueron obtenidas del banco de criopreservación del LRNM, y correspondieron a aislamientos obtenidos a partir de pacientes con TB pulmonar activa diagnosticados entre los años 2011 y 2015. Se obtuvo la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación del INS para el uso y procesamiento de cepas preservadas del LRNM. Toda la información personal se trabajó de forma anónima mediante la creación de un sistema de codificación secundario específico del presente estudio.

4.2 Confirmación genotípica y fenotípica

Las cepas de MTB fueron inoculadas en caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania) e incubadas a 37 °C durante siete días. Luego, se transfirieron 0,2 mL de sobrenadante al medio sólido Lowenstein-Jensen y se incubaron a 37 °C durante un mínimo de tres semanas para obtener un desarrollo moderado. Se realizaron confirmaciones genotípicas de resistencia frente a fármacos de rifampicina e isoniazida utilizando el ESL GenoType® MTBDR*plus* v2.0, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La confirmación fenotípica se realizó mediante el MP 7H10 para evaluar la resistencia frente a los fármacos de isoniazida, rifampicina, levofloxacina, capreomicina y kanamicina (Tabla 1), siguiendo los procedimientos establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute et al., 2011). Todo el trabajo de laboratorio relacionado con el cultivo de bacterias vivas se realizó en la instalación de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) del LRNM.

Tabla 1: Clasificación de fármacos y concentraciones críticas evaluadas a través del MP 7H10.

Fármacos antituberculosis	Abreviatura	MP 7H10 CC (µg/mL)
Primera línea		
Rifampicina	RIF	1
Isoniacida	INH	0.2
Segunda línea		
Kanamicina	KAN	5
Capreomicina	CAP	10
Levofloxacin	LEV	1

MP 7H10: método de proporciones en agar 7H10.

CC: Concentración crítica

4.3 Extracción de ADN y Secuenciamiento de Genoma Completo

Las extracciones de ADN genómico se realizaron utilizando el kit de purificación de ADN genómico GenJET (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La concentración de ADN bicatenario fue cuantificada utilizando el kit de ensayo Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific). Las librerías de secuenciamiento se prepararon utilizando 1 ng de cada muestra de ADN con el kit de preparación de librerías Nextera XT. Los procedimientos de secuenciamiento del genoma completo fueron realizados en el INS (Lima, Perú) utilizando la plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EE. UU.), generando lecturas de secuenciación de extremo pareado (*paired-end*) de 2x250 y 2x300 nucleótidos.

4.4 Análisis bioinformático

4.4.1 Control de calidad y limpieza de *reads*

La evaluación de la calidad de las lecturas de los extremos emparejados se realizó utilizando FastQC v0.11.9 (Andrews S., 2010). Se evaluó la

pureza de las lecturas específicas para las especies del complejo *M. tuberculosis*, utilizando un enfoque basado en k-mer, con Kraken2 v2.0.7 (Wood & Salzberg, 2014) y Bracken v2.2 (Lu et al., 2017). Posteriormente, los *reads* fueron filtrados con Trimmomatic v0.38 (Bolger et al., 2014) usando los valores predeterminados y una puntuación mínima de Phred de 20. Solo se conservaron los *reads* pareados para los análisis posteriores.

4.4.2 Ensamblaje, anotación y llamada de variantes

Los *reads* filtrados de los extremos pareados se mapearon contra el genoma de referencia H37Rv (número de acceso de GenBank: NC_000962.3) usando BWA v0.7.17 (H. Li & Durbin, 2010) (algoritmo *mem*). Se realizó la identificación y eliminación de secuencias duplicadas usando el paquete de herramientas Picard v2.18 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). La profundidad promedio y cobertura genómicas fueron determinadas utilizando los programas Samtools v1.9 (H. Li et al., 2009), Bedtools v2.29.0 (Quinlan & Hall, 2010) y un script en el paquete estadístico R (R Core Team, 2019) de diseño *in house*. Para la llamada de variantes (*variant calling*) se realizó una realineación local de los *reads* mapeados utilizando el algoritmo HaplotypeCaller, implementado en el programa GATK v3.8 (McKenna et al., 2010). Las variantes genómicas finales fueron obtenidas mediante un proceso de “*Hard-filtering*” utilizando el programa VCFtools v0.1.16 (Danecek et al., 2011) y según los siguientes parámetros: calidad de mapeo ≥ 60 , profundidad de variante $\geq 10X$ y frecuencia de alelo variante $\geq 0,75$. Se descartaron las variantes identificadas en regiones repetitivas (familias génicas PE, PPE y PE-PGRS). Las variantes seleccionadas se anotaron usando el programa SnpEff v4.3T (Cingolani et al., 2012). Finalmente, se generaron secuencias fastas incluyendo los SNPs contenidos en todo el genoma.

4.4.3 Marcadores de resistencia genética

Se evaluaron los genes asociados a la resistencia fenotípica frente a los fármacos de rifampicina (*rpoB*, *rpoC*, *rpoA*), isoniazida (*katG*, *inhA*, *mabA*, *kasA*, *furA*, *ndh*, *mshA*, *nat* y *oxyR*-región *ahpC*), levofloxacin (*gyrA*, *gyrB*) y medicamentos inyectables de segunda línea (*rrs*, *eis*, *tlyA*). Las variantes fueron seleccionadas teniendo como punto de corte una frecuencia alélica de variante de al menos 0.10 para los respectivos genes. Las variantes genéticas de resistencia fueron confirmadas visualmente utilizando el programa Artemis v18.1 (Carver et al., 2012). Las variantes genéticas filtradas fueron comparadas con las informadas en el catálogo de mutaciones de la OMS del año 2021, mientras que la confianza de asociación fue calificada en función de la guía técnica de mutaciones asociadas con la resistencia informada por la OMS del año 2018 (World Health Organization, 2018b).

4.4.4 Tipificación

Se realizó la determinación *in silico* de linajes y sublinajes de MTB a través del programa Kvarq v0.12.2 (Steiner et al., 2014), mediante la utilización del conjunto de SNPs propuesto por Coll et al (Coll et al., 2014). La determinación de genotipos de familias se realizó mediante la detección *in silico* de 43 espaciadores únicos en el locus de repetición directa (DR) utilizando el programa SpoTyping v2.0 (Xia et al., 2016). Luego, se analizó la presencia o ausencia de estos espaciadores en la base de datos SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>) para la determinación del correspondiente 'Spoligo-International-Type' (SIT).

4.4.5 Análisis evolutivo

Se realizó la inferencia evolutiva de las cepas TB-XDR mediante la creación de un árbol filogenómico de máxima probabilidad a partir de los SNPs concatenados de todo el genoma utilizando el programa RAxML-NG v0.9.0 (Kozlov et al., 2019). Para la partida se utilizaron 25 árboles

aleatorios y 25 basados en parsimonia. El soporte de las ramas fue establecido utilizando 1000 réplicas de bootstrap no paramétricos. Se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica “*General Time Reversible*” (GTR) basado en el criterio de información de Akaike obtenido en el programa jModelTest2 (Darriba et al., 2012). Se utilizó como grupo externo una cepa del "Lineage 7" de MTB (SRA ID: ERR181435). Adicionalmente se seleccionaron 221 cepas TB-XDR procedentes de diversas partes del mundo, cuya información de secuenciamiento se encuentra almacenada en los repositorios del 'Archivo Europeo de Nucleótidos' (ENA) y del 'Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI) (Tabla 2, Anexo 1).

Tabla 2: Procedencia de las cepas TB-XDR extranjeras utilizadas en el estudio.

Continente	País	N (%)
África	Sudáfrica	100 (45.2)
	Mozambique	1 (0.5)
Europa	Bielorrusia	60 (27.1)
	UK-Lituania	6 (2.7)
Asia	China	5 (2.3)
Europa-Asia	Rusia	43 (19.5)
	Georgia	1 (0.5)
América	Argentina	4 (1.8)
	Brasil	1 (0.5)
Total		221 (100)

4.4.6 Determinación de grupos de transmisión

Los grupos de transmisión genómica fueron determinados utilizando los SNP contenidos en todo el genoma. No se utilizaron datos epidemiológicos. La agrupación de cepas dentro de un mismo cluster fue realizada tomando como punto de corte una diferencia por pares (*pairwise difference*) no mayor de 10 SNPs. Este valor de corte fue preestablecido para un área de alta prevalencia de TB (Guerra-Assunção et al., 2015).

Las distancias genéticas fueron obtenidas a partir de comparaciones por pares utilizando el paquete Ape v5.4 (Paradis & Schliep, 2019) del programa R. La red de transmisión se construyó utilizando la función “SeqTrack” del paquete Adegenet v2.1.3 (Jombart, 2008) del programa R.

5. RESULTADOS

5.1 Confirmación genotípica y fenotípica

Los procesos de confirmación genotípicos y fenotípica determinaron que 68 (92%) cepas fueron reafirmadas como cepas TB-XDR, además de 5 (7%) de cepas que no lograron desarrollar, y una (1%) cepa que evidenció un perfil de resistencia de tipo TB-MDR. Los análisis posteriores fueron realizados utilizando solo las 68 cepas TB-XDR confirmadas. De entre éstas, todas presentaron resistencia simultánea a los medicamentos RIF, INH y LEV; sin embargo, mostraron diferencias en la resistencia a los aminoglicósidos. De este modo, 11 (16.2%) presentaron solo resistencia a kanamicina, 14 (20.6%) presentaron solo resistencia a capreomicina, y 43 (63.2%) presentaron resistencia simultánea a ambos fármacos (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados de confirmación genotípica (ESL GenoType MTBDR_{plus}) y fenotípica (MP 7H10). Entre paréntesis se especifican las concentraciones críticas (µg/mL) usadas para cada fármaco evaluado mediante el MP 7H10.

Código	Año	Procedencia	ESL		MP 7H10						
			RIF	INH	RIF (1.0)	INH (0.2)	INH (1.0)	KAN (5.0)	CAP (10.0)	LEV (1.0)	
XDR-01	2011	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-02	2011	CALLAO	R	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-03	2011	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-04	2011	CALLAO	R	R	R	R	R	R	S	R	R
XDR-05	2011	LA LIBERTAD	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-06	2012	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-07	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-08	2012	LIMA	R	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-09	2013	ICA	R*	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-10	2013	AREQUIPA	R	R	R	R	R	S	R	R	R

XDR-11	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-12	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	S	R
XDR-13	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-14	2013	CALLAO	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-15	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-16	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-17	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-18	2013	LIMA	R	R*	R	R	R	R	R	R	R
XDR-19	2013	LIMA	S	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-20	2013	LIMA	R	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-21	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-22	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-23	2013	LIMA	R	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-24	2014	LIMA	R*	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-25	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	S	R	R
XDR-26	2013	LIMA	R	R	R	R	R	R	S	R	R
XDR-27	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-28	2013	LIMA	R*	S	R	R	R	R	R	R	R
XDR-29	2014	ICA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-30	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-31	2014	LIMA	R	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-32	2014	LIMA	R*	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-33	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-34	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-35	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-36	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	S	R	R
XDR-37	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-38	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-39	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-40	2014	LIMA	R	R	R	R	S	S	R	R	R
XDR-41	2014	LIMA	R*	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-42	2014	ANCASH	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-43	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-44	2014	CALLAO	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-45	2014	UCAYALI	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-46	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-47	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	S	R	R
XDR-48	2014	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-49	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-50	2015	LIMA	R*	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-51	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-52	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-53	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-54	2015	CALLAO	R	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-55	2015	ICA	R	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-56	2015	CALLAO	R	R	R	R	R	R	S	R	R
XDR-57	2015	LIMA	R	R	R	R	R	S	R	R	R

XDR-58	2015	LIMA	R	R	R	R	R	S	R	R
XDR-59	2015	CALLAO	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-60	2015	LIMA	R	R*	R	R	S	R	S	R
XDR-61	2015	LIMA	R*	R	R	R	R	S	R	R
XDR-62	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-63	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	S	R
XDR-64	2015	PIURA	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR-65	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	S	R
XDR-66	2015	LORETO	R	R	R	R	S	R	R	R
XDR-67	2015	LIMA	R	R	R	R	R	R	S	R
XDR-68	2015	MADRE DE DIOS	R	R	R	R	R	R	R	R

MP 7H10: método de proporciones en agar 7H10.

R: resistencia fenotípica.

S: sensibilidad fenotípica.

ESL: ensayo de sonda en línea (GenoType MTBDR*plus* v2).

* Resistencia inferida (solo ausencia de una banda de tipo *wild type*).

5.2 Valores epidemiológicos

La mayor parte de cepas TB-XDR confirmadas fueron obtenidas en el año 2014 (n=23, 33.8%), seguido de aquellas aisladas en el año 2015 (n=20, 29.4%), en el año 2013 (n=18, 26.5%), en el año 2011 (n=5, 7.4%) y en el año 2012 (n=2, 2.9%) (Tabla 5). Asimismo, 38 (55,9%) cepas fueron obtenidas inicialmente de hombres y 30 (44,1%) de mujeres. La edad de los pacientes osciló entre los 15 y los 78 años. Los valores centrales del cincuenta por ciento de las edades estaban entre 25,3 y 44,5 años, con un promedio de 36,3 años. De manera similar, 51 (75,0%) casos tenían antecedentes de tratamiento previo contra la tuberculosis y 15 (22,1%) no tenían antecedentes de tratamiento antituberculosis. Solo en dos casos no hubo registro de información de tratamiento previo (Tabla 4). 58 (85,3%) cepas procedieron de pacientes ubicados en Lima y Callao (51 de Lima y 7 de la provincia Callao). En cuanto a las cepas de Lima, 30 (59%) procedieron de la zona este (Lima este), 16 (31%) del centro y norte (Lima ciudad), 3 (6%) del sur (Lima sur) y 2 (4%) de las afueras de la ciudad (provincias de Lima) (Figura 4). Respecto a las otras regiones Piura, Loreto, Arequipa, La

Libertad, Ancash, Ucayali y Madre de Dios estuvieron representadas con una cepa cada una, mientras que la región Ica con dos cepas (Tabla 5).

Tabla 4: Características de los pacientes.

Características	N	(%)
Sexo		
Masculino	38	(55.9)
Femenino	30	(44.1)
Antecedente de tratamiento		
Antes tratado	51	(75,0)
Nunca tratado	15	(22.1)
Desconocido	2	(2.9)
Edad		
≤15 años	1	(1.5)
16-30 años	24	(35.3)
31-45 años	25	(36.8)
>45 años	16	(23.5)
Desconocido	2	(2.9)
Promedio [RIC]	36.3	[25-45]

RIC: Rango intercuartílico

Tabla 5: Lugar de procedencia de las cepas TB-XDR confirmadas.

Código	Año	Departamento	Distrito	Diresa
XDR-01	2011	LIMA	ATE	LIMA ESTE
XDR-02	2011	CALLAO	CALLAO	CALLAO
XDR-03	2011	LIMA	ATE	LIMA ESTE
XDR-04	2011	CALLAO	CALLAO	CALLAO
XDR-05	2011	LA LIBERTAD	TRUJILLO	LA LIBERTAD
XDR-06	2012	LIMA	LA VICTORIA	LIMA CIUDAD
XDR-07	2013	LIMA	BARRANCA	LIMA PROVINCIAS
XDR-08	2012	LIMA	RIMAC	LIMA CIUDAD
XDR-09	2013	ICA	ICA	ICA
XDR-10	2013	AREQUIPA	AREQUIPA	AREQUIPA
XDR-11	2013	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-12	2013	LIMA	RIMAC	LIMA ESTE

XDR-13	2013	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-14	2013	CALLAO	CALLAO	CALLAO
XDR-15	2013	LIMA	SAN MARTIN DE PORRES	LIMA CIUDAD
XDR-16	2013	LIMA	ATE	LIMA ESTE
XDR-17	2013	LIMA	PUENTE PIEDRA	LIMA CIUDAD
XDR-18	2013	LIMA	SANTIAGO DE SURCO	LIMA CIUDAD
XDR-19	2013	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-20	2013	LIMA	ATE	LIMA ESTE
XDR-21	2013	LIMA	ATE	LIMA ESTE
XDR-22	2013	LIMA	CHACLACAYO	LIMA ESTE
XDR-23	2013	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-24	2014	LIMA	SANTA ANITA	LIMA ESTE
XDR-25	2014	LIMA	LA VICTORIA	LIMA CIUDAD
XDR-26	2013	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-27	2014	LIMA	SAN MARTIN DE PORRES	LIMA CIUDAD
XDR-28	2013	LIMA	PUENTE PIEDRA	LIMA CIUDAD
XDR-29	2014	ICA	ICA	ICA
XDR-30	2014	LIMA	LOS OLIVOS	LIMA CIUDAD
XDR-31	2014	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA CIUDAD
XDR-32	2014	LIMA	LA VICTORIA	LIMA CIUDAD
XDR-33	2014	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-34	2014	LIMA	COMAS	LIMA CIUDAD
XDR-35	2014	LIMA	COMAS	LIMA CIUDAD
XDR-36	2014	LIMA	SANTA ANITA	LIMA ESTE
XDR-37	2014	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-38	2014	LIMA	CARABAYLLO	LIMA CIUDAD
XDR-39	2014	LIMA	VILLA MARIA DEL TRIUNFO	LIMA SUR
XDR-40	2014	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-41	2014	LIMA	LA VICTORIA	LIMA ESTE
XDR-42	2014	ANCASH	ANCASH	ANCASH
XDR-43	2014	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-44	2014	CALLAO	CALLAO	CALLAO
XDR-45	2014	UCAYALI	UCAYALI	UCAYALI
XDR-46	2014	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-47	2014	LIMA	LIMA	LIMA CIUDAD
XDR-48	2014	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-49	2015	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-50	2015	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-51	2015	LIMA	HUARAL	LIMA PROVINCIAS
XDR-52	2015	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-53	2015	LIMA	SAN JUAN DE LURIGANCHO	LIMA ESTE
XDR-54	2015	CALLAO	CALLAO	CALLAO
XDR-55	2015	ICA	ICA	ICA
XDR-56	2015	CALLAO	VENTANILLA	CALLAO
XDR-57	2015	LIMA	EL AGUSTINO	LIMA ESTE
XDR-58	2015	LIMA	ATE	LIMA ESTE

XDR-59	2015	CALLAO	CALLAO	CALLAO
XDR-60	2015	LIMA	ATE	LIMA CIUDAD
XDR-61	2015	LIMA	SANTA ANITA	LIMA ESTE
XDR-62	2015	LIMA	VILLA EL SALVADOR	LIMA SUR
XDR-63	2015	LIMA	ATE	LIMA ESTE
XDR-64	2015	PIURA	PIURA	PIURA
XDR-65	2015	LIMA	CHORRILLOS	LIMA SUR
XDR-66	2016	LORETO	LORETO	LORETO
XDR-67	2015	LIMA	ATE	LIMA ESTE
XDR-68	2016	MADRE DE DIOS	MADRE DE DIOS	MADRE DE DIOS

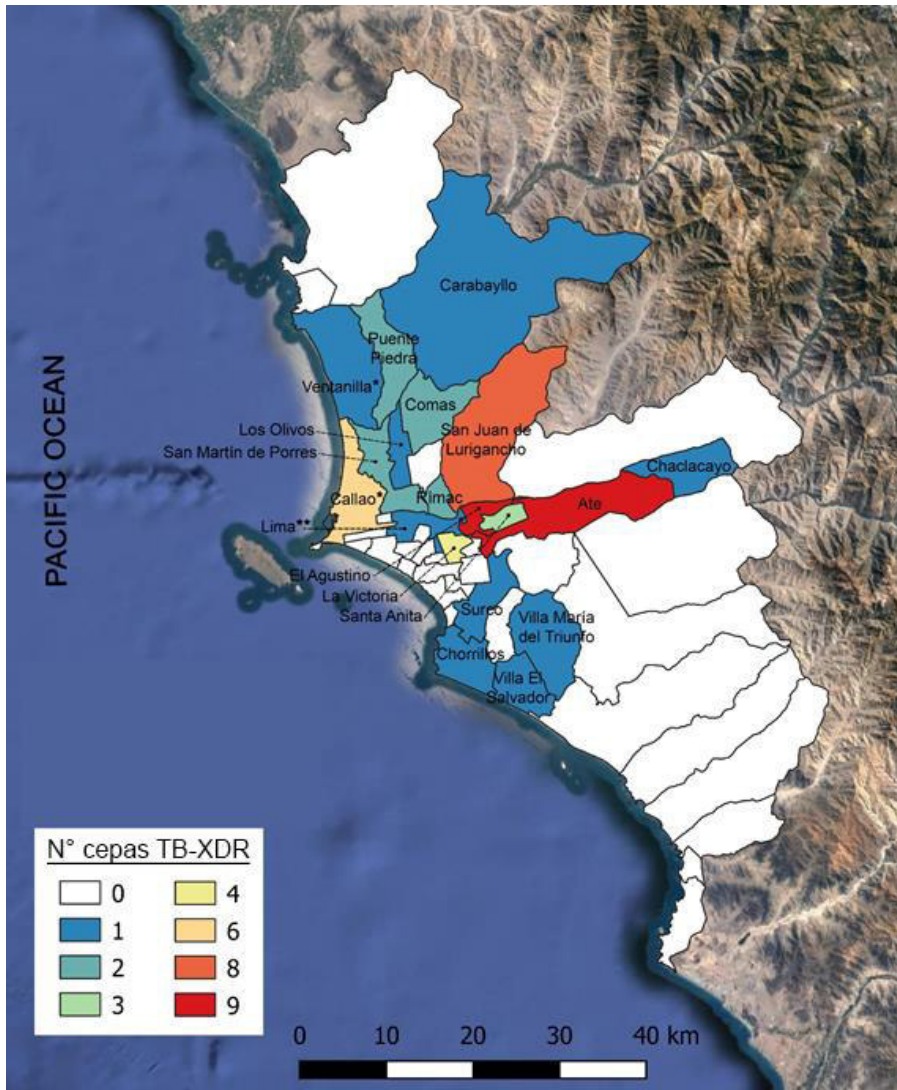


Figura 4: Distritos con cepas de TB-XDR en la región Lima y la provincia del Callao. Todas las cepas de TB-XDR de estos lugares se distribuyeron en 19 distritos (que se muestran en la figura) y 2 provincias adicionales (que no se muestran). * Distritos de la provincia del Callao. ** Distrito de Lima. Mapa generado con QGIS v3.14.15 (<http://www.qgis.org>).

5.3 Evaluación de secuenciamiento y ensamblaje genómico

En promedio se obtuvieron 1'800,229 reads filtrados de alta calidad por cada cepa secuenciada. Se generaron dos archivos comprimidos Fastq.gz (*Forward* y *Reverse*) por cada muestra. El análisis de pureza determinó que el 100% de cepas secuenciadas correspondieron a aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*. En promedio el 99.5% de reads lograron ser efectivamente mapeados contra el genoma referencial H37Rv. La profundidad promedio genómica mínima, máxima y media de secuenciación obtenida fue 46X, 139X y 77X, respectivamente. Todas las cepas presentaron una cobertura genómica mayor o igual al 99% (Tabla 6).

Tabla 6: Métricas de secuenciamiento y mapeo genómico.

Código	Archivo <i>Forward</i> (Mb)	Archivo <i>Reverse</i> (Mb)	Reads de alta calidad ^a	Reads mapeados (%) ^b	Reads pareados (%) ^c	Profundidad genómica promedio	Cobertura genómica ^d
XDR-01	241	267	2908345	2894140 (99.5)	2861780 (98.9)	119	99%
XDR-02	175	194	2142723	2133398 (99.6)	2107097 (98.8)	85	99%
XDR-03	195	209	2160474	2154452 (99.7)	2132046 (99)	95	99%
XDR-04	104	111	1134354	1128879 (99.5)	1114977 (98.8)	47	99%
XDR-05	270	303	3427494	3409296 (99.5)	3368817 (98.8)	138	99%
XDR-06	188	199	2194774	2184356 (99.5)	2162305 (99)	91	99%
XDR-07	103	115	1133801	1117363 (98.6)	1105813 (99)	52	99%
XDR-08	156	170	1682628	1676721 (99.6)	1657211 (98.8)	75	99%
XDR-09	112	126	1149434	1143313 (99.5)	1129549 (98.8)	56	99%
XDR-10	130	146	1464944	1456903 (99.5)	1441957 (99)	67	99%
XDR-11	100	111	1102993	1098117 (99.6)	1085053 (98.8)	51	99%
XDR-12	107	120	1194424	1188401 (99.5)	1173839 (98.8)	54	99%

XDR-13	151	171	1691991	1684230 (99.5)	1665082 (98.9)	76	99%
XDR-14	109	122	1187983	1183879 (99.7)	1171356 (98.9)	56	99%
XDR-15	104	119	1168541	1161502 (99.4)	1148536 (98.9)	53	99%
XDR-16	181	201	2029470	2021951 (99.6)	2001086 (99)	93	99%
XDR-17	168	189	1969416	1959995 (99.5)	1940872 (99)	88	99%
XDR-18	180	188	1699073	1686677 (99.3)	1662582 (98.6)	71	99%
XDR-19	113	127	1282939	1275306 (99.4)	1262800 (99)	58	99%
XDR-20	126	141	1412588	1405527 (99.5)	1391905 (99)	64	99%
XDR-21	188	199	1901225	1892859 (99.6)	1864897 (98.5)	78	99%
XDR-22	118	135	1215972	1211800 (99.7)	1197527 (98.8)	60	99%
XDR-23	144	150	1382927	1374826 (99.4)	1354346 (98.5)	57	99%
XDR-24	114	121	1277082	1269610 (99.4)	1257771 (99.1)	53	99%
XDR-25	95	108	1024989	1019341 (99.4)	1007851 (98.9)	50	99%
XDR-26	181	180	1665493	1653682 (99.3)	1625559 (98.3)	63	99%
XDR-27	108	115	1353465	1345831 (99.4)	1332121 (99)	50	99%
XDR-28	201	224	2653788	2637895 (99.4)	2609940 (98.9)	99	99%
XDR-29	272	320	3312184	3303399 (99.7)	3263173 (98.8)	139	99%
XDR-30	147	176	1653828	1644533 (99.4)	1624598 (98.8)	80	99%
XDR-31	186	211	2155290	2146438 (99.6)	2118587 (98.7)	92	99%
XDR-32	200	230	2276302	2270129 (99.7)	2241122 (98.7)	99	99%
XDR-33	129	136	1505275	1498641 (99.6)	1486265 (99.2)	60	99%
XDR-34	251	295	2511830	2497378 (99.4)	2466654 (98.8)	114	99%
XDR-35	118	124	1491123	1482672 (99.4)	1468663 (99.1)	55	99%
XDR-36	109	118	1306239	1300956 (99.6)	1287427 (99)	51	99%
XDR-37	136	144	1598627	1590817 (99.5)	1573354 (98.9)	64	99%
XDR-38	110	119	1300886	1292939 (99.4)	1280015 (99)	51	99%
XDR-39	154	165	1857470	1847091 (99.4)	1827799 (99)	73	99%

XDR-40	113	128	1253738	1247368 (99.5)	1236995 (99.2)	60	99%
XDR-41	162	185	1808342	1798549 (99.5)	1779599 (98.9)	83	99%
XDR-42	140	141	1332121	1323976 (99.4)	1307454 (98.8)	53	99%
XDR-43	95	110	1023796	1019175 (99.5)	1007841 (98.9)	51	99%
XDR-44	114	127	1229397	1225834 (99.7)	1213698 (99)	58	99%
XDR-45	215	247	2565482	2553045 (99.5)	2520282 (98.7)	107	99%
XDR-46	263	303	2160802	2150947 (99.5)	2128501 (99)	124	99%
XDR-47	169	186	1890181	1878074 (99.4)	1852719 (98.6)	78	99%
XDR-48	188	225	2774310	2763553 (99.6)	2729447 (98.8)	112	99%
XDR-49	237	267	2977868	2965618 (99.6)	2927677 (98.7)	114	99%
XDR-50	90	108	1235752	1226794 (99.3)	1211112 (98.7)	46	99%
XDR-51	246	260	3086978	3072279 (99.5)	3039552 (98.9)	122	99%
XDR-52	116	130	1261208	1253389 (99.4)	1242056 (99.1)	56	99%
XDR-53	150	168	1612289	1600565 (99.3)	1586245 (99.1)	72	99%
XDR-54	142	143	1325597	1315526 (99.2)	1295442 (98.5)	54	99%
XDR-55	152	171	1631273	1621459 (99.4)	1607044 (99.1)	76	99%
XDR-56	123	135	1260013	1251086 (99.3)	1240058 (99.1)	57	99%
XDR-57	181	192	2054602	2044458 (99.5)	2025285 (99.1)	82	99%
XDR-58	214	237	2382731	2371932 (99.5)	2351658 (99.1)	109	99%
XDR-59	119	132	1242883	1234272 (99.3)	1223296 (99.1)	56	99%
XDR-60	110	124	1189275	1182405 (99.4)	1171678 (99.1)	52	99%
XDR-61	123	137	1342054	1332951 (99.3)	1322189 (99.2)	58	99%
XDR-62	134	149	1392204	1382601 (99.3)	1369874 (99.1)	64	99%
XDR-63	188	206	2306268	2297588 (99.6)	2279055 (99.2)	107	99%
XDR-64	160	178	1711905	1699543 (99.3)	1683395 (99)	76	99%
XDR-65	228	263	2802041	2789108 (99.5)	2752658 (98.7)	115	99%
XDR-66	230	267	2715659	2702551 (99.5)	2670399 (98.8)	116	99%

XDR-67	200	228	2401583	2390951 (99.6)	2361884 (98.8)	100	99%
XDR-68	231	275	2862808	2847821 (99.5)	2813185 (98.8)	117	99%

- ^a Número de reads de alta calidad obtenidos luego del proceso de limpieza y selección con Trimomatic.
- ^b Número de reads que lograron ser mapeados al genoma referencial H37Rv. Entre paréntesis se especifica el porcentaje de reads mapeados respecto al total de reads de alta calidad.
- ^c Número de reads ‘apropiadamente pareados’ (reads forward y reverse con orientación contraria y separados por un tamaño de inserción entre 200-400 nucleótidos). Entre paréntesis se especifica el porcentaje de reads apropiadamente apareados respecto al total de reads mapeados.
- ^d Se toman en cuenta las posiciones con al menos 5 reads de cobertura.

5.4 Resistencia antimicrobiana

Todas las cepas mostraron resistencia fenotípica simultánea a rifampicina, isoniazida y levofloxacin. Sin embargo, mostraron diferencias en la resistencia a fármacos inyectables de segunda línea, 11 (16,2%) presentaron resistencia fenotípica solo para kanamicina, 14 (20,6%) solo para capreomicina y 43 (63,2%) para ambos fármacos. Se evidenciaron resultados discordantes para la isoniazida (XDR-28) y la rifampicina (XDR-19) mostrando solo resultados de resistencia a través del método fenotípico (Tabla 3). Respecto a la resistencia a rifampicina, todas las cepas presentaron mutaciones localizadas en el gen *rpoB*. De estos, 67 (98,5%) presentaron mutaciones de alta confiabilidad ubicadas dentro de la región determinante de la resistencia a rifampicina (RRDR) del gen *rpoB*, mientras que solo uno (1,5%) presentó una mutación fuera de esta región. Las mutaciones más representativas fueron S450L, D435V y H445R. Solo una cepa presentó la doble mutación H445N + S431R. Los fenotipos resistentes a isoniazida se debieron a la presencia de mutaciones en los genes *katG* e *inhA*. El gen *KatG* presentó solo una mutación (S315T), mientras que el gen *inhA* presentó tres mutaciones diferentes localizadas en su región promotora (g-17t, c-15t y t-8c) y una mutación localizada en la región codificante (S94A).

Se evidenciaron cuatro cepas que presentaron la doble mutación, *katG_S315T + inhA_c-15t*, y una que presentó *katG_S315T + inhA_t-8c* (Tabla 7).

Tabla 7: Lista de mutaciones asociadas a resistencia frente a fármacos de primera línea detectadas en cepas peruanas de TB-XDR. Los sistemas de numeración de codones están de acuerdo con el genoma H37Rv (NC_000962.3).

Fármaco	Gen	Mutación*	Confianza de asociación **	Categoría OMS ***	N (%)	
Rifampicina	<i>rpoB</i>	S450L	Alta	Asociado con resistencia	38 (55.9)	
		D435V	Alta	Asociado con resistencia	22 (32.4)	
		H445R	Alta	Asociado con resistencia	4 (5.9)	
		Q432P	Alta	Asociado con resistencia	1 (1.5)	
		H445N, S431R	Mínima	Asociado con resistencia, 'Asociado con resistencia – provisional'	1 (1.5)	
		H445S	Sin datos	Asociado con resistencia	1 (1.5)	
		I491F	Mínima	Asociado con resistencia	1 (1.5)	
Isoniacida	<i>katG</i>	S315T	Alta	Asociado con resistencia	53 (77.9)	
		<i>inhA</i>	c-15t	Moderada	Asociado con resistencia	7 (10.3)
			g-17t	Sin datos	Asociación incierta	2 (2.9)
			S94A	Sin datos	Asociación incierta	1 (1.5)
	<i>katG + inhA</i>	S315T + c-15t	Alta	Asociado con resistencia + Asociado con resistencia	4 (5.9)	
		S315T + t-8c	Alta	Asociado con resistencia + 'Asociado con resistencia – provisional'	1 (1.5)	

* AGC → ACC.

** Según la guía técnica de la OMS para el uso del NGS en el diagnóstico de la TB (World Health Organization, 2018b).

*** Según el Catálogo de la OMS de mutaciones asociadas a resistencia en TB, 2021 (World Health Organization, 2021b).

La resistencia a levofloxacin fue causada principalmente por mutaciones que ocurrieron en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR)

del gen *gyrA* y se identificaron nueve mutaciones diferentes, mientras que el gen *gyrB* mostró solo tres diferentes mutaciones. En el gen *gyrA*, el codón 94 mostró la mayor variabilidad (cinco mutaciones diferentes). Solo dos cepas presentaron mutaciones en ambos genes. Finalmente, una cepa (1,5%) no mostró mutaciones en ninguno de estos genes. El análisis de la resistencia a los fármacos inyectables de segunda línea mostró que la resistencia a la kanamicina y la capreomicina estuvo causada por mutaciones que se produjeron en los genes *rrs* (a1401g, c1402t y g1484t), *tlyA* (todos los cambios de marco) y *eis* (c-14t). Sin embargo, no se detectaron mutaciones en dos cepas para los genes analizados. Las cepas con resistencia exclusiva a kanamicina solo mostraron la mutación *rrs_a1401g*, mientras que dos cepas no presentaron mutación en ninguno de los tres genes analizados. La resistencia exclusiva a la capreomicina fue causada por varias mutaciones que se produjeron en el gen *tlyA*, provocando deslizamientos del marco de lectura. Sin embargo, hubo tres cepas sin mutaciones detectadas en ninguno de los genes analizados (Tabla 8).

Varias mutaciones que ocurrieron en el resto de los genes inspeccionados se presentaron de manera simultánea junto con las mutaciones previamente descritas (Anexo 2).

Tabla 8: Lista de mutaciones asociadas a resistencia frente a fármacos de segunda línea detectadas en cepas peruanas de TB-XDR. Los sistemas de numeración de codones están de acuerdo con el genoma H37Rv (NC_000962.3). *fs*: desplazamiento del marco de lectura, *dup*: duplicación génica.

Fármaco	Gen	Mutación	Confianza de asociación *	Categoría OMS **	N (%)
Levofloxacina	<i>gyrA</i>	D94G	Alta	Asociado con resistencia	32 (47.1)
		A90V	Alta	Asociado con resistencia	13 (19.1)
		D94N	Alta	Asociado con resistencia	5 (7.4)
		D94H	Sin datos	Asociado con resistencia	3 (4.4)
		G88C	Alta	Asociado con resistencia	2 (2.9)
		S91P	Alta	Asociado con resistencia	2 (2.9)
		D94A	Alta	Asociado con resistencia	2 (2.9)
		D94Y	Alta	Asociado con resistencia	1 (1.5)
		A90V, D94H	Alta	Asociados con resistencia	1 (1.5)

		D94N, D94G	Alta	Asociados con resistencia	1 (1.5)
		D94N, D94A	Alta	Asociados con resistencia	1 (1.5)
	<i>gyrB</i>	S447F	Sin datos	Asociación incierta	2 (2.9)
	<i>gyrA</i> + <i>gyrB</i>	G88A + T500P	Sin datos	Asociado con resistencia - provisional' + Asociación incierta	1 (1.5)
		D94A + E501D	Alta	Asociado con resistencia + 'Asociado con resistencia - provisional'	1 (1.5)
		Mutación no detectada			1 (1.5)
Kanamicina y capreomicina	<i>rrs</i>	a1401g	Alta	Asociado con resistencia	34 (50.0)
		c1402t	Alta	Asociado con resistencia	1 (1.5)
		g1484t	Alta	Asociado con resistencia	1 (1.5)
	<i>tlyA</i>	S92fs	Gral. alta	Sin datos	2 (2.9)
		A111fs	Gral. alta	Sin datos	1 (1.5)
		H68fs, S92fs, Q202fs	Gral. alta	Sin datos	1 (1.5)
		<i>rrs</i> + <i>eis</i> + <i>tlyA</i>	a1401g + c-14t + R60fs	Alta	Asociado con resistencia
		Mutación no detectada			2 (2.9)
Kanamicina	<i>rrs</i>	a1401g	Alta	Asociado con resistencia	9 (13.2)
	Mutación no detectada			2 (2.9)	
Capreomicina	<i>tlyA</i>	V198fs	Gral. alta	Sin datos	4 (5.9)
		G232D	Gral. alta	Asociado con resistencia - provisional	2 (2.9)
		L209dup	Gral. alta	Sin datos	1 (1.5)
		C86fs	Gral. alta	Sin datos	1 (1.5)
		S252fs	Gral. alta	Sin datos	1 (1.5)
		R133fs, L209dup	Gral. alta	Sin datos	1 (1.5)
		L139fs, V198fs	Gral. alta	Sin datos	1 (1.5)
		Mutación no detectada			3 (4.4)

* Según la guía técnica de la OMS para el uso del NGS en el diagnóstico de la TB (World Health Organization, 2018b)

** Según el Catálogo de la OMS de mutaciones asociadas a resistencia en TB, 2021 (World Health Organization, 2021b).

5.5 Linajes y relaciones evolutivas

El análisis de Linajes determinó que 62 (91%) cepas TB-XDR pertenecieron al linaje Euro-americano (Linaje 4) y 6 (9%) al linaje de Este-asiático (Linaje 2). Además, 59 cepas del linaje 4 pudieron clasificarse en seis distintos sublinajes, mientras que los tres restantes solo pudieron asignarse como pertenecientes al linaje 4. Todas las cepas del linaje 2 estuvieron representadas por el sublinaje 2.2.1. Cinco cepas del Linaje 2 procedieron de la región Lima, mientras que la cepa restante circuló en la provincia del Callao (Figura 5).

El análisis de spoligotipos determinó la presencia de 16 cepas pertenecientes a la familia Haarlem (genotipo H1/SIT47 [n=9; 13,2%], genotipo H1/SIT62 [n=1; 1,5%], genotipo H3/SIT3001 [n=6; 8,8%]), 18 cepas pertenecientes a la familia LAM (genotipo LAM/SIT1355 [n=10; 14,7%], genotipo LAM1/SIT469 [n=3; 4,4%], genotipo LAM5/SIT93 [n=2; 2,9%], genotipo LAM5/SIT1160 [n=1; 1,5%], genotipo LAM9/SIT42 [n=2; 2,9%]), 14 cepas pertenecientes a la familia T (genotipo T1/SIT53 [n=6; 8,8%], genotipo T1/SIT219 [n=2; 2,9%], genotipo T1/SIT535 [n=1; 1,5%], genotipo T2/SIT52 [n=5; 7,4%]), 6 cepas pertenecientes a la familia X (genotipo X3/SIT91 [n=5; 7,4%], genotipo X3/SIT3780 [n=1; 1,5%]), y 6 cepas pertenecientes a la familia Beijing (genotipo Beijing/SIT1 [8,8%]). Asimismo, también se observó la presencia de un número reducido de cepas con spoligotipos huérfanos (n = 4; 4%) y desconocidos (n = 4; 4%) (Figura 5).

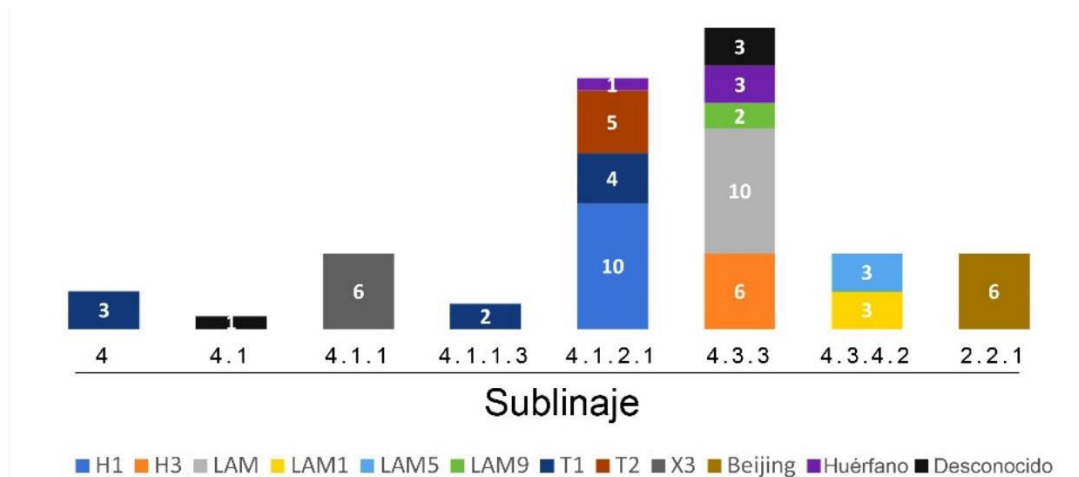


Figura 5: Distribución de familias génicas en los linajes MTB de las cepas peruanas TB-XDR. El número de cepas de cada familia se especifica dentro de las barras.

Respecto a la distribución geográfica, las cepas del norte del país correspondieron a La Libertad (genotipo 4.1.1.3/T1/SIT219; n=1), Piura (genotipo 4.1.1/X3/SIT91; n=1) y Loreto (genotipo 4.3.3/Huérfana; n=1). En el centro del país, las regiones de Lima, Ica y la provincia del Callao mostraron contener la mayor diversidad genética con respecto a todo el país, con seis, tres y cuatro sublinajes respectivamente. El resto de las regiones centrales fueron integradas por Ancash (genotipo 4.1.1/X3/SIT91; n=1) y Ucayali (genotipo 4.3.3/Desconocido/222; n=1). Finalmente, en el Sur del país se encontraron cepas pertenecientes a Arequipa (genotipo 4.1.1.3/T1/SIT219; n=1) y Madre de Dios (genotipo 4.1.2.1/H1/SIT62; n=1) (Figura 6, Anexo 3).

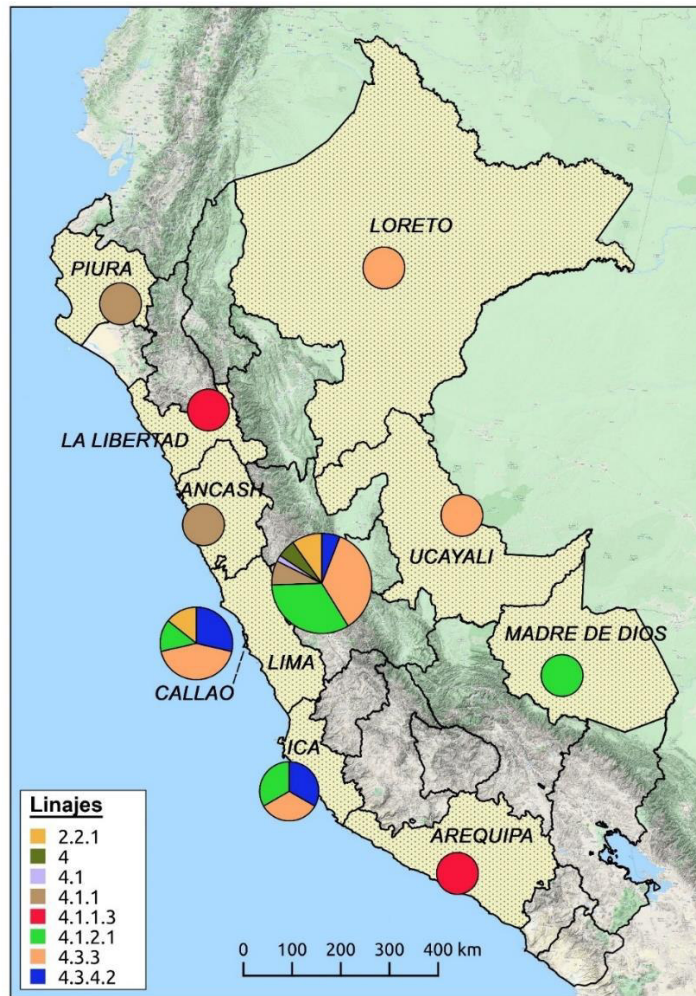


Figura 6: Distribución nacional de los linajes y sublinajes de las cepas TB-XDR. El área del círculo indica el número normalizado de cepas, $\text{Log}_{10}(n + 1)$, de cada uno de los diez lugares de procedencia.

El árbol filogenómico de máxima verosimilitud confirmó la clasificación de los sublinajes y mostró una subclasificación adicional para las cepas pertenecientes al mismo sublinaje. No se observó ninguna correlación entre los clados filogenómicos y las mutaciones específicas que confieren resistencia. Se encontró una estrecha relación evolutiva entre las cepas de Arequipa (XDR-10) y La Libertad (XDR-05), siendo las únicas representantes del sublinaje 4.1.1.3 en todo el país y exhibiendo un importante grado de diferenciación genómica con las demás cepas. (Figura 7). Los espoligotipos con SIT 'Huérfanos' y 'Desconocidos' pudieron ser caracterizados mediante el análisis evolutivo y la determinación *in silico* de linajes. Tres cepas con SIT

Finalmente, el análisis evolutivo global mostró que las cepas peruanas de TB-XDR se agruparon en diferentes clados monofiléticos y tenían una estrecha relación con las cepas de TB-XDR de los linajes 4 y 2 de los países europeos (Figura 8).

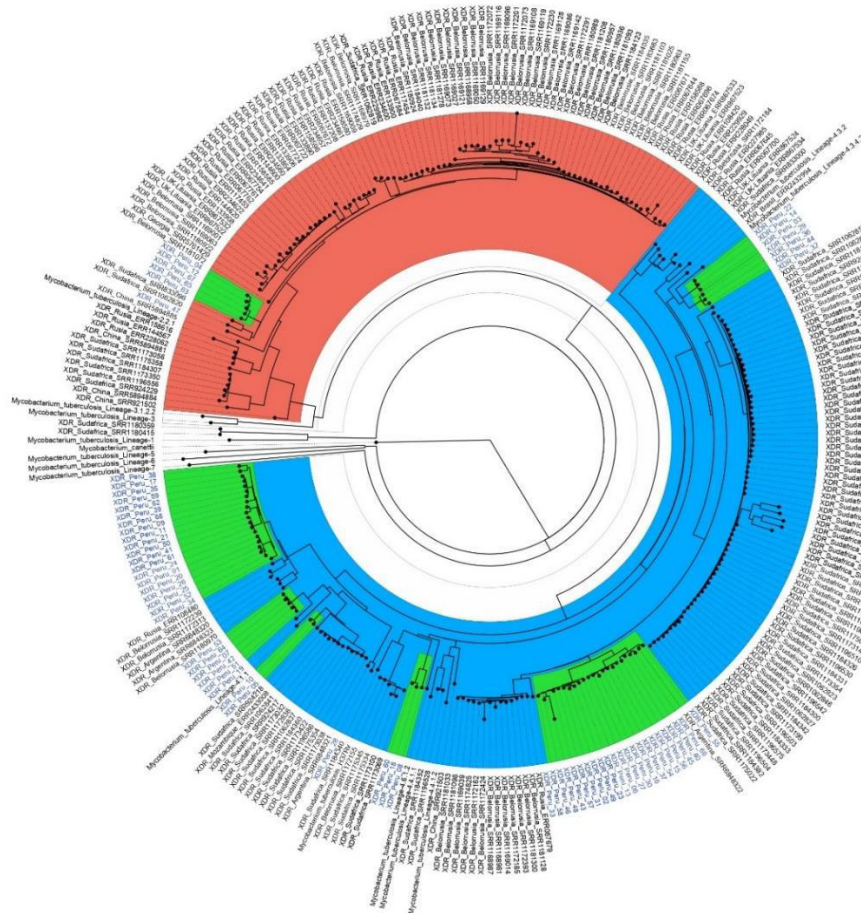


Figura 8: Árbol filogenómico global de 289 cepas TB-XDR pertenecientes a América del Sur, Europa, África y Asia. El árbol se construyó utilizando 16 798 SNPs contenidos en todo el genoma. Los grupos que contienen cepas peruanas se resaltan en verde. El árbol fue enraizado utilizando la cepa *Mycobacterium canettii* (GenBank, Access number: NC_019950.1). La figura fue creada usando FigTree v1.4.4 (<https://github.com/rambaut/figtree>).

5.6 Determinación del grupo de transmisión

El análisis de las diferencias genéticas por pares evidenció un alto número de cepas que diferían en grandes cantidades de SNPs. Se obtuvo una distancia genética mínima y máxima de 5 y 1272 SNPs, respectivamente. El

rango intercuartílico fue de 373 y la mediana de 772 SNPs (Anexo 5). De este modo, se determinó que la mayoría de las cepas no estaban relacionadas a nivel genético ya que solo 23 cepas conformaron nueve grupos de transmisión (tasa de agrupación del 34%). Cada grupo de transmisión comprendió entre dos y cinco cepas (Figura 9, Anexo 6). Los grupos estuvieron conformados principalmente por cepas del Linaje 4 (91,3 %). Los grupos más grandes estuvieron integrados por 5 cepas del sublinaje 4.3.3 (Grupo 5) y 4 cepas del sublinaje 4.1.2.1 (Grupo 4). El grupo 1 (sublinaje 4.1.1/X3/SIT91) y el grupo 8 (sublinaje 4.3.4.2/LAM1/SIT469) fueron integrados por cepas con sublinajes no presentes en los otros clusters y presentaron una distancia promedio al cluster más cercano de 525 SNPs. El resto de los grupos del Linaje 4 estuvieron integrados por cepas de los sublinajes 4.1.2.1 y 4.3.3. Así, los grupos 2 y 4 (sublinaje 4.1.2.1/H1/SIT47), y 3 (sublinaje 4.1.2.1/T2/SIT52) presentaron una distancia promedio entre ellos de 123,5 SNPs. Mientras que los grupos 5, 6 y 7 (sublinaje 4.3.3/LAM/SIT1355) presentaron una distancia promedio entre ellos de 17.5 SNPs. El grupo perteneciente al Linaje 2 (sublinaje 2.2.1/Beijing/SIT1) presentó una considerable distancia de 1198 SNPs con el grupo más cercano del Linaje 4 (Figura 9).

Respecto a los lugares de procedencia, todas las cepas agrupadas procedieron de la región Lima (n = 21) y la provincia del Callao (n = 2). En cuanto a las cepas de la región Lima, 17 pertenecieron a 'Lima este', una a 'Lima ciudad' (en la zona aledaña a 'Lima este'), dos a 'Lima sur' y una a 'Lima provincias'. En cuanto a la variabilidad de las fuentes de infección, los grupos 2 y 6 fueron conformados por cepas pertenecientes a un solo distrito de infección (Ate y El Agustino, respectivamente), mientras que el resto de los grupos fueron integrados por al menos dos distritos. El grupo con más integrantes (Grupo 5) estuvo integrado por cepas de los distritos limítrofes de El Agustino y San Juan de Lurigancho. Así mismo, el Grupo 4 estuvo conformado por cuatro cepas de los distritos geográficamente cercanos de La Victoria, Santa Anita y San Juan de Lurigancho. Los grupos restantes consistieron en solo dos cepas que provenían principalmente de distritos geográficamente separados (Figura 9).

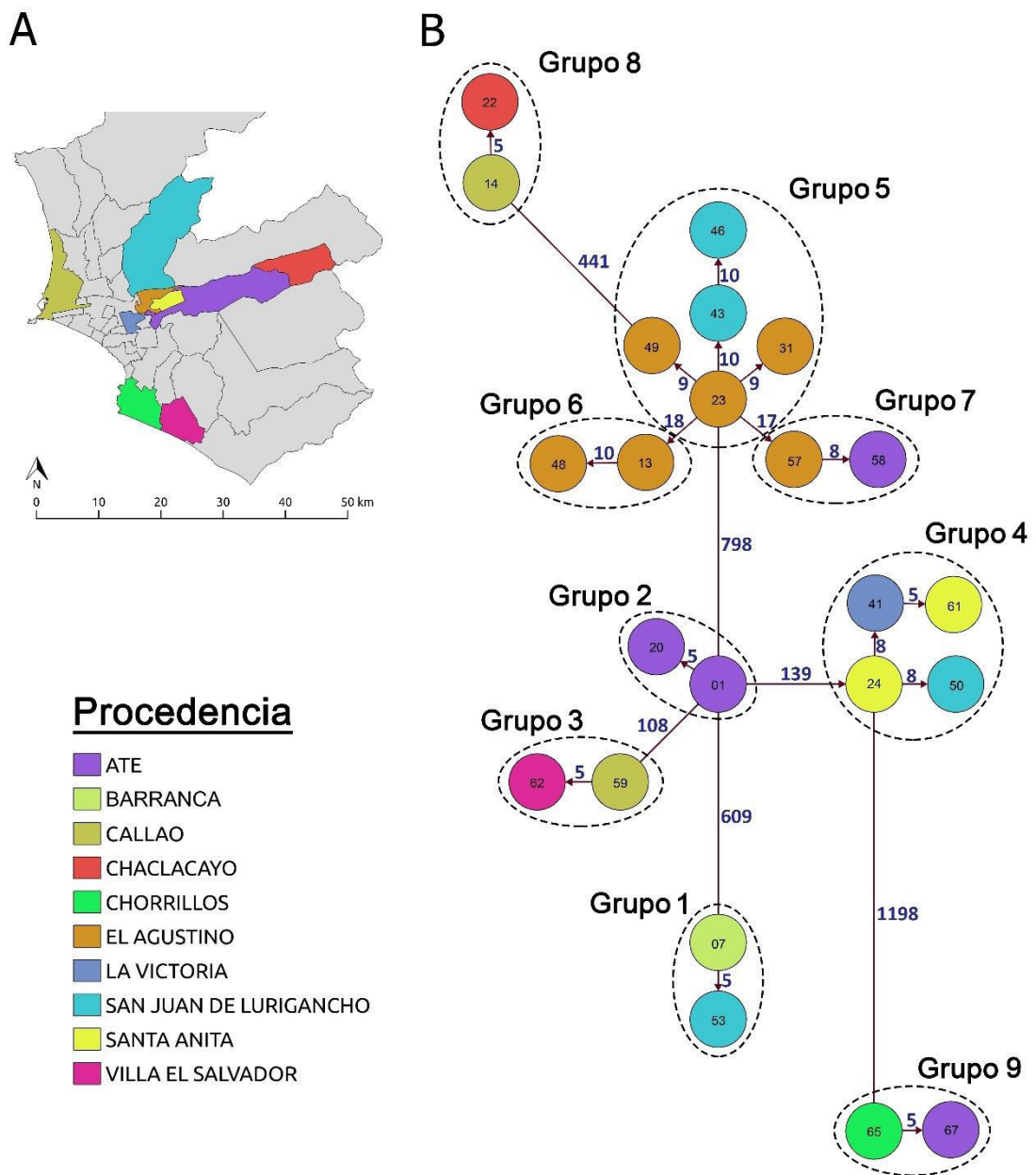


Figura 9: Análisis de grupos de transmisión de las cepas TB-XDR. **A)** Ubicaciones geográficas de los principales distritos de Lima y Callao anotadas con el origen de las cepas pertenecientes a los nueve grupos de transmisión (excepto Barranca que se ubica en las afueras de la ciudad de Lima). **B)** Red de transmisión inferida basada en distancias genéticas por pares (*pairwise*). Cada nodo representa una cepa TB-XDR. Las flechas indican la dirección probable de transmisión y el número de SNPs que separan las diferentes cepas dentro y entre grupos. La numeración de los nodos está de acuerdo con el formato “XDR- #” usadas en la tablas y figuras previas. Las ubicaciones geográficas y los colores de los nodos de A y B, respectivamente, están relacionados con la leyenda de procedencia.

Respecto a la farmacorresistencia, todas las cepas que conformaron un mismo grupo compartieron las mutaciones asociadas con la resistencia frente a isoniazida y rifampicina. Las 8 cepas que integraron los grupos 1, 2, 3 y 9 compartieron las mutaciones *katG_S315T* y *rpoB_S450L*, así mismo las 11 cepas que integraron los grupos 5, 6, 7 y 8 compartieron las mutaciones *katG_S315T* y *rpoB_D435V*. Finalmente, las cepas del Grupo 4 compartieron las mutaciones *rpoB_H445R*, *katG_S315T* e *inhA_c-15t*. En cuanto a la resistencia a fármacos de segunda línea, se evidenció que no todas las cepas que integran un solo grupo compartieron necesariamente el mismo tipo de mutaciones. Las 6 cepas que integran los grupos 1, 3 y 8 compartieron las mutaciones *gyrA_D94G* y *rrs_a1401g*. De manera similar, todas las cepas en el grupo 4 tenían las mutaciones *tlyA_V198fs* y *gyrA_A90V*. Sin embargo, los grupos 7 y 9 (n = 4) presentaron variaciones en las mutaciones de resistencia solo a levofloxacin. El Grupo 5 (n = 5) presentó variaciones en la resistencia solo a los inyectables de segunda línea y los grupos 2 y 6 (n = 4) presentaron variaciones para ambos tipos de medicamentos (Tabla 9).

Tabla 9: Información epidemiológica básica y de tipificación genética de las cepas TB-XDR genéticamente agrupadas. Se especifican las mutaciones que causan la resistencia fenotípica para los fármacos probados. **M:** masculino, **F:** femenino, **SIT:** spoligotype international type, **fs:** frameshift, **dup:** duplicación génica.

Grupo	Código	Sexo	Edad	Año	Red de Salud	Distrito	Rifampicina	Isoniacida	Kanamicina, capreomicina	Capreomicina	Levofloxacin	Sublinaje	Familia	SIT
Grupo 1	XDR-07	F	39	2013	Lima provincias	Barranca	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	4.1.1	X3	91
	XDR-53	M	35	2015	Lima este	San Juan de Lurigancho	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	4.1.1	X3	91
Grupo 2	XDR-01	F	27	2011	Lima este	Ate	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> G88C	4.1.2.1	H1	47
	XDR-20	M	36	2013	Lima este	Ate	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	-	<i>tlyA</i> C86fs	<i>gyrA</i> D94G	4.1.2.1	H1	47
Grupo 3	XDR-59	F	60	2015	Callao	Callao	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	4.1.2.1	T2	52
	XDR-62	F	21	2015	Lima sur	Villa El Salvador	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	4.1.2.1	T2	52
Grupo 4	XDR-24	M	78	2014	Lima este	Santa Anita	<i>rpoB</i> H445R	<i>katG</i> S315T + <i>inhA</i> c-15t	-	<i>tlyA</i> V198fs	<i>gyrA</i> A90V	4.1.2.1	H1	47
	XDR-41	M	50	2014	Lima centro	La Victoria	<i>rpoB</i> H445R	<i>katG</i> S315T + <i>inhA</i> c-15t	-	<i>tlyA</i> V198fs	<i>gyrA</i> A90V	4.1.2.1	H1	47
	XDR-50	M	na	2015	Lima este	San Juan de Lurigancho	<i>rpoB</i> H445R	<i>katG</i> S315T + <i>inhA</i> c-15t	-	<i>tlyA</i> V198fs	<i>gyrA</i> A90V	4.1.2.1	H1	47
	XDR-61	M	17	2015	Lima este	Santa Anita	<i>rpoB</i> H445R	<i>katG</i> S315T + <i>inhA</i> c-15t	-	<i>tlyA</i> V198fs	<i>gyrA</i> A90V	4.1.2.1	H1	47
Grupo 5	XDR-23	M	33	2013	Lima este	El Agustino	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	-	<i>tlyA</i> L209dup	<i>gyrA</i> D94G	4.3.3	LAM	1355
	XDR-49	M	33	2015	Lima este	El Agustino	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	-	-	<i>gyrA</i> D94G	4.3.3	LAM	1355
	XDR-31	M	16	2014	Lima este	El Agustino	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	-	<i>tlyA</i> L209dup	<i>gyrA</i> D94G	4.3.3	LAM	1355
	XDR-43	M	21	2014	Lima este	San Juan de Lurigancho	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	-	<i>tlyA</i> S92fs	<i>gyrA</i> D94G	4.3.3	LAM	1355
	XDR-46	M	24	2014	Lima este	San Juan de Lurigancho	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	-	<i>tlyA</i> S92fs	<i>gyrA</i> D94G	4.3.3	LAM	1355
Grupo 6	XDR-13	M	52	2013	Lima este	El Agustino	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	4.3.3	LAM	1355
	XDR-48	F	53	2014	Lima este	El Agustino	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> c1402t	-	<i>gyrA</i> A90V	4.3.3	LAM	1355
Grupo 7	XDR-57	M	29	2015	Lima este	El Agustino	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	-	<i>tlyA</i> G232D	<i>gyrA</i> D94G	4.3.3	LAM	1355
	XDR-58	M	na	2015	Lima este	Ate	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	-	<i>tlyA</i> G232D	<i>gyrA</i> S91P	4.3.3	LAM	1355
Grupo 8	XDR-14	F	48	2013	Callao	Callao	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	4.3.4.2	LAM1	469
	XDR-22	F	21	2013	Lima este	Chaclacayo	<i>rpoB</i> D435V	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	4.3.4.2	LAM1	469
Grupo 9	XDR-65	F	34	2015	Lima sur	Chorrillos	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	-	2.2.1	Beijing	1
	XDR-67	M	39	2015	Lima este	Ate	<i>rpoB</i> S450L	<i>katG</i> S315T	<i>rrs</i> a1401g	-	<i>gyrA</i> D94G	2.2.1	Beijing	1

6. DISCUSIÓN

La TB sigue siendo un importante problema en la salud pública en el Perú, sobre todo los casos de TB drogorresistentes como la TB-XDR que a través de los años presenta un incremento lento y gradual (Rios vidal, 2018). En general, las muestras secuenciadas fueron representativas de la TB-XDR que afecta a todo el país, ya que, a través de los años, la TB-XDR se mantiene altamente concentrada en los distritos de Lima y Callao. De este modo, el 85% de las cepas TB-XDR analizadas fueron de Lima y Callao, prácticamente la misma proporción reportada anteriormente (Alarcón et al., 2017; Soto Cabezas et al., 2020).

Respecto a las mutaciones génicas asociadas a resistencia, en el Perú, actualmente se realiza el tamizaje de resistencia molecular a los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea mediante las pruebas moleculares: ESL GenoType MTBDR*plus* v2 y ESL GenoType MTBDRs/ v2, respectivamente. Sin embargo, estos ensayos solo concentran el análisis en regiones “*Hot spot*”, limitando en cierto grado su capacidad de diagnóstico. Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron resultados concordantes con estudios previos. Así, se determinó que la resistencia fenotípica frente a rifampicina fue causada principalmente por mutaciones en los codones 450, 445 y 435 del gen *rpoB* (Agapito et al., 2002; Farhat et al., 2019; Sandoval et al., 2019). También se detectó la mutación Q432P que tiene un alto grado de confianza para desarrollar resistencia a la rifampicina y S431R con datos insuficientes según la Guía Técnica WHO-NGS (World Health Organization, 2018b); sin embargo, esta última mutación fue previamente asociada con fenotipos resistentes a rifampicina (Miotto et al., 2018). Para las muestras discordantes, la cepa discordante de rifampicina presentó la mutación I491F localizada fuera del RRDR. Esta mutación fue reportada previamente en Perú (Solari et al., 2020) y la OMS la enumera como una variante con un grado de confianza de asociación mínima (World Health Organization, 2018b). Respecto a la resistencia a la isoniazida, se determinó que la misma fue causada principalmente por la mutación S315T del gen *katG* seguida por la mutación c-15t de la región promotora del gen *inhA* (específicamente operon *mabA-inhA*). Así mismo, se constató la

aparición de la variante rara *inhA_g-17t*, cuya baja frecuencia también fue reportada en estudios previos nacionales (Solari et al., 2020) e internacionales (Sadri et al., 2016; Walker et al., 2015). Esta mutación es detectada indirectamente por el ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0. La cepa discordante de isoniazida presentó la mutación *inhA_S94A* que se sabe que confiere resistencia a isoniazida en estudios clínicos y experimentales (Shaw et al., 2017). La resistencia a levofloxacin fue causada principalmente por mutaciones que ocurrieron en el gen *gyrA*. Sin embargo, también se detectaron las mutaciones raras E501D y S447F del gen *gyrB*. Algunos estudios previos establecen que estas mutaciones raras solo confiere resistencia a moxifloxacin o ciprofloxacino (Ali et al., 2015; Disratthakit et al., 2016; Q. Li et al., 2019), aunque los resultados de este estudio indican que también confiere resistencia a levofloxacin y nunca antes fue reportado en cepas peruanas de MTB. Por otro lado, las cepas que no albergaron mutaciones en los genes *gyrA* o *gyrB* sugieren la existencia de mecanismos alternativos de resistencia como alteraciones en genes relacionados con bombas de eflujo, así como de la imitación del ADN (*DNA mimicry*) (Hegde et al., 2005; Louw et al., 2009; Takiff et al., 1996). La mayoría de las mutaciones se produjeron en un solo gen con la excepción de una doble mutación *gyrA_G88A* y *gyrB_T500P*. Respecto a esto, la aparición de mutaciones dobles se ha asociado con la manifestación de concentraciones mínimas inhibitorias más altas y puede estar asociado con una disminución del *fitnes* biológico de las cepas (Luo et al., 2017). Todas las cepas de MTB con resistencia detectada frente a kanamicina presentaron la mutación *rrs_a1401g*, la cual le brinda resistencia a altas concentraciones de kanamicina y amikacina (World Health Organization, 2018b). De manera similar, la resistencia simultánea a kanamicina y capreomicina fue asociada con mutaciones de alta confianza en el gen *rrs* (*a1401g*, *c1402t* y *g1484t*), el cual también está asociado con la resistencia cruzada a ambos fármacos (World Health Organization, 2018b). Sin embargo, las cepas resistentes sin mutaciones en los genes *rrs*, *eis* o *tlyA* sugieren la presencia de mecanismos adicionales como alteraciones en los genes *L10* y *L12*, los cuales han demostrado interactuar con la capreomicina (Lin et al., 2014), producir la sobreexpresión del gen *whiB7* y genes de la bomba de eflujo para la

explosión de la kanamicina (Reeves et al., 2013; Sowajassatakul et al., 2018). Este comportamiento ha sido reportado previamente en otros estudios, incluido Perú (Guio et al., 2014; Sowajassatakul et al., 2014).

El análisis de marcadores filogenéticos y espoligotipos evidenció un predominio del Linaje 4 entre las cepas de TB-XDR analizadas, lo que concuerda con estudios que afirman que este linaje es el más grande del mundo y el más representativo en el continente americano (Brynildsrud et al., 2018). La alta circulación de 18 cepas de TB-XDR pertenecientes a la familia LAM (sublinajes 4.3.3/LAM, 4.3.3/LAM9, 4.3.4.2/LAM1 y 4.3.4.2/LAM5), y 10 cepas de la familia Haarlem (sublinaje 4.1.2.1/Haarlem) concuerdan con el hecho de que son considerados los sublinajes de mayor distribución a nivel mundial. Asimismo, se evidenció la presencia del sublinaje 4.1.1/X3, el cual ha sido observado principalmente en el continente americano (Stucki et al., 2016). El elevado número de cepas pertenecientes al Linaje 4 es característico del continente americano y se justifica por el proceso colonizador por parte de emigrantes europeos (*founder effect*) entre los años 1466 y 1593 (Brynildsrud et al., 2018). Así mismo, la baja frecuencia de cepas TB-XDR pertenecientes al Linaje 2 revela la reciente incorporación de este Linaje al territorio nacional. Este patrón de incorporación reciente ha sido reportado en países vecinos como Ecuador y Chile (Jiménez et al., 2017; Meza et al., 2014). La proporción de cepas pertenecientes a la familia Beijing (8,8%) es muy similar a lo obtenido en estudios previos realizados en Perú en los años 2012 (9,3%) (Iwamoto et al., 2012) y en 2014 (9,2%) (Cáceres et al., 2014). Esta permanencia de la proporción de cepas del Linaje 2 a través de los años sugiere que en Perú las cepas TB-XDR de la familia Beijing no estarían necesariamente asociadas a mayor capacidad virulenta o factores de farmacorresistencia como fue determinado previamente (Sheen et al., 2013). Además, el presente estudio sugiere que por lo menos hasta el año 2015, las cepas TB-XDR pertenecientes al linaje 2 aún podrían estar restringidas geográficamente a la región de Lima y la provincia de Callao.

Respecto a la distribución de cepas de MTB en el entorno geográfico, se observó que a través de los años la mayoría de los sublinajes estuvieron concentrados en los distritos de Lima y Callao. Esto evidencia la aún existente

centralización del poder político-económico del país en Lima y Callao. Sin embargo, adicionalmente se observó la aparición de sublinajes de distribución local, tales como el genotipo 4.1.1.3/T1/SIT219 que estuvo presente solo en las regiones de Arequipa y La Libertad, 2.2.1/Beijing/SIT1 presente solo en la región Lima y la provincia del Callao, y 4.1.2.1/H1/SIT62 presente solo en Madre de Dios. Estos sublinajes de distribución local sugerirían la existencia de grupos de transmisión restringidos presentes en estas áreas, que incluirían cepas con diferentes perfiles de resistencia a fármacos. Coincidentemente, las cepas presentes en las regiones geográficamente distantes de La Libertad (norte del Perú) y Arequipa (sur del Perú) revelaron un nexo de transmisión no tan distante entre ellas (solo 28 SNPs de diferencia) evidenciando la existencia de un ancestro genético común para ambos lugares.

El presente estudio determinó que la familia LAM fue dominante entre las cepas peruanas de TB-XDR analizadas, lo cual es consistente con lo evidenciado en países vecinos de América del Sur (Díaz Acosta et al., 2019; Garzon-Chavez et al., 2020; Lagos et al., 2016; Machado et al., 2014; Realpe et al., 2014; Verza et al., 2020). Sin embargo, discrepa de un estudio previo también realizado con cepas peruanas de TB-XDR en el que se estableció que la familia dominante fue la Haarlem (Cáceres et al., 2014). Una posible razón de este desacuerdo es que el estudio anterior incluyó cepas de años anteriores (2007–2009), lo que sugiere la posible ocurrencia de un cambio en la prevalencia de familias de cepas de TB-XDR en Perú a lo largo de los años. Sin embargo, un estudio más reciente realizado en cepas peruanas de TB-MDR concuerda con nuestros resultados, estableciendo a la familia LAM como la familia predominante en el Perú (Grandjean et al., 2017).

El análisis de grupos genéticos de transmisión confirmó que las cepas TB-XDR se concentran en los distritos de la Región Lima que están más asociados a la pobreza, el hacinamiento y el menor acceso a los sistemas de salud. Estas variables demográficas ya han sido previamente asociadas con la diseminación de la TB en estudios del Perú y del mundo, pero no hasta el momento no están siendo abordados adecuadamente (Zaman, 2010). La composición uniforme de las mutaciones asociadas a la resistencia frente a

rifampicina e isoniazida en los diferentes grupos genéticos establece que la transmisión de las cepas en un mismo grupo posiblemente ocurrió a nivel de las cepas TB-MDR. Sin embargo, el análisis posterior reveló una composición heterogénea dentro de cada grupo con respecto a las mutaciones asociadas con la resistencia a los medicamentos de segunda línea. Esto sugiere la aparición *de novo* de las mutaciones que condujeron al fenotipo TB-XDR. Esta discontinuidad en los grupos de mutaciones asociadas a la resistencia de segunda línea y la baja tasa de agrupación (34%) de las cepas conformando las cadenas de transmisión recientes sugerirían que el principal mecanismo de adquisición de una cepa de TB-XDR no sería por contacto directo con pacientes infectados, sino por fracasos en el tratamiento individual de formas menos severas de la tuberculosis. Además, las grandes distancias genéticas observadas indican que las cepas de TB-XDR están relacionadas por ancestros remotos comunes, en lugar de ser causadas por eventos de transmisión recientes. Sin embargo, cabe señalar que la falta de caracterización genómica de todas las cepas de TB-XDR que circulan en el país, así como de cepas aisladas de familiares o contactos directos, puede dar lugar a la existencia de eslabones perdidos que subestiman la verdadera proporción de los eventos de transmisión reciente en la comunidad peruana.

El hecho de que los grupos 2, 3 y 4 compartieran el sublinaje 4.1.2.1 (distancia promedio de 123,5 SNP) y que los grupos 5, 6 y 7 compartieran el sublinaje 4.3.3/LAM (distancia promedio de 17,5 SNP) demostró que la secuenciación del genoma completo mostró una mayor capacidad de resolución, en comparación con el sistema clásico de espoligotipado y el sistema de código de barras propuesto previamente (Coll et al., 2014), en las cepas peruanas de TB-XDR al determinar que las cepas con el mismo genotipo pueden formar parte de diferentes grupos de transmisión. Sin embargo, es importante contar con información epidemiológica de los pacientes que complementa los vínculos genómicos, ya que es posible que casos con vínculos epidemiológicos bien establecidos escapen a los puntos de corte preestablecidos para la determinación de grupos de transmisión genético (Luo et al., 2014).

7. CONCLUSIONES

- En el Perú, las cepas TB-XDR presentan un predominio del Linaje Euroamericano. Así mismo, se evidencia un bajo porcentaje del linaje Esteasiático, sugiriendo una introducción reciente de este linaje en el territorio peruano. No existen sublinajes específicos de algún distrito o provincia, en contraste, los mismos se encuentran centralizados en los distritos de Lima y Callao.
- Las cepas TB-XDR peruanas presentaron mutaciones de alta confiabilidad asociados con la resistencia a fármacos antituberculosis de primera y segunda línea. Estas mutaciones fueron aquellas que presentan una mayor prevalencia a nivel mundial. Además, los resultados discordantes para rifampicina e isoniacida entre las metodologías genotípicas y fenotípicas se debieron a mutaciones fuera de las regiones “*hot spot*” analizadas por el ensayo molecular.
- Las cepas TB-XDR presentan un bajo grado de agrupamiento genético, siendo que el principal mecanismo de adquisición de la TB-XDR pueda deberse a fallos en el tratamiento individual de las formas menos graves de tuberculosis.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar la vigilancia genómica de otras formas drogorresistentes de la tuberculosis, tales como las cepas TB-MDR y TB-monorresistentes.
- Elaborar un banco genómico de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en todo el territorio peruano a fin de tener un mayor control del flujo de cepas que ingresan al territorio peruano.
- Elaborar o adecuar kits de diagnóstico de la resistencia farmacológica de *Mycobacterium tuberculosis*, tomando en cuenta regiones génicas que no están actualmente implementadas en kits comerciales.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman, M. (2008). Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology*, 62, 53-70.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162832>
- Agapito, J., Neyra, V., Castro, J., Accinelli, R., Rodríguez, I., & Espinoza, J. R. (2002). Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoβ* asociadas a la rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 19(3), 117-123.
- Alarcón, V., Alarcón, E., Figueroa, C., & Mendoza-Ticona, A. (2017). Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(2), 299-310. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2384>
- Ali, A., Hasan, Z., McNerney, R., Mallard, K., Hill-Cawthorne, G., Coll, F., Nair, M., Pain, A., Clark, T. G., & Hasan, R. (2015). Whole Genome Sequencing Based Characterization of Extensively Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from Pakistan. *PLOS ONE*, 10(2), e0117771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117771>
- Andrews S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Asencios, L., Galarza, M., Quispe, N., Vásquez, L., Leo, E., Valencia, E., Ramírez, J., Acurio, M., Salazar, R., Mendoza-Ticona, A., & Cáceres, O. (2012). Molecular test Genotype® MTBDRplus, an alternative to rapid detection of multidrug resistance tuberculosis. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Publica*, 29(1), 92-98.

- Bai, Y., Wang, Y., Shao, C., Hao, Y., & Jin, Y. (2016). GenoType MTBDRplus Assay for Rapid Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, *11*(3), e0150321.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150321>
- Barletta, F., Otero, L., Collantes, J., Asto, B., de Jong, B. C., Seas, C., & Rigouts, L. (2013). Genetic variability of Mycobacterium tuberculosis complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-Eastern part of Lima, Peru. *BMC Infectious Diseases*, *13*, 397.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-397>
- Boehme, C. C., Nicol, M. P., Nabeta, P., Michael, J. S., Gotuzzo, E., Tahirli, R., Gler, M. T., Blakemore, R., Worodria, W., Gray, C., Huang, L., Caceres, T., Mehdiyev, R., Raymond, L., Whitelaw, A., Sagadevan, K., Alexander, H., Albert, H., Cobelens, F., ... Perkins, M. D. (2011). Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: A multicentre implementation study. *Lancet*, *377*(9776), 1495-1505.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60438-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60438-8)
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bonilla Asalde, C. (2008). Situación de la tuberculosis en el Perú: Current status. *Acta Médica Peruana*, *25*(3), 163-170.
- Brites, D., & Gagneux, S. (2015). Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunological Reviews*, *264*(1), 6-24.
<https://doi.org/10.1111/imr.12264>

- Brossier, F., Veziris, N., Aubry, A., Jarlier, V., & Sougakoff, W. (2010). Detection by GenoType MTBDRsl Test of Complex Mechanisms of Resistance to Second-Line Drugs and Ethambutol in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1683-1689. <https://doi.org/10.1128/JCM.01947-09>
- Brown, T. S., Narechania, A., Walker, J. R., Planet, P. J., Bifani, P. J., Kolokotronis, S.-O., Kreiswirth, B. N., & Mathema, B. (2016). Genomic epidemiology of Lineage 4 Mycobacterium tuberculosis subpopulations in New York City and New Jersey, 1999–2009. *BMC Genomics*, 17, 947. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3298-6>
- Brynildsrud, O. B., Pepperell, C. S., Suffys, P., Grandjean, L., Monteserin, J., Debech, N., Bohlin, J., Alfsnes, K., Pettersson, J. O.-H., Kirkeleite, I., Fandinho, F., da Silva, M. A., Perdigao, J., Portugal, I., Viveiros, M., Clark, T., Caws, M., Dunstan, S., Thai, P. V. K., ... Eldholm, V. (2018). Global expansion of Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Science Advances*, 4(10), eaat5869. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat5869>
- Cáceres, O., Rastogi, N., Bartra, C., Couvin, D., Galarza, M., Asencios, L., & Mendoza-Ticona, A. (2014). Characterization of the Genetic Diversity of Extensively-Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Peru. *PLOS ONE*, 9(12), e112789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112789>
- Cancino-Muñoz, I., Gil-Brusola, A., Torres-Puente, M., Mariner-Llicer, C., Dogba, J., Akinseye, V., Adesokan, K., Kwaghe, A., Ejeh, F., Cadmus, S., & Comas, I. (2019). Development and application of affordable SNP

typing approaches to genotype Mycobacterium tuberculosis complex strains in low and high burden countries. *Scientific Reports*, 9(1), 1.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51326-2>

Capcha A, L., Urbina B, M., Vásquez C, L., Asencios S, L., Quispe T, N., Leo H, E., Baldeviano V, C., & Zavaleta P, A. (2005). Perfiles genéticos (IS6110) y patrones de resistencia en aislamientos de M. tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. Lima Sur, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(1), 4-11.

Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2012). Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(4), 464-469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>

Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly*, 6(2), 80-92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>

Clinical and Laboratory Standards Institute, Brown-Elliott, B. A., Conville, P. S., Desmond, E. P., Hall, G. S., Lin, G., Pfyffer, G. E., Ridderhof, J. C., Siddiqi, S. H., Wallace, R. J., Warren, N. G., & Witebsky, F. G. (2011). *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes* (2nd ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/>

Coll, F., McNerney, R., Guerra-Assunção, J. A., Glynn, J. R., Perdigão, J., Viveiros, M., Portugal, I., Pain, A., Martin, N., & Clark, T. G. (2014). A robust SNP barcode for typing Mycobacterium tuberculosis complex

- strains. *Nature Communications*, 5, 4812.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5812>
- Comas, I., Chakravarti, J., Small, P. M., Galagan, J., Niemann, S., Kremer, K., Ernst, J. D., & Gagneux, S. (2010). Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature Genetics*, 42(6), 498-503. <https://doi.org/10.1038/ng.590>
- Comas, I., Homolka, S., Niemann, S., & Gagneux, S. (2009). Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007815>
- Coscolla, M., & Gagneux, S. (2014). Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology*, 26(6), 431-444.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.012>
- Cudahy, P., & Shenoi, S. (2016). Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgraduate medical journal*, 92(1086), 187-193.
<https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133278>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., & Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11), 1862-1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and high-performance computing. *Nature methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

- Daum, L. T., Konstantynovska, O. S., Solodiantkin, O. S., Liashenko, O. O., Poteiko, P. I., Bolotin, V. I., Hrek, I. I., Rohozhyn, A. V., Rodriguez, J. D., Fischer, G. W., Chambers, J. P., & Gerilovych, A. P. (2018). Next-Generation Sequencing for Characterizing Drug Resistance-Confering Mycobacterium tuberculosis Genes from Clinical Isolates in the Ukraine. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(6).
<https://doi.org/10.1128/JCM.00009-18>
- Díaz Acosta, C. C., Russomando, G., Candia, N., Ritacco, V., Vasconcellos, S. E. G., de Berrêdo Pinho Moreira, M., de Romero, N. J., Morcillo, N., De Waard, J. H., Gomes, H. M., & Suffys, P. N. (2019). Exploring the “Latin American Mediterranean” family and the RDRio lineage in Mycobacterium tuberculosis isolates from Paraguay, Argentina and Venezuela. *BMC Microbiology*, *19*(1), 131.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1479-6>
- Disratthakit, A., Prammananan, T., Tribuddharat, C., Thaipisuttikul, I., Doi, N., Leechawengwongs, M., & Chaiprasert, A. (2016). Role of gyrB Mutations in Pre-extensively and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Thai Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(9), 5189-5197. <https://doi.org/10.1128/AAC.00539-16>
- Dixit, A., Freschi, L., Vargas, R., Calderon, R., Sacchettini, J., Drobniowski, F., Galea, J. T., Contreras, C., Yataco, R., Zhang, Z., Lecca, L., Kolokotronis, S.-O., Mathema, B., & Farhat, M. R. (2019). Whole genome sequencing identifies bacterial factors affecting transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a high-prevalence setting. *Scientific Reports*, *9*(1), 5602. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41967-8>

- DPCTB-MINSA. (2022). *Sala situacional de la tuberculosis—Perú 2022*.
<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2022/SE272022/04.pdf>
- Farhat, M. R., Sixsmith, J., Calderon, R., Hicks, N. D., Fortune, S. M., & Murray, M. (2019). Rifampicin and rifabutin resistance in 1003 Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(6), 1477-1483. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz048>
- Ford, C. B., Shah, R. R., Maeda, M. K., Gagneux, S., Murray, M. B., Cohen, T., Johnston, J. C., Gardy, J., Lipsitch, M., & Fortune, S. M. (2013). Mycobacterium tuberculosis mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nature Genetics*, *45*(7), 784-790.
<https://doi.org/10.1038/ng.2656>
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*, *4*(1), 3-66.
<https://doi.org/10.4161/viru.22329>
- Gardy, J. L., Johnston, J. C., Sui, S. J. H., Cook, V. J., Shah, L., Brodtkin, E., Rempel, S., Moore, R., Zhao, Y., Holt, R., Varhol, R., Birol, I., Lem, M., Sharma, M. K., Elwood, K., Jones, S. J. M., Brinkman, F. S. L., Brunham, R. C., & Tang, P. (2011). Whole-Genome Sequencing and Social-Network Analysis of a Tuberculosis Outbreak. *New England Journal of Medicine*, *364*(8), 730-739. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003176>
- Garzon-Chavez, D., Garcia-Bereguian, M. A., Mora-Pinargote, C., Granda-Pardo, J. C., Leon-Benitez, M., Franco-Sotomayor, G., Trueba, G., & de

- Waard, J. H. (2020). Population structure and genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador. *Scientific Reports*, *10*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62824-z>
- Gilchrist, C. A., Turner, S. D., Riley, M. F., Petri, W. A., & Hewlett, E. L. (2015). Whole-Genome Sequencing in Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 541-563. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-13>
- Grandjean, L., Gilman, R. H., Iwamoto, T., Köser, C. U., Coronel, J., Zimic, M., Török, M. E., Ayabina, D., Kendall, M., Fraser, C., Harris, S., Parkhill, J., Peacock, S. J., Moore, D. A. J., & Colijn, C. (2017). Convergent evolution and topologically disruptive polymorphisms among multidrug-resistant tuberculosis in Peru. *PloS One*, *12*(12), e0189838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189838>
- Guerra-Assunção, J., Crampin, A., Houben, R., Mzembe, T., Mallard, K., Coll, F., Khan, P., Banda, L., Chiwaya, A., Pereira, R., McNerney, R., Fine, P., Parkhill, J., Clark, T., & Glynn, J. (2015). Large-scale whole genome sequencing of *M. tuberculosis* provides insights into transmission in a high prevalence area. *ELife*, *4*, e05166. <https://doi.org/10.7554/eLife.05166>
- Guio, H., Tarazona, D., Galarza, M., Borda, V., & Curitomay, R. (2014). Genome Analysis of 17 Extensively Drug-Resistant Strains Reveals New Potential Mutations for Resistance. *Genome Announcements*, *2*(4), e00759-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00759-14>
- Günther, G., Gomez, G. B., Lange, C., Rupert, S., van Leth, F., & TBNET. (2015). Availability, price and affordability of anti-tuberculosis drugs in

- Europe: A TBNET survey. *The European Respiratory Journal*, 45(4), 1081-1088. <https://doi.org/10.1183/09031936.00124614>
- Hegde, S. S., Vetting, M. W., Roderick, S. L., Mitchenall, L. A., Maxwell, A., Takiff, H. E., & Blanchard, J. S. (2005). A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5727), 1480-1483. <https://doi.org/10.1126/science.1110699>
- Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P. M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J. C., Kremer, K., Petrov, D. A., Feldman, M. W., & Gagneux, S. (2008). High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biology*, 6(12), e311. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060311>
- Iwamoto, T., Grandjean, L., Arikawa, K., Nakanishi, N., Caviedes, L., Coronel, J., Sheen, P., Wada, T., Taype, C. A., Shaw, M.-A., Moore, D. A. J., & Gilman, R. H. (2012). Genetic Diversity and Transmission Characteristics of Beijing Family Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *PLoS ONE*, 7(11), e49651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049651>
- Jagielski, T., van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J., Mazur, P. K., & Bielecki, J. (2014). Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed Research International*, 2014, 645802. <https://doi.org/10.1155/2014/645802>
- Jiménez, P., Calvopiña, K., Herrera, D., Rojas, C., Pérez-Lago, L., Grijalva, M., Guna, R., García-de Viedma, D., Jiménez, P., Calvopiña, K., Herrera, D., Rojas, C., Pérez-Lago, L., Grijalva, M., Guna, R., & García-de Viedma, D. (2017). Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

- lineage in Ecuador. *Biomédica*, 37(2), 233-237.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3450>
- Jombart, T. (2008). adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(11), 1403-1405.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Ko, D.-H., Lee, E. J., Lee, S.-K., Kim, H.-S., Shin, S. Y., Hyun, J., Kim, J.-S., Song, W., & Kim, H. S. (2019). Application of next-generation sequencing to detect variants of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Genotype–phenotype correlation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0300-y>
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453-4455.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Lagos, J., Couvin, D., Arata, L., Tognarelli, J., Aguayo, C., Leiva, T., Arias, F., Hormazabal, J. C., Rastogi, N., & Fernández, J. (2016). Analysis of Mycobacterium tuberculosis Genotypic Lineage Distribution in Chile and Neighboring Countries. *PLOS ONE*, 11(8), e0160434.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160434>
- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(5), 589-595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing

- Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(16), 2078-2079.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, Q., Gao, H., Zhang, Z., Tian, Y., Liu, T., Wang, Y., Lu, J., Liu, Y., & Dai, E. (2019). Mutation and Transmission Profiles of Second-Line Drug Resistance in Clinical Isolates of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis From Hebei Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01838>
- Lin, Y., Li, Y., Zhu, N., Han, Y., Jiang, W., Wang, Y., Si, S., & Jiang, J. (2014). The Antituberculosis Antibiotic Capreomycin Inhibits Protein Synthesis by Disrupting Interaction between Ribosomal Proteins L12 and L10. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2038-2044.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02394-13>
- Louw, G. E., Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., McEvoy, C. R. E., Van Helden, P. D., & Victor, T. C. (2009). A Balancing Act: Efflux/Influx in Mycobacterial Drug Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3181-3189. <https://doi.org/10.1128/AAC.01577-08>
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3, e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Luca, S., & Mihaescu, T. (2013). History of BCG Vaccine. *Mædica*, 8(1), 53-58.
- Luo, T., Yang, C., Peng, Y., Lu, L., Sun, G., Wu, J., Jin, X., Hong, J., Li, F., Mei, J., DeRiemer, K., & Gao, Q. (2014). Whole-genome sequencing to detect recent transmission of Mycobacterium tuberculosis in settings with a high

- burden of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 94(4), 434-440. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.04.005>
- Luo, T., Yuan, J., Peng, X., Yang, G., Mi, Y., Sun, C., Wang, C., Zhang, C., & Bao, L. (2017). Double mutation in DNA gyrase confers moxifloxacin resistance and decreased fitness of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(7), 1893-1900. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx110>
- Machado, L. N. C., Marcondes, N. R., Leite, C. Q. F., Santos, A. C. B., Pavan, F. R., Baldin, V. P., Castilho, A. L., Siqueira, V. L. D., Baeza, L. C., Berghs, H., & Cardoso, R. F. (2014). First Baseline of Circulating Genotypic Lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in Patients from the Brazilian Borders with Argentina and Paraguay. *PLOS ONE*, 9(9), e107106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107106>
- Mathys, V., van de Vyvere, M., de Droogh, E., Soetaert, K., & Groenen, G. (2014). False-positive rifampicin resistance on Xpert® MTB/RIF caused by a silent mutation in the *rpoB* gene. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 18(10), 1255-1257. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0297>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297-1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>

- Mendoza-Ticona, A., & Gotuzzo, E. (2008). Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR): Historia y situación actual. *Acta Médica Peruana*, 25(4), 236-246.
- Meza, P., Balcells, M. E., Miranda, C., Cifuentes, M., Wozniak, A., & García, P. (2014). Presence of Beijing genotype among Mycobacterium tuberculosis strains in two centres of the Region Metropolitana of Chile. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 21-27. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100003>
- MINSa-DPCTB. (2021). *MINSa - DPCTB :: Portal de Información*.
<http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/PerfilTB.aspx>
- Miotto, P., Cabibbe, A. M., Borroni, E., Degano, M., & Cirillo, D. M. (2018). Role of Disputed Mutations in the rpoB Gene in Interpretation of Automated Liquid MGIT Culture Results for Rifampin Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(5), e01599-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01599-17>
- Murray, J. F., Rieder, H. L., & Finley-Croswhite, A. (2016). The King's Evil and the Royal Touch: The medical history of scrofula. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 20(6), 713-716. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0229>
- Napier, G., Campino, S., Merid, Y., Abebe, M., Woldeamanuel, Y., Aseffa, A., Hibberd, M. L., Phelan, J., & Clark, T. G. (2020). Robust barcoding and identification of Mycobacterium tuberculosis lineages for epidemiological and clinical studies. *Genome Medicine*, 12(1), 114.
<https://doi.org/10.1186/s13073-020-00817-3>

- Niemann, S., Köser, C. U., Gagneux, S., Plinke, C., Homolka, S., Bignell, H., Carter, R. J., Cheetham, R. K., Cox, A., Gormley, N. A., Kokko-Gonzales, P., Murray, L. J., Rigatti, R., Smith, V. P., Arends, F. P. M., Cox, H. S., Smith, G., & Archer, J. A. C. (2009). Genomic Diversity among Drug Sensitive and Multidrug Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with Identical DNA Fingerprints. *PLOS ONE*, 4(10), e7407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007407>
- Paradis, E., & Schliep, K. (2019). ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 35(3), 526-528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841-842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- R Core Team. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R. Found. Stat. Comput.* <https://www.R-project.org>
- Realpe, T., Correa, N., Rozo, J. C., Ferro, B. E., Gomez, V., Zapata, E., Ribon, W., Puerto, G., Castro, C., Nieto, L. M., Diaz, M. L., Rivera, O., Couvin, D., Rastogi, N., Arbelaez, M. P., & Robledo, J. (2014). Population Structure among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Colombia. *PLoS ONE*, 9(4), e93848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093848>
- Reeves, A. Z., Campbell, P. J., Sultana, R., Malik, S., Murray, M., Plikaytis, B. B., Shinnick, T. M., & Posey, J. E. (2013). Aminoglycoside Cross-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Due to Mutations in the 5'

- Untranslated Region of whiB7. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4), 1857-1865. <https://doi.org/10.1128/AAC.02191-12>
- Reiling, N., Homolka, S., Walter, K., Brandenburg, J., Niwinski, L., Ernst, M., Herzmann, C., Lange, C., Diel, R., Ehlers, S., & Niemann, S. (2013). Clade-specific virulence patterns of Mycobacterium tuberculosis complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. *MBio*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00250-13>
- Rios vidal, J. (2018). *Situación de Tuberculosis en el Perú y la respuesta del Estado (Plan de Intervención, Plan de Acción)* [DGIESP-MINSA]. <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20180605122521.pdf>
- Roetzer, A., Diel, R., Kohl, T. A., Rückert, C., Nübel, U., Blom, J., Wirth, T., Jaenicke, S., Schuback, S., Rüscher-Gerdes, S., Supply, P., Kalinowski, J., & Niemann, S. (2013). Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a Mycobacterium tuberculosis Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study. *PLoS Medicine*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001387>
- Sadri, H., Farahani, A., & Mohajeri, P. (2016). Frequency of mutations associated with isoniazid-resistant in clinical Mycobacterium tuberculosis strains by low-cost and density (LCD) DNA microarrays. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 9(5), 307. <https://doi.org/10.4103/1755-6783.190166>
- Sandoval, R., Monteghirfo, M., Salazar, O., & Galarza, M. (2019). Resistencia cruzada entre isoniácida y etionamida y su alta correlación con la mutación C-15T en aislamientos de Mycobacterium tuberculosis de

Perú. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 36-42.

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.03.005>

Schürch, A. C., Kremer, K., Kiers, A., Daviena, O., Boeree, M. J., Siezen, R. J.,

Smith, N. H., & van Soolingen, D. (2010). The tempo and mode of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular*

Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 10(1), 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.10.002>

Shaw, D. J., Robb, K., Vetter, B. V., Tong, M., Molle, V., Hunt, N. T., &

Hoskisson, P. A. (2017). Disruption of key NADH-binding pocket residues of the *Mycobacterium tuberculosis* InhA affects DD-CoA binding ability. *Scientific Reports*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05042-4>

Sheen, P., Couvin, D., Grandjean, L., Zimic, M., Dominguez, M., Luna, G.,

Gilman, R. H., Rastogi, N., & Moore, D. A. J. (2013). Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru and Exploration of Phylogenetic Associations with Drug Resistance. *PLOS ONE*, 8(6), e65873.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065873>

Sinha, P., Gupta, A., Prakash, P., Anupurba, S., Tripathi, R., & Srivastava, G.

N. (2016). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. *BMC Infectious Diseases*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1450-1>

Smittipat, N., Miyahara, R., Juthayothin, T., Billamas, P., Dokladda, K.,

Imsanguan, W., Intralawan, D., Rukseree, K., Jaitrong, S.,

- Chaiyasirinroje, B., Wongjai, J., Disratthakit, A., Chaiprasert, A., Nedsuwan, S., Mahasirimongkol, S., Toyo-Oka, L., Tokunaga, K., Yamada, N., Palittapongarnpim, P., & Yanai, H. (2019). Indo-Oceanic Mycobacterium tuberculosis strains from Thailand associated with higher mortality. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 23(9), 972-979. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0710>
- Solari, L., Santos-Lazaro, D., & Puyen, Z. M. (2020). Mutations in Mycobacterium tuberculosis Isolates with Discordant Results for Drug-Susceptibility Testing in Peru. *International Journal of Microbiology*, 2020, 8253546. <https://doi.org/10.1155/2020/8253546>
- Somasundaram, S., Ram, A., & Sankaranarayanan, L. (2014). Isoniazid and Rifampicin as Therapeutic Regimen in the Current Era: A Review. *Journal of Tuberculosis Research*, 2014. <https://doi.org/10.4236/jtr.2014.21005>
- Soto Cabezas, M. G., Munayco Escate, C. V., Escalante Maldonado, O., Valencia Torres, E., Arica Gutiérrez, J., & Yagui Moscoso, M. J. A. (2020). Perfil epidemiológico de la tuberculosis extensivamente resistente en el Perú, 2013-2015. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.29>
- Sowajassatakul, A., Prammananan, T., Chaiprasert, A., & Phunpruch, S. (2014). Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand. *BMC Microbiology*, 14, 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-165>

- Sowajassatakul, A., Prammananan, T., Chaiprasert, A., & Phunpruch, S. (2018). Overexpression of eis without a mutation in promoter region of amikacin- and kanamycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical strain. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0285-6>
- Steiner, A., Stucki, D., Coscolla, M., Borrell, S., & Gagneux, S. (2014). KvarQ: Targeted and direct variant calling from fastq reads of bacterial genomes. *BMC Genomics*, 15, 881. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-881>
- Steingart, K. R., Schiller, I., Horne, D. J., Pai, M., Boehme, C. C., & Dendukuri, N. (2014). Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD009593. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009593.pub3>
- Stucki, D., Brites, D., Jeljeli, L., Coscolla, M., Liu, Q., Trauner, A., Fenner, L., Rutaihwa, L., Borrell, S., Luo, T., Gao, Q., Kato-Maeda, M., Ballif, M., Egger, M., Macedo, R., Mardassi, H., Moreno, M., Tundo Vilanova, G., Fyfe, J., ... Gagneux, S. (2016). Mycobacterium tuberculosis Lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nature genetics*, 48(12), 1535-1543. <https://doi.org/10.1038/ng.3704>
- Takiff, H. E., Cimino, M., Musso, M. C., Weisbrod, T., Martinez, R., Delgado, M. B., Salazar, L., Bloom, B. R., & Jacobs, W. R. (1996). Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in Mycobacterium smegmatis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(1), 362-366. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.362>

Verza, M., Scheffer, M. C., Salvato, R. S., Schorner, M. A., Barazzetti, F. H., Machado, H. de M., Medeiros, T. F., Rovaris, D. B., Portugal, I., Viveiros, M., Perdigão, J., Kritski, A., & Bazzo, M. L. (2020). Genomic epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Santa Catarina, Southern Brazil. *Scientific Reports*, *10*(1), 12891. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69755-9>

Villemin, J.-A. (1865). *Cause et nature de la tuberculose*. l'Académie de Médecine.

Walker, T. M., Ip, C. L. C., Harrell, R. H., Evans, J. T., Kapatai, G., Dedicoat, M. J., Eyre, D. W., Wilson, D. J., Hawkey, P. M., Crook, D. W., Parkhill, J., Harris, D., Walker, A. S., Bowden, R., Monk, P., Smith, E. G., & Peto, T. E. A. (2013a). Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: A retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(2), 137-146. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70277-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70277-3)

Walker, T. M., Ip, C. L. C., Harrell, R. H., Evans, J. T., Kapatai, G., Dedicoat, M. J., Eyre, D. W., Wilson, D. J., Hawkey, P. M., Crook, D. W., Parkhill, J., Harris, D., Walker, A. S., Bowden, R., Monk, P., Smith, E. G., & Peto, T. E. A. (2013b). Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: A retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(2), 137-146. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70277-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70277-3)

Walker, T. M., Kohl, T. A., Omar, S. V., Hedge, J., Del Ojo Elias, C., Bradley, P., Iqbal, Z., Feuerriegel, S., Niehaus, K. E., Wilson, D. J., Clifton, D. A., Kapatai, G., Ip, C. L. C., Bowden, R., Drobniowski, F. A., Allix-Béguet,

- C., Gaudin, C., Parkhill, J., Diel, R., ... Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group. (2015). Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: A retrospective cohort study. *The Lancet. Infectious Diseases*, *15*(10), 1193-1202. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00062-6)
- Williamson, D. A., Roberts, S. A., Bower, J. E., Vaughan, R., Newton, S., Lowe, O., Lewis, C. A., & Freeman, J. T. (2012). Clinical failures associated with *rpoB* mutations in phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, *16*(2), 216-220. <https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0178>
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Rüsche-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., Meyer, A., Supply, P., & Niemann, S. (2008). Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathogens*, *4*(9), e1000160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160>
- Witney, A. A., Cosgrove, C. A., Arnold, A., Hinds, J., Stoker, N. G., & Butcher, P. D. (2016). Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Medicine*, *14*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0598-2>
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, *15*(3), R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>

- World Health Organization. (2018a). *Global Tuberculosis Report 2018*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2018b). *Technical guide on next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274443>
- World Health Organization. (2019). *Global Tuberculosis Report 2019*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714>
- World Health Organization. (2020). *Global Tuberculosis Report 2020*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- World Health Organization. (2021a). *Global Tuberculosis Report 2021*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
- World Health Organization. (2021b). *Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>
- Xia, E., Teo, Y.-Y., & Ong, R. T.-H. (2016). SpoTyping: Fast and accurate in silico Mycobacterium spoligotyping from sequence reads. *Genome Medicine*, 8(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0270-7>
- Zaman, K. (2010). Tuberculosis: A Global Health Problem. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 28(2), 111-113.

10. ANEXOS

Anexo 1: Conjunto de muestras genómicas pertenecientes a cepas de TB-XDR de diferentes países del mundo. Se especifica el código SRA (Sequence Read Archive) de cada muestra.

N°	País de origen	Código SRA	N°	País de origen	Código SRA
001	Argentina	SRR6848321	112	Rusia	ERR067644
002	Argentina	SRR6848320	113	Rusia	ERR144567
003	Argentina	SRR6848322	114	Rusia	ERR234661
004	Argentina	SRR6848323	115	Rusia	ERR133906
005	Belorrusia	SRR1184123	116	Sudáfrica	SRR832991
006	Belorrusia	SRR1180936	117	Sudáfrica	SRR1173422
007	Belorrusia	SRR1169142	118	Sudáfrica	SRR924207
008	Belorrusia	SRR1181072	119	Sudáfrica	SRR1184333
009	Belorrusia	SRR1169001	120	Sudáfrica	SRR1062834
010	Belorrusia	SRR1181025	121	Sudáfrica	SRR1175022
011	Belorrusia	SRR1174825	122	Sudáfrica	SRR1062823
012	Belorrusia	SRR1168979	123	Sudáfrica	SRR1173448
013	Belorrusia	SRR1184040	124	Sudáfrica	SRR1184301
014	Belorrusia	SRR1169073	125	Sudáfrica	SRR1173354
015	Belorrusia	SRR1169096	126	Sudáfrica	SRR1173038
016	Belorrusia	SRR1172072	127	Sudáfrica	SRR924232
017	Belorrusia	SRR1172239	128	Sudáfrica	SRR924227
018	Belorrusia	SRR1169116	129	Sudáfrica	SRR1173069
019	Belorrusia	SRR1181033	130	Sudáfrica	SRR1175345
020	Belorrusia	SRR1181132	131	Sudáfrica	SRR847793
021	Belorrusia	SRR1169039	132	Sudáfrica	SRR1184297
022	Belorrusia	SRR1180957	133	Sudáfrica	SRR1184320
023	Belorrusia	SRR1172073	134	Sudáfrica	SRR1196575
024	Belorrusia	SRR1172424	135	Sudáfrica	SRR924222
025	Belorrusia	SRR1172201	136	Sudáfrica	SRR1184307
026	Belorrusia	SRR1172155	137	Sudáfrica	SRR1196504
027	Belorrusia	SRR1172291	138	Sudáfrica	SRR1184342
028	Belorrusia	SRR1169129	139	Sudáfrica	SRR1173039
029	Belorrusia	SRR1169027	140	Sudáfrica	SRR924230
030	Belorrusia	SRR1181208	141	Sudáfrica	SRR1184340
031	Belorrusia	SRR1181278	142	Sudáfrica	SRR1175334
032	Belorrusia	SRR1169128	143	Sudáfrica	SRR1173199
033	Belorrusia	SRR1169119	144	Sudáfrica	SRR1062854
034	Belorrusia	SRR1168958	145	Sudáfrica	SRR924226
035	Belorrusia	SRR1181300	146	Sudáfrica	SRR833000
036	Belorrusia	SRR1169121	147	Sudáfrica	SRR1172836
037	Belorrusia	SRR1181134	148	Sudáfrica	SRR1173430

038	Belorrusia	SRR1169108	149	Sudáfrica	SRR1180359
039	Belorrusia	SRR1169086	150	Sudáfrica	SRR1175358
040	Belorrusia	SRR1174829	151	Sudáfrica	SRR924213
041	Belorrusia	SRR1169063	152	Sudáfrica	SRR1172994
042	Belorrusia	SRR1181128	153	Sudáfrica	SRR1196510
043	Belorrusia	SRR1180924	154	Sudáfrica	SRR924692
044	Belorrusia	SRR1181098	155	Sudáfrica	SRR924217
045	Belorrusia	SRR1168981	156	Sudáfrica	SRR924229
046	Belorrusia	SRR1169050	157	Sudáfrica	SRR1196530
047	Belorrusia	SRR1172184	158	Sudáfrica	SRR1062827
048	Belorrusia	SRR1180963	159	Sudáfrica	SRR1173349
049	Belorrusia	SRR1168987	160	Sudáfrica	SRR1172739
050	Belorrusia	SRR1181093	161	Sudáfrica	SRR924223
051	Belorrusia	SRR1180989	162	Sudáfrica	SRR1062837
052	Belorrusia	SRR1172313	163	Sudáfrica	SRR1173032
053	Belorrusia	SRR1181103	164	Sudáfrica	SRR1062825
054	Belorrusia	SRR1172162	165	Sudáfrica	SRR833191
055	Belorrusia	SRR1169014	166	Sudáfrica	SRR1196586
056	Belorrusia	SRR1172185	167	Sudáfrica	SRR924215
057	Belorrusia	SRR1183663	168	Sudáfrica	SRR1184382
058	Belorrusia	SRR1172230	169	Sudáfrica	SRR1180415
059	Belorrusia	SRR1184035	170	Sudáfrica	SRR1181376
060	Belorrusia	SRR1181155	171	Sudáfrica	SRR833096
061	Belorrusia	SRR1169009	172	Sudáfrica	SRR1173100
062	Belorrusia	SRR1180970	173	Sudáfrica	SRR1184378
063	Belorrusia	SRR1172393	174	Sudáfrica	SRR1181357
064	Belorrusia	SRR1180922	175	Sudáfrica	SRR924218
065	Brasil	ERR2432994	176	Sudáfrica	SRR924219
066	China	SRR921502	177	Sudáfrica	SRR1173259
067	China	SRR921503	178	Sudáfrica	SRR924697
068	China	SRR5894885	179	Sudáfrica	SRR924205
069	China	SRR5894884	180	Sudáfrica	SRR924216
070	China	SRR5894881	181	Sudáfrica	SRR1181391
071	Georgia	SRR5761429	182	Sudáfrica	SRR1062846
072	Mozambique	ERR2433008	183	Sudáfrica	SRR1184300
073	Rusia	ERR067672	184	Sudáfrica	SRR1175065
074	Rusia	ERR234641	185	Sudáfrica	SRR924234
075	Rusia	ERR144600	186	Sudáfrica	SRR1196477
076	Rusia	ERR067761	187	Sudáfrica	SRR1184326
077	Rusia	ERR067754	188	Sudáfrica	SRR1184352
078	Rusia	ERR229982	189	Sudáfrica	SRR1173350
079	Rusia	ERR067674	190	Sudáfrica	SRR1196542
080	Rusia	ERR067724	191	Sudáfrica	SRR924694

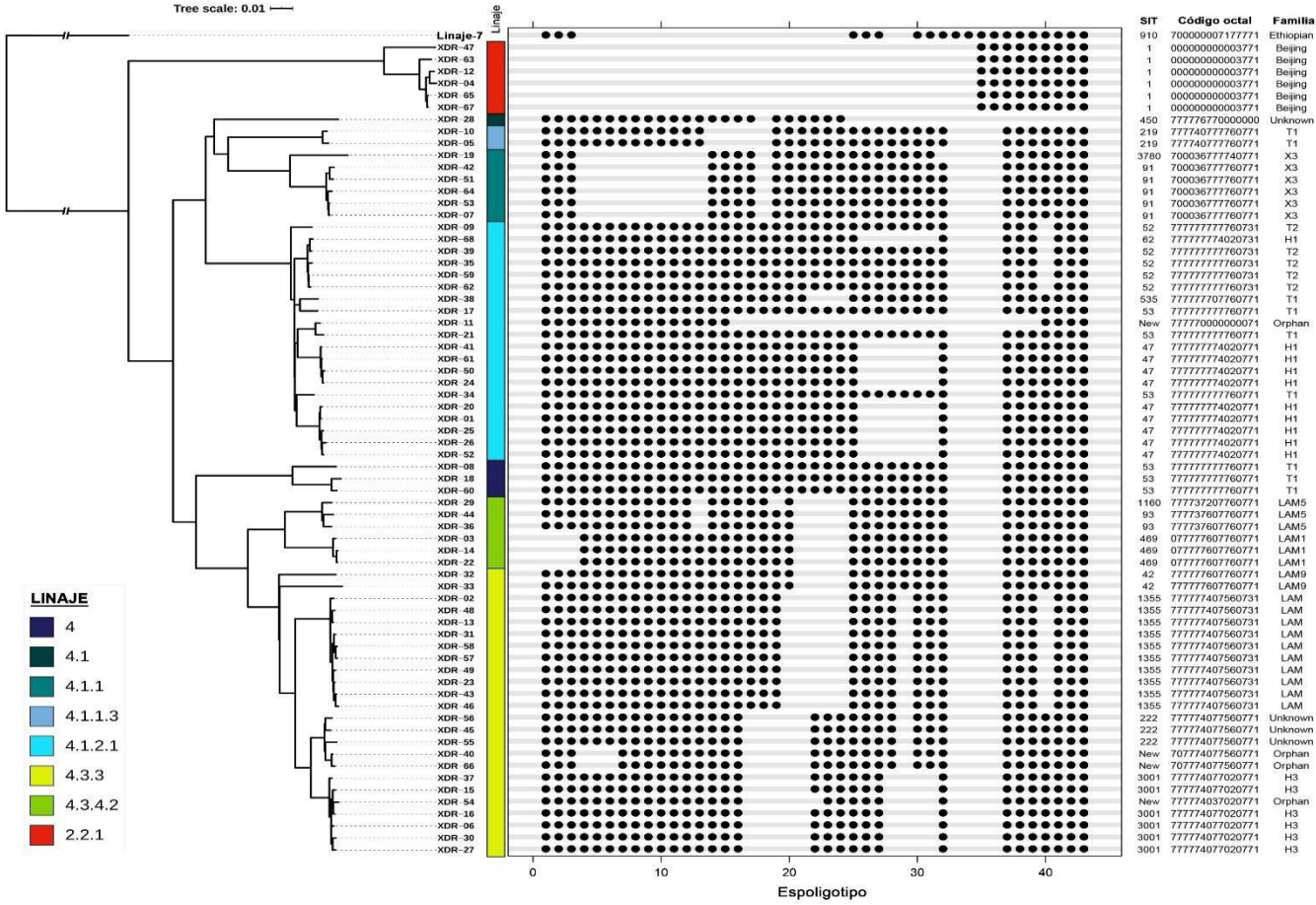
081	Rusia	ERR228049	192	Sudáfrica	SRR1196528
082	Rusia	ERR229929	193	Sudáfrica	SRR1062841
083	Rusia	ERR158616	194	Sudáfrica	SRR924206
084	Rusia	ERR108420	195	Sudáfrica	SRR1062842
085	Rusia	ERR234560	196	Sudáfrica	SRR1196556
086	Rusia	ERR234657	197	Sudáfrica	SRR833121
087	Rusia	ERR133890	198	Sudáfrica	SRR1196503
088	Rusia	ERR067696	199	Sudáfrica	SRR1181396
089	Rusia	ERR227985	200	Sudáfrica	SRR1173056
090	Rusia	ERR133900	201	Sudáfrica	SRR924220
091	Rusia	ERR067679	202	Sudáfrica	SRR1196515
092	Rusia	ERR228062	203	Sudáfrica	SRR1184331
093	Rusia	ERR067722	204	Sudáfrica	SRR1184366
094	Rusia	ERR158596	205	Sudáfrica	SRR924225
095	Rusia	ERR158585	206	Sudáfrica	SRR924228
096	Rusia	ERR133854	207	Sudáfrica	SRR924208
097	Rusia	ERR234622	208	Sudáfrica	SRR1173143
098	Rusia	ERR067645	209	Sudáfrica	SRR1196511
099	Rusia	ERR108480	210	Sudáfrica	SRR1062819
100	Rusia	ERR133908	211	Sudáfrica	SRR1175354
101	Rusia	ERR067762	212	Sudáfrica	SRR1184360
102	Rusia	ERR137208	213	Sudáfrica	SRR1062822
103	Rusia	ERR144620	214	Sudáfrica	SRR1062820
104	Rusia	ERR158588	215	Sudáfrica	SRR1173142
105	Rusia	ERR117453	216	UK-Lituania	ERR867522
106	Rusia	ERR067671	217	UK-Lituania	ERR867523
107	Rusia	ERR158580	218	UK-Lituania	ERR867532
108	Rusia	ERR117454	219	UK-Lituania	ERR867533
109	Rusia	ERR067584	220	UK-Lituania	ERR867524
110	Rusia	ERR234600	221	UK-Lituania	ERR867534
111	Rusia	ERR067700			

Anexo 3: Caracterización *in silico* de las familias y sublinajes de las cepas TB-XDR. **SIT:** spoligotype international type.

Código	Año de aislamiento	Procedencia	Sublinaje	Familia	SIT
XDR-01	2011	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-02	2011	CALLAO	4.3.3	LAM	1355
XDR-03	2011	LIMA	4.3.4.2	LAM1	469
XDR-04	2011	CALLAO	2.2.1	Beijing	1
XDR-05	2011	LA LIBERTAD	4.1.1.3	T1	219
XDR-06	2012	LIMA	4.3.3	H3	3001
XDR-07	2013	LIMA	4.1.1	X3	91
XDR-08	2012	LIMA	4	T1	53
XDR-09	2013	ICA	4.1.2.1	T2	52
XDR-10	2013	AREQUIPA	4.1.1.3	T1	219
XDR-11	2013	LIMA	4.1.2.1	Huérfano	Huérfano
XDR-12	2013	LIMA	2.2.1	Beijing	1
XDR-13	2013	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-14	2013	CALLAO	4.3.4.2	LAM1	469
XDR-15	2013	LIMA	4.3.3	H3	3001
XDR-16	2013	LIMA	4.3.3	H3	3001
XDR-17	2013	LIMA	4.1.2.1	T1	53
XDR-18	2013	LIMA	4	T1	53
XDR-19	2013	LIMA	4.1.1	X3	3780
XDR-20	2013	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-21	2013	LIMA	4.1.2.1	T1	53
XDR-22	2013	LIMA	4.3.4.2	LAM1	469
XDR-23	2013	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-24	2014	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-25	2014	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-26	2013	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-27	2014	LIMA	4.3.3	H3	3001
XDR-28	2013	LIMA	4.1	Desconocido	450
XDR-29	2014	ICA	4.3.4.2	LAM5	1160
XDR-30	2014	LIMA	4.3.3	H3	3001
XDR-31	2014	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-32	2014	LIMA	4.3.3	LAM9	42
XDR-33	2014	LIMA	4.3.3	LAM9	42
XDR-34	2014	LIMA	4.1.2.1	T1	53
XDR-35	2014	LIMA	4.1.2.1	T2	52
XDR-36	2014	LIMA	4.3.4.2	LAM5	93
XDR-37	2014	LIMA	4.3.3	H3	3001
XDR-38	2014	LIMA	4.1.2.1	T1	535
XDR-39	2014	LIMA	4.1.2.1	T2	52
XDR-40	2014	LIMA	4.3.3	Huérfano	Huérfano

XDR-41	2014	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-42	2014	ANCASH	4.1.1	X3	91
XDR-43	2014	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-44	2014	CALLAO	4.3.4.2	LAM5	93
XDR-45	2014	UCAYALI	4.3.3	Desconocido	222
XDR-46	2014	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-47	2014	LIMA	2.2.1	Beijing	1
XDR-48	2014	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-49	2015	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-50	2015	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-51	2015	LIMA	4.1.1	X3	91
XDR-52	2015	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-53	2015	LIMA	4.1.1	X3	91
XDR-54	2015	CALLAO	4.3.3	Huérfano	Huérfano
XDR-55	2015	ICA	4.3.3	Desconocido	222
XDR-56	2015	CALLAO	4.3.3	Desconocido	222
XDR-57	2015	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-58	2015	LIMA	4.3.3	LAM	1355
XDR-59	2015	CALLAO	4.1.2.1	T2	52
XDR-60	2015	LIMA	4	T1	53
XDR-61	2015	LIMA	4.1.2.1	H1	47
XDR-62	2015	LIMA	4.1.2.1	T2	52
XDR-63	2015	LIMA	2.2.1	Beijing	1
XDR-64	2015	PIURA	4.1.1	X3	91
XDR-65	2015	LIMA	2.2.1	Beijing	1
XDR-66	2015	LORETO	4.3.3	Huérfano	Huérfano
XDR-67	2015	LIMA	2.2.1	Beijing	1
XDR-68	2015	MADRE DE DIOS	4.1.2.1	H1	62

Anexo 4: Patrones de espiligotipos in silico (códigos binarios y octales) de cepas peruanas de TB-XDR. Los SIT y las familias se anotaron utilizando la base de datos SITVIT2. Los patrones están correlacionados con los Linajes y el árbol de Máxima Verosimilitud generado previamente. **SIT:** spoligotype international type. El árbol filogenético es el mismo generado en la Figura 7. Los patrones de espiligotipos binarios se generaron con el paquete R ggplot2 v3.3.2 (<https://ggplot2.tidyverse.org>).



Anexo 5: Correlación entre el árbol filogenómico y la matriz de distancias de nucleótidos de todas las cepas de TB-XDR. En la parte superior derecha se ilustra el histograma de la distancia por pares (distancia de Hamming) y la línea punteada vertical indica un punto de corte de 10 nucleótidos de diferencia. El árbol filogenómico es el mismo generado en la Figura 7. La matriz de distancia se creó con R package Ape v5.4 (<http://ape-package.ird.fr>).

