



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Estructura genética de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes usando el ensayo de sonda lineal GenoType MTBDR*plus* v2.0 en el Perú, periodo 2011-2015

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Elías David SANTOS LÁZARO

ASESORES

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Dra. Zully Margoth PUYÉN GUERRA

Lima, Perú

2020



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. (2020). *Estructura genética de cepas de Mycobacterium tuberculosis drogorresistentes usando el ensayo de sonda lineal GenoType MTBDRplus v2.0 en el Perú, periodo 2011-2015*. Tesis para optar el grado de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0003-1450-2039
DNI Autor	44645298
Código ORCID de asesores	0000-0001-9309-7021 0000-0002-5068-0986
DNI Asesores	06183797 40852288
Grupo de investigación	Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias – Instituto Nacional de Salud
Financiamiento	INNOVATE-Perú Contrato N° 353-PNICP-PIAP-2014
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Instituto Nacional de Salud Av. Defensores del Morro 2268, Lima-Perú (12° 10' 59.880" S 77° 1' 3.000" W)
Rango de años que abarcó la investigación	2017-2020
Disciplinas OCDE	<p>Enfermedades infecciosas http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08</p> <p>Genética, Herencia http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07</p> <p>Bioinformática http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las ...11:16... horas del 26 de diciembre de 2020, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/wxv-ka0q-wro?authuser=1>, el jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **ELIAS DAVID SANTOS LÁZARO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200037341, el titulado expuso su tesis: **“ESTRUCTURA GENÉTICA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* DROGORRESISTENTES USANDO EL ENSAYO DE SONDA LINEAL GENOTYPE MTBDRPLUS V2.0 EN EL PERÚ, PERIODO 2011-2015”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20 , calificativo: APROBADO CON MÁXIMOS HONORES

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **ELIAS DAVID SANTOS LÁZARO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las ...12:50... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de diciembre de 2020.


Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(PRESIDENTE)

 **UNMSM**
Firmado digitalmente por RAMIREZ
ROCA Pablo Sergio FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 26.12.2020 12:53:57 -05:00
Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(ASESOR)

 **UNMSM**
Firmado digitalmente por GARCIA DE
LA GUARDA Ruth Hortensia FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 26.12.2020 12:49:31 -05:00
Mg. RUTH GARCIA DE LA GUARDA
(MIEMBRO)


Dr. JULIO SOLIS SARMIENTO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mis amados padres, Rodolfo Santos Canto y Rosalinda Lázaro Oré, por el soporte espiritual y familiar brindado en todo momento de mi vida.

A mis amados hermanos, Iván Santos Lázaro y Cliver Santos Lázaro, por la inspiración y gran apoyo brindado para el cumplimiento de mis objetivos y culminación de mis estudios profesionales.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, a Dios, quien es mi guía y fortaleza en todo momento de mi vida. Gracias Padre celestial por los buenos, y sobre todo por los malos momentos, ya que a través de ellos has moldeado mi carácter y me preparaste para enfrentar diferentes retos a lo largo de mi vida.

Agradezco a toda mi familia por haber estado conmigo en todo momento y siempre empujarme a seguir adelante con la ayuda de Dios. Me motivan a cada día dar mucho más de mí y avanzar en el cumplimiento de mis objetivos.

Agradezco a la Dra. Zully Puyén Guerra por ser mi asesora externa y haberme permitido integrar su grupo de investigación en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud. La confianza, consideración y apoyo brindado, hacia mi persona, durante toda la etapa de realización de este estudio fueron determinantes para el cumplimiento de mis objetivos.

Agradezco al Dr. Pablo Ramírez Roca por ser mi asesor interno y brindarme su apoyo desde el primer momento. Así mismo, sus diferentes recomendaciones permitieron culminar exitosamente el desarrollo del presente estudio.

Agradezco al Dr. Ronnie Gavilán por su tiempo para siempre discutir diferentes ideas sobre el presente estudio, así como muchos otros temas de investigación de importancia en Salud Pública.

Agradezco a todos mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud, porque desde el primer momento me recibieron con los brazos abiertos y me permitieron sentir a gusto, además de transmitirme sus incontables conocimientos.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud por brindarme la oportunidad de integrar su cuerpo de profesionales que laboran en favor de brindar un servicio adecuado a la población peruana.

Agradezco a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y a todo el equipo de profesores de la Escuela Académica Profesional de Genética y Biotecnología, por la preparación académica brindada para afrontar con éxito los diferentes retos que el mundo profesional nos plantea en el día a día.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	12
1.1	Planteamiento del problema	12
1.2	Justificación de la investigación	14
2	MARCO TEÓRICO.....	15
2.1	Historia de la tuberculosis	15
2.2	Patogénesis de la tuberculosis.....	17
2.3	Fármacos antituberculosis	21
2.3.1	Rifampicina	21
2.3.2	Isoniacida.....	23
2.4	Diagnóstico y susceptibilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.4.1	Ensayo de Sonda Lineal, GenoType MTBDR <i>plus</i> v2.0	26
2.4.1.1	Zona de resistencia a rifampicina	28
2.4.1.2	Zona de resistencia a isoniacida.....	30
2.5	Haplotipos genéticos.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo General	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.1	Población	35
4.2	Material de laboratorio.....	35
4.3	Selección de casos	35
4.4	Obtención de datos.....	36
4.5	Obtención de Metadatos	37
4.6	Análisis estadísticos e informáticos.....	38
4.7	Evaluación de la diversidad alélica y ligamiento genético.....	39
4.8	Obtención y clasificación de haplotipos.....	39
4.9	Evaluación del poder discriminatorio de los haplotipos.....	41
4.10	Distribución geográfica de haplotipos.....	41
4.11	Determinación de la similaridad y estructura genética de los Haplotipos.....	42
4.12	Análisis de diversidad alfa y beta	43
4.13	Asociación estadística de haplotipos.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Análisis de muestras ingresadas al estudio.....	45
5.2	Análisis de mutaciones caracterizadas en el GenoType MTBDR <i>plus</i> v2.0	47
5.3	Evaluación de la diversidad alélica y ligamiento genético.....	50

5.4	Obtención y análisis descriptivo de haplotipos	53
5.5	Similaridad genética de haplotipos	57
5.6	Poder discriminatorio de los haplotipos	58
5.7	Distribución geográfica de haplotipos	58
5.8	Análisis de diversidad alfa y beta	64
5.8.1	Diversidad alfa	64
5.8.2	Diversidad beta	67
5.9	Asociación de Haplotipos	68
5.9.1	Haplotipos y Sexo del paciente	68
5.9.2	Haplotipos y Fenotipos resistentes	69
5.9.2.1	Haplotipos y sensibilidad	69
5.9.2.2	Haplotipos y monorresistencia a Isoniacida	70
5.9.2.3	Haplotipos y monorresistencia a Rifampicina	71
5.9.2.4	Haplotipos y multidrogorresistencia	71
5.9.2.5	Haplotipos y extensa drogorresistencia	72
5.9.3	Haplotipos y Estado de Tratamiento	72
6	DISCUSIÓN	75
7	CONCLUSIONES	80
8	BIBLIOGRAFÍA	82
9	ANEXOS	94
9.1	Anexo 1: distribución de casos por departamentos, periodo 2011-2015	94
9.2	Anexo 2: prevalencias de mutaciones de detección directa.	95
9.3	Anexo 3: diversidad alélica de los 21 marcadores genéticos	96
9.4	Anexo 4: valores de índice de Asociación pareado para los 21 marcadores.	97
9.5	Anexo 5: estructura genética de los 134 haplotipos.	100
9.6	Anexo 6: distribución departamental de los haplotipos	103
9.7	Anexo 7: distribución de haplotipos ‘menos comunes’, Lima y Callao.	107
10	GLOSARIO	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Relación de sondas <i>rpoB</i> del ESL GenoType MTBDR <i>plus</i> v2.0.....	29
Tabla 2: Relación de sondas <i>katG</i> del ESL GenoType MTBDR <i>plus</i> v2.0.....	30
Tabla 3: Relación de sondas <i>inhA</i> del ESL GenoType MTBDR <i>plus</i> v2.0.	31
Tabla 4: Lista de concentraciones críticas del Método de Proporciones.	37
Tabla 5: Criterio de clasificación de haplotipos.	40
Tabla 6: Grupos poblacionales AMOVA.	42
Tabla 7: Distribución de casos incluidos en el estudio.	46
Tabla 8: Mutaciones que confieren resistencia a rifampicina.	48
Tabla 9: Mutaciones que confieren resistencia a isoniacida.....	49
Tabla 10: Estructuras génicas de los haplotipos comunes y menos comunes.	55
Tabla 11: Frecuencias absolutas de los haplotipos comunes y menos comunes.	56
Tabla 12: Resultados del AMOVA.....	61
Tabla 13: Índices de diversidad haplotípica según lugar de procedencia.....	66
Tabla 14: Haplotipos con resultados de asociación positiva.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sanatorio para tuberculosis.	17
Figura 2: Vista microscópica del bacilo <i>M. tuberculosis</i>	18
Figura 3: Clasificación taxonómica de <i>M. tuberculosis</i>	19
Figura 4: Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar.	20
Figura 5: Ingreso y escape de MTB de los alveolos pulmonares.	21
Figura 6: Cambios aminoacídicos en la RDRR del gen <i>rpoB</i>	23
Figura 7: Metabolismo y activación de la isoniacida.	24
Figura 8: Interpretación del ESL GenoType MTBDR \plus v2.0.	28
Figura 9: Proceso de anidación de los 21 marcadores de resistencia.	41
Figura 10: Casos con resistencia genotípica a rifampicina e isoniacida.	47
Figura 11: Índice de asociación de los 21 marcadores moleculares.	51
Figura 12: Correlación genética de marcadores pareados.	52
Figura 13: Histograma normalizado de frecuencias haplotípicas.	53
Figura 14: Representatividad de los haplotipos.	54
Figura 15: Fenograma de haplotipos representativos.	57
Figura 16: Distribución de frecuencias de los haplotipos representativos.	59
Figura 17: Distribución de haplotipos más representativos a nivel nacional.	60
Figura 18: Análisis discriminante de componentes principales.	62
Figura 19: Distribución de haplotipos comunes en Lima y Callao.	64
Figura 20: Representación gráfica de índices de Biodiversidad haplotípica.	67
Figura 21: Componentes de la diversidad beta en Lima y Callao.	68
Figura 22: Análisis de resultados discordantes para la resistencia a rifampicina.	70

RESUMEN

Introducción: en el Perú, la tuberculosis (TB) constituye un importante problema de salud pública, en especial, los casos producidos por cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). **Objetivos:** caracterizar haplotipos de cepas drogorresistentes de MTB y evaluar sus distribuciones a nivel nacional. **Métodos:** se crearon “haplotipos resistentes” mediante la concatenación de 21 sitios polimórficos (genes *rpoB*, *katG* e *inhA*) evaluados por el ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0. Se analizaron 6589 resultados de diagnóstico molecular realizados por el Instituto Nacional de Salud durante los años 2013-2015, así como resultados de diagnóstico fenotípico obtenidos por el Método de Proporciones en Agar 7H10. **Resultados:** se determinó la existencia de 3702 (56.26%) casos de TB-MDR, 2218 (33.7%) casos monorresistentes a isoniacida, y 669 (10.2%) casos monorresistentes a rifampicina. Las mutaciones de mayor prevalencia fueron: *rpoB* D516V, *rpoB* S531L, *katG* S315T e *inhA* c-15t. Se evidenció un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los sitios polimórficos analizados ($r_{BarD}=0.0215$). Se obtuvieron 134 haplotipos resistentes con un alto poder discriminatorio (IDHG=0.89), de los cuales 13 representaron al 87.9% del total de muestras analizadas. A nivel nacional, 22 localidades presentaron una alta biodiversidad de haplotipos resistentes, 04 una biodiversidad intermedia y 02 una baja biodiversidad. Se detectaron 231 casos discordantes de resistencia a rifampicina, posiblemente asociados con mutaciones controversiales. **Conclusión:** el análisis de haplotipos y mutaciones obtenidos por el ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 permite determinar la estructura de los principales genes determinantes de resistencia a rifampicina e isoniacida en las cepas drogorresistentes de MTB que circulan a nivel nacional.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, Haplotipo, GenoType MTBDR*plus* v2.0, drogorresistencia. Monorresistencia, TB-MDR.

ABSTRACT

Introduction: in Peru, tuberculosis (TB) constitutes a major Public Health problem, especially cases produced by drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

Objectives: to characterize haplotypes of drug resistant strains of MTB and to assess their

distributions nationwide. **Methods:** 'resistant haplotypes' were created by concatenating 21

polymorphic sites (*rpoB*, *katG* and *inhA* genes) evaluated by the ESL GenoType MTBDR*plus*

v2.0. 6589 molecular diagnostic results performed by the National Institute of Health during

the years 2013-2015 were analyzed, as well as phenotypic diagnostic results obtained by

the Agar Proportions Method 7H10. **Results:** the existence of 3702 (56.26%) cases of MDR-

TB, 2218 (33.7%) cases monoresistant to isoniazid, and 669 (10.2%) cases monoresistant

to rifampin was determined. The most prevalent mutations were: *rpoB* D516V, *rpoB* S531L,

katG S315T and *inhA* c-15t. A strong linkage disequilibrium was observed between the

polymorphic sites analysed ($r_{\text{BarD}} = 0.0215$). 134 resistant haplotypes with a high

discriminatory power (IDHG = 0.89) were obtained, of which 13 represented 87.9% of the

total samples analysed. At national level, 22 localities exposed a high biodiversity of resistant

haplotypes, 04 an intermediate biodiversity and 02 a low biodiversity. 231 discordant cases

of resistance to rifampicin were detected, possibly associated with controversial mutations.

Conclusion: the analysis of haplotypes and mutations obtained by the ESL GenoType

MTBDR*plus* v2.0 allows to determine the structure of the main rifampicin and isoniazid

resistance determining genes in drug resistant strains of MTB circulating nationwide.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Haplotype, GenoType MTBDR*plus* v2.0, Drug resistance. Monoresistance, MDR-TB.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más serias y la principal causa de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo (World Health Organization 2008). En nuestro país, la TB constituye un importante problema de salud pública, en especial, los casos drogorresistentes (TB-DR) producidos por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) resistentes a las drogas utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis. Dentro de este grupo, a los casos que son resistentes a los dos fármacos más potentes contra esta enfermedad, rifampicina (RIF) e isoniacida (INH), se les denomina “Tuberculosis Multidrogorresistente” (TB-MDR, *por sus siglas en inglés*), y los casos que adicionalmente muestran resistencia a alguna fluoroquinolona y a algún antibiótico inyectable de segunda línea se les denomina “Tuberculosis Extensamente Drogorresistente” (TB-XDR, *por sus siglas en inglés*); siendo esta última la forma más severa en la actualidad (Günther, van Leth, et al. 2015b; Matteelli, Roggi y Carvalho 2014; World Health Organization 2019). Adicionalmente, tanto la TB-MDR como la TB-XDR constituyen formas de esta patología que requieren un tratamiento caro, prolongado, menos efectivo y que a su vez producen una mayor morbilidad, toxicidad, recaídas y pobres resultados clínicos en las personas que las contraen. En el 2018, se reportó que la tasa de éxito de tratamiento fue de un 56% para pacientes con TB-MDR (o resistentes a rifampicina), mientras que para la TB-XDR solo fue del 39% (World Health Organization 2019). Esto genera grandes pérdidas económicas para los países, dado que la TB se produce mayormente en adultos en edad productiva. El costo unitario que supone un paciente con TB sensible para el período comprendido entre el 2005 al 2010 fue de US\$ 632, mientras que el de un paciente con TB-MDR fue de US\$ 13 769. Cabe precisar que estos montos representan el costo anual para el tratamiento por

paciente, incluido la pérdida de productividad durante el tratamiento (Ministerio de Salud - MINSA, Perú 2018), y según un estudio en países europeos, el costo por tratamiento de pacientes con TB-XDR al menos triplica el costo de tratamiento de un paciente TB-MDR (Günther, Gomez, et al. 2015a).

En la actualidad la TB dista de ser una enfermedad controlada, observándose en las últimas dos décadas un incremento en el número de casos, incluso en países desarrollados donde previamente se había logrado un descenso muy significativo. Así tenemos que en el 2018 existieron en promedio 10 (rango 9.1-11.1) millones de casos de pacientes con TB a nivel mundial, de los cuales 7 millones fueron pacientes nuevos (World Health Organization 2019). El Perú no es ajeno a la realidad mundial y, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), está considerado dentro de los 30 países con mayor carga de TB-MDR (o resistente a rifampicina) a nivel mundial. En el año 2018, reportó una incidencia del 3.4% de la TB-MDR entre los casos nuevos, y una incidencia del 18% para los casos antes tratados (World Health Organization 2019). Desde el año 1997 hasta el año 2014, se han detectado en nuestro país más de 15 mil casos de TB-MDR. El mayor número de casos de los mismos se han reportado en los últimos 10 años donde el promedio reportado por año superó los 1100 casos de TB-MDR, con una tendencia creciente en los últimos 4 años (Alarcón et al. 2017; Asencios et al. 2009; Vásquez C et al. 1997).

En el Perú, la vigilancia de la resistencia a medicamentos antituberculosis se realiza en base a los resultados fenotípicos de pruebas "*gold estandar*". Sin embargo, este método no tiene un poder discriminativo a nivel nucleotídico dado que la resistencia fenotípica a un determinado fármaco puede deberse a distintas mutaciones dentro de un mismo gen o a mutaciones localizadas en genes distintos, dando lugar a que no se pueda

determinar con exactitud el componente genético que subyace a la resistencia antituberculosis en nuestro país. Ante esta realidad, es necesario intensificar los estudios de epidemiología molecular para el análisis de las cepas del complejo *M. tuberculosis* y sus patrones de transmisión. Por lo tanto, mediante el análisis retrospectivo de las variantes genéticas detectadas a través del Ensayo de Sonda en Línea (ESL) GenoType MTBDR*plus* v2.0 se logrará determinar con exactitud los diferentes tipos de mutaciones causantes de la resistencia fenotípica a RIF e INH, a fin de caracterizarlas y tener un mayor conocimiento de las distribuciones y frecuencias de estas a lo largo del territorio peruano. Además, conociendo con anticipación que MTB presenta un comportamiento genéticamente monomórfico (Sreevatsan, Pan, Stockbauer, et al. 1997), se procederá a utilizar dichas mutaciones para la construcción de haplotipos genéticos representativos y conocer el tipo y grado de interrelación entre ellos.

1.2 Justificación de la investigación

La TB-DR es una enfermedad endémica en el Perú y amenaza seriamente los programas de control de la TB, a esto se suma que produce grandes pérdidas económicas al Estado por el tratamiento de cada paciente y la pérdida de años de vida productiva para el país (Ministerio de Salud - MINSA, Perú 2018). En este sentido, el control efectivo de la TB requiere tanto de un diagnóstico rápido para facilitar la pronta aplicación de la terapia adecuada, así como la realización de una vigilancia en tiempo real de las cepas drogorresistentes circulantes a nivel nacional. Ante esto, el ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 provee una herramienta adecuada y práctica para estos fines, ya que permitir caracterizar las mutaciones existentes en cada muestra analizada. El conocimiento de estas mutaciones y haplotipos resistentes, que circulan en nuestro territorio, así como de sus respectivas frecuencias, provee de información útil para el

correcto diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los patrones de transmisión de las cepas de la TB-DR. Ante esto, la evaluación retrospectiva de la información genotípica y fenotípica, existente entre los años 2011 al 2015, de cepas TB-DR permitirá determinar las mutaciones y haplotipos que determinan la drogorresistencia de MTB a nivel nacional. Así mismo, se podrá determinar la estructura genética y geográfica de los marcadores de resistencia, lo cual complementará los estudios de epidemiología molecular en el Perú. Finalmente, el análisis genotípico de la resistencia también permitirá sentar las bases para próximos estudios de diseño de nuevas tecnologías de diagnóstico molecular que se realizarán en nuestro país, así como de métodos de epidemiología molecular de mayor poder resolutivo.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Historia de la tuberculosis

La TB ha sido documentado desde tiempos remotos en Grecia, donde Hipócrates reconoció la enfermedad, y fue denominada *Phthisis*. Luego, en la Edad Media se evidenció una nueva forma de TB que afectaba los nódulos linfáticos cervicales llamada 'Escrófula'. Así mismo, en Inglaterra y Francia fue conocida como "Mal del Rey", y se creía que las personas afectadas podrían sanarse mediante un "Toque real" (imposición de manos que realizaban los reyes de Inglaterra y Francia sobre sus súbditos para curar enfermedades) (Murray, Rieder y Finley-Croswhite 2016). En el siglo XVIII en Europa Occidental la TB llegó a convertirse en una epidemia mortal con tasas tan altas como 900 muertes por cada 100,000 habitantes por año, y con mayor incidencia en la población joven, motivo por el cual fue llamada 'El ladrón de jóvenes'. Así mismo, la palidez anémica extrema de las personas afectadas con TB originó un nuevo término: "la plaga blanca" (Daniel 2006). Fue en 1720 cuando el físico inglés Benjamin Marten

planteó por primera vez la posible existencia de un origen infeccioso de la TB. Luego, en el siglo XIX, se estableció la introducción y uso de sanatorios (casas de curación) en zonas de temperatura templada como la primera medida curativa. Esta idea fue descrita por primera vez en la tesis doctoral del estudiante botánico Hermann Brehmer, quien también padeció de TB y se curó luego de un viaje a las montañas del Himalaya (Daniel 2011) (Figura 1). En 1865, el médico cirujano francés, Jean-Antoine Villemin, demostró la naturaleza infecciosa de la TB mediante la inoculación, en conejos de laboratorio, de líquidos purulentos extraídos de las cavidades tuberculosas pulmonares de pacientes fallecidos (Villemin 1865).

Finalmente, en 1882, el famoso científico Robert Koch fue capaz de aislar por primera vez al bacilo causante de la TB. Usando el colorante azul de metileno, él logró identificar, aislar y cultivar el bacilo en suero animal. Presentó sus extraordinarios resultados en la Sociedad de Fisiología de Berlín logrando un hito en la lucha contra la TB. En las décadas siguientes, se descubrió la prueba de tuberculina de Pirquet y Mantoux y la vacuna del Bacilo de Calmette y Camille Guérin (BCG), la cual fue empleada ampliamente después de la primera guerra mundial. Esta vacuna contra la TB fue probada por primera vez en humanos en 1921 y es suministrada a infantes como una práctica estándar desde 1974 (Somasundaram, Ram y Sankaranarayanan 2014).

La era moderna en el tratamiento y control de la TB llegó con el descubrimiento de la estreptomicina en 1944, el primer fármaco antituberculosis, la cual fue desarrollada durante la segunda guerra mundial por Selman Waksman (Daniel 2006; Luca y Mihaescu 2013). Sin embargo, el tratamiento que usó solo estreptomicina condujo al desarrollo de cepas resistentes a dicho fármaco. Ante lo cual, estudios posteriores guiaron hacia el tratamiento combinado de estreptomicina y ácido p-aminosalicílico. En

1952 se introdujo la isoniacida y se demostró que era más potente que la estreptomina y el ácido p-aminosalicílico. Luego, en 1967, la rifampicina fue introducida al tratamiento en combinación con los otros fármacos antituberculosos (Somasundaram, Ram y Sankaranarayanan 2014).



Figura 1. Sanatorio para tuberculosos. Fotografía de 1899, Hospital Nacional Jewish. Pacientes de tuberculosis tratados con la luz solar y aire fresco.

2.2 Patogénesis de la tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. MTB en conjunto con otras especies bacterianas de similaridad genética (*M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. suricattae* y *M. mungi*) conforman el denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (Sinha et al. 2016). La mayoría de estas bacterias han sido reconocidas como causantes de la tuberculosis en humanos. Sin embargo, la más conocida y estudiada

es MTB ya que es el agente principal de infección en más de un tercio de la población mundial y también es capaz de infectar animales que están en contacto con los humanos (Forrellad et al. 2013) (Figura 2).

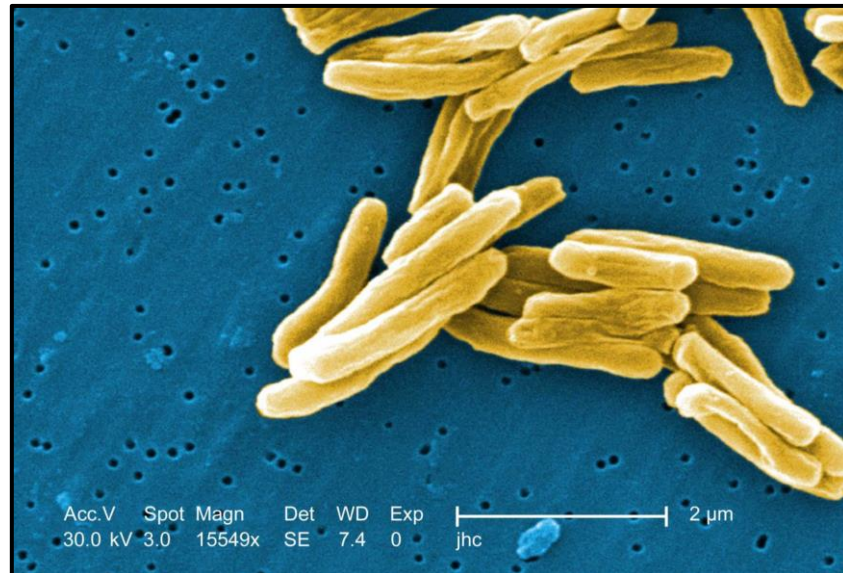


Figura 2. Vista microscópica del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Imagen de bacilos de *M. tuberculosis* a través del microscopio electrónico de barrido. Créditos de imagen: Janice Haney Carr / Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

En 1986 el género *Mycobacterium* fue clasificado dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, orden actinomycetales y clase *Actinomycetes*. Esta clasificación temprana fue basada en uno o más caracteres morfológicos (forma de barra, inmóvil, caracteres, y la capacidad de resistencia a decoloración con alcohol ácido). Sin embargo, en la actualidad la clasificación taxonómica de las Micobacterias, al igual que muchas otras especies, está basado en los patrones de divergencia evolutiva obtenidos en los árboles filogenéticos construidos con la secuencia génica del RNA ribosomal 16S (16S rRNA). Lo cual trajo consigo que la familia *Mycobacteriaceae* quede comprendida dentro del orden *Corynebacteriales* (Gao y Gupta 2012) (Figura 3).

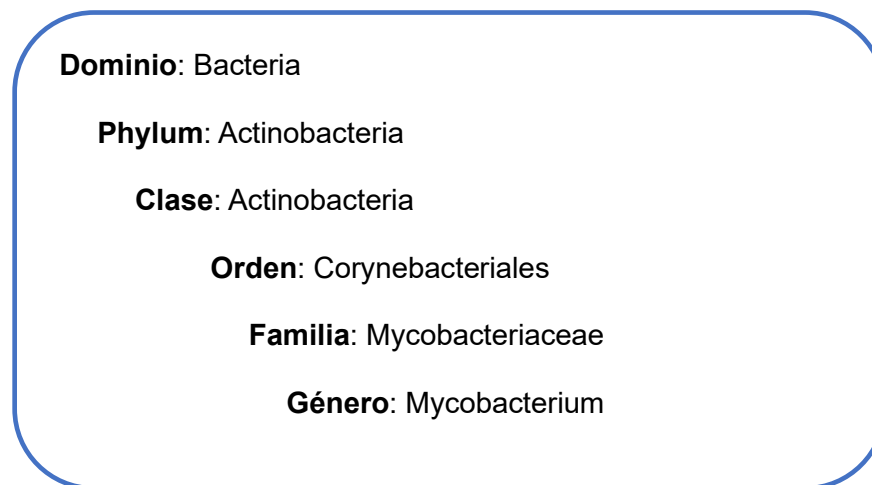


Figura 3. Clasificación taxonómica de *Mycobacterium tuberculosis*.

Fuente: NCBI, *Taxonomy ID:* NCBI: txid747078

MTB es un bacilo ácido-alcohol resistente que típicamente afecta los pulmones (**TB pulmonar**), pero también puede afectar otros órganos (**TB extrapulmonar**) (Figura 4). La enfermedad se contagia de manera directa cuando una persona que padece de TB pulmonar expulsa bacterias hacia el aire (por ejemplo, a través de la tos) las cuales ingresan a las vías respiratorias de una persona sana ubicada cercanamente. Como resultado las personas pueden desarrollar una enfermedad activa o la infección puede permanecer latente, pudiéndose desarrollar más adelante o permanecer siempre inactiva (Cliff et al. 2015; Coscolla y Gagneux 2014). La mayoría de las personas expuestas a bacilos de MTB no llegan a desarrollar la enfermedad y adquieren un estado de infección latente de TB en el cual no pueden diseminar la infección hacia otras personas. El proceso de la TB latente comienza cuando los bacilos extracelulares son ingeridos por los macrófagos y presentados hacia otros glóbulos blancos. Esto desencadena una respuesta inmunitaria en la cual los glóbulos blancos encapsulan la mayoría de los bacilos, dando como resultado la formación de un granuloma. En este punto, se ha conseguido contener la infección y estamos frente a una Infección latente

de TB (Figura 5A). Sin embargo, en algunas personas el bacilo de MTB supera las barreras del sistema inmunitario y se multiplica dando consigo una progresión desde la infección latente hasta el desarrollo de la enfermedad de TB (Figura 5B).

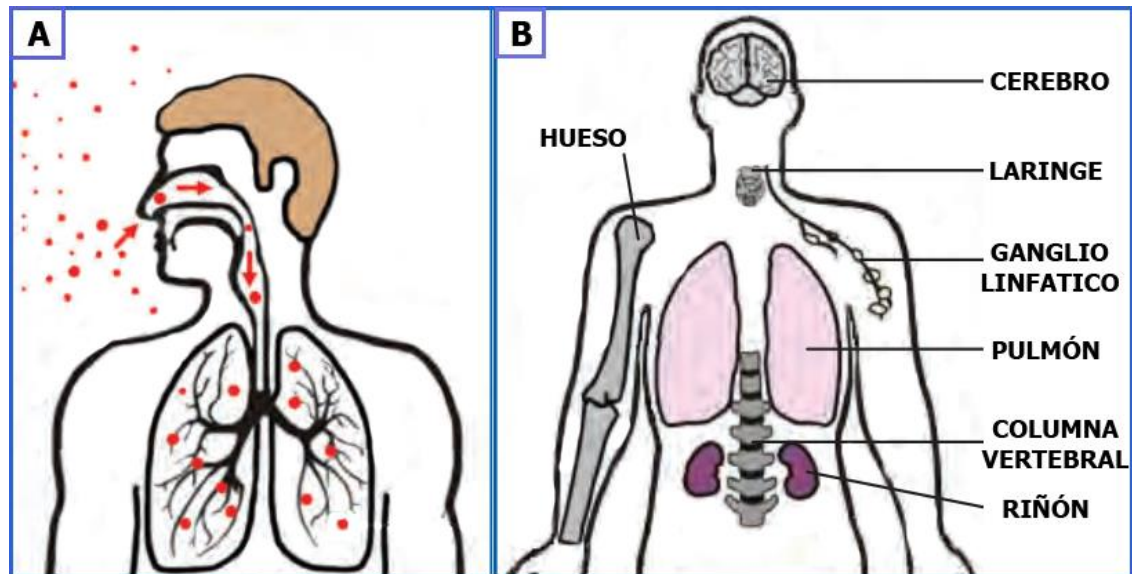


Figura 4. Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. A) TB pulmonar. Aerosoles conteniendo bacilos de MTB luego de ser inhalados entran a los pulmones y viajan hasta los alveolos. B) TB extrapulmonar. Un pequeño número de bacilos de MTB ingresan a la sangre y se diseminan a través del cuerpo. Los bacilos pueden alcanzar cualquier parte del cuerpo incluyendo áreas donde existen una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad, tales como cerebro, laringe, ganglios linfáticos, columna vertebral, huesos o riñones.

Estas personas usualmente pueden transmitir la bacteria hacia otras personas. La progresión de la infección latente hacia la enfermedad de TB puede ocurrir en cualquier momento, desde el momento de la infección inicial hasta después de muchos años. En general, sólo entre el 5-15% de un estimado de 1.7 billones de personas infectadas con MTB desarrollarán la enfermedad de la tuberculosis durante su vida. Sin embargo, la probabilidad de desarrollar la enfermedad es mucho mayor entre personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), y en personas afectadas por factores

de riesgo como la desnutrición, diabetes, consumo de alcohol y tabaco, que debilitan el sistema inmunitario (World Health Organization 2017).

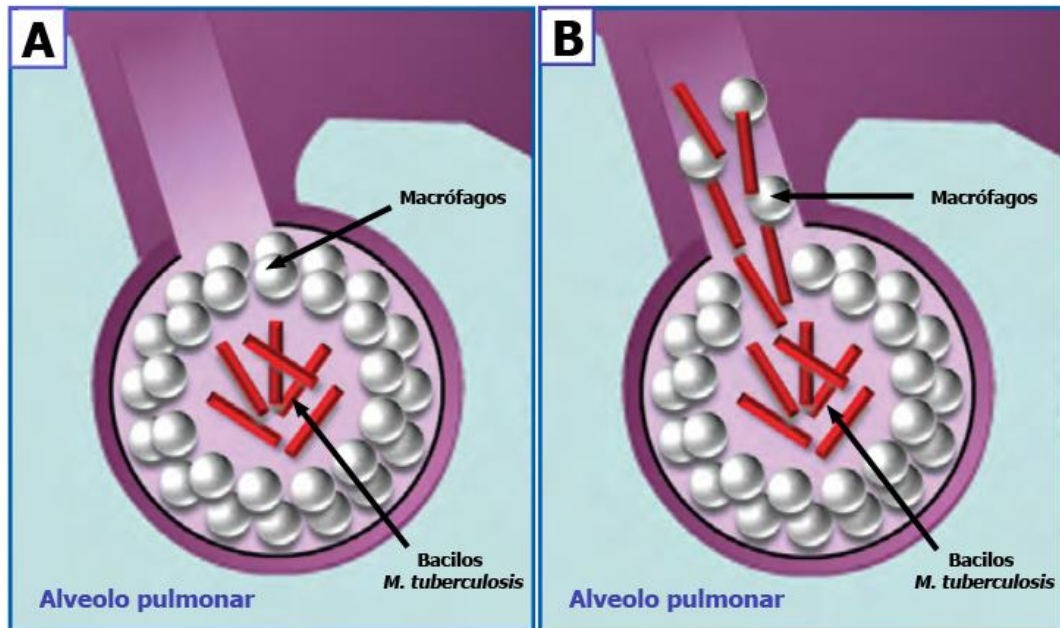


Figura 5. Ingreso y diseminación de MTB desde los alveolos pulmonares.

A) luego del ingreso de los bacilos de MTB al alveolo pulmonar pasarán entre 2 a 8 semanas para que células del sistema inmunitario (macrófagos) ingieran y envuelvan a los bacilos. Las células forman una barrera protectora llamada granuloma, el cual mantiene a los bacilos en contención y bajo control (Infección latente de tuberculosis). B) Si el sistema inmunitario no puede mantener el bacilo de MTB bajo control, el bacilo comenzará a multiplicarse rápidamente (enfermedad de tuberculosis).

2.3 Fármacos antituberculosis

2.3.1 Rifampicina

La rifampicina (3-[[[4-Metil-1-piperazinil]imino]metil]rifamicina) es un antibiótico lipofílico de amplio espectro y fue introducida en el año 1972 como droga antituberculosa de actividad esterilizante (Ashok, Awdhesh y Nishat 1998). Este fármaco interfiere en la transcripción bacteriana, a través del bloqueo en la actividad

de la RNA polimerasa dependiente de ADN (compuesta por las subunidades α , β , β' y σ , codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente). La rifampicina se une fuertemente a dicha enzima e inhibe la iniciación y elongación de la cadena de RNA. Específicamente inhibe la transición en la síntesis de pequeños oligoribonucleótidos hasta transcritos completos a través del mecanismo de oclusión estérica (Somasundaram, Ram y Sankaranarayanan 2014). Las mutaciones que predominan en las cepas de MTB resistentes a rifampicina están localizadas en una secuencia de 81 pares de bases denominada 'Región Determinante de Resistencia a Rifampicina' (RDRR) del gen *rpoB*, la cual comprende los codones 507 al 533. En esta región se encuentran las mutaciones asociadas a resistencia en el 95% de cepas resistentes a este fármaco (Bártfai et al. 2001; Telenti et al. 1993) (Figura 6). En la actualidad existen al menos 87 variaciones genéticas entre mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones a nivel de la RDRR (Song et al. 2016). Las más frecuentes son las mutaciones en codones para ácido aspártico-516 (asp516), histidina-526 (his526) y serina-531 (ser531) (Agapito et al. 2002; Almeida Da Silva y Palomino 2011; Caws et al. 2006; Telenti et al. 1993).

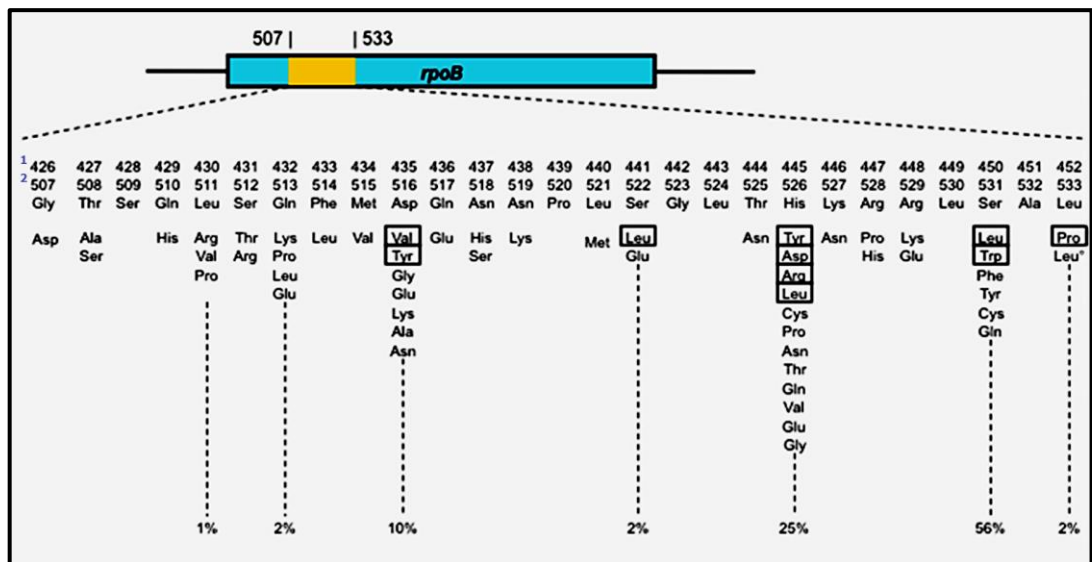


Figura 6. Cambios aminoacídicos en la RDRR del gen *rpoB*. Los aminoácidos son representados mediante códigos de tres letras. El estudio realizado señala que solamente entre los codones 516, 526 y 531 se abarca más del 90% de mutaciones de resistencia a rifampicina. Esquema publicado en “*Isoniazid and Rifampicin as Therapeutic Regimen in the Current Era: A Review*” (Somasundaram, Ram y Sankaranarayanan 2014). **1:** los codones son numerados de acuerdo con el genoma completo de MTB (N° de acceso GenBank: NC_000962.3), y **2:** los codones son numerados de acuerdo con el gen *rpoB* de *E. coli*.

2.3.2 Isoniacida

La isoniacida (hidracida del ácido isonicotínico) es un potente fármaco antituberculoso descubierto en 1952. Su acción bacteriostática actúa bloqueando la biosíntesis de los ácidos micólicos, el cual es un componente esencial en la pared celular de MTB. La isoniacida es una prodroga que llega ser activada *in vivo* mediante la acción de la enzima micobacteriana catalasa-peroxidasa, la cual es codificada por el gen *katG* (Lei, Wei y Tu 2000). La catalasa-peroxidasa cataliza la producción de un radical nicotinilo que subsecuentemente interactúa con el NAD y NADP micobacterial para producir diversos aductos (Argyrou et al. 2006). Uno de éstos, el aducto formado entre el radical nicotinilo y el NAD, inhibe la actividad de la proteína portadora de la enoil acil reductasa (codificada por el gen *inhA*), y la sintetasa de proteínas portadoras de cetoacilos β (codificada por el gen *kasA*). La inhibición de estas enzimas produce la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos conllevando a la muerte celular. Otro importante aducto es formado entre el radical nicotinilo y el NADP, el cual potencialmente inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa, lo cual interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos (Figura 7). Otros productos de la activación *in vivo* de la isoniacida incluyen superóxido (H_2O_2), hidroperóxidos de alquilo y radicales de óxido nítrico, los cuales también contribuyen con los efectos bactericidas de la isoniacida (Brunton, Chabner y Knollman 2011).

Las mutaciones que causan la resistencia a isoniacida están localizadas en muchos genes y regiones distintas (Slayden y Barry 2000); sin embargo, aproximadamente entre el 50-95% de las cepas resistentes contienen mutaciones en el codón 315 (ser315) del gen *katG*, siendo las más frecuente la sustitución del aminoácido serina por treonina (S315T) (Mokrousov et al. 2002; Telenti et al. 1997); además el 20-35% contienen mutaciones en la región promotora del gen *inhA* (Musser et al. 1996; Piatek et al. 2000; Telenti et al. 1997) y, por último, el 10-15% tienen mutaciones en la región intergénica *ahpC-OxyR* (Kelley, Rouse y Morris 1997; Piatek et al. 2000; Sreevatsan, Pan, Zhang, et al. 1997; Telenti et al. 1997).

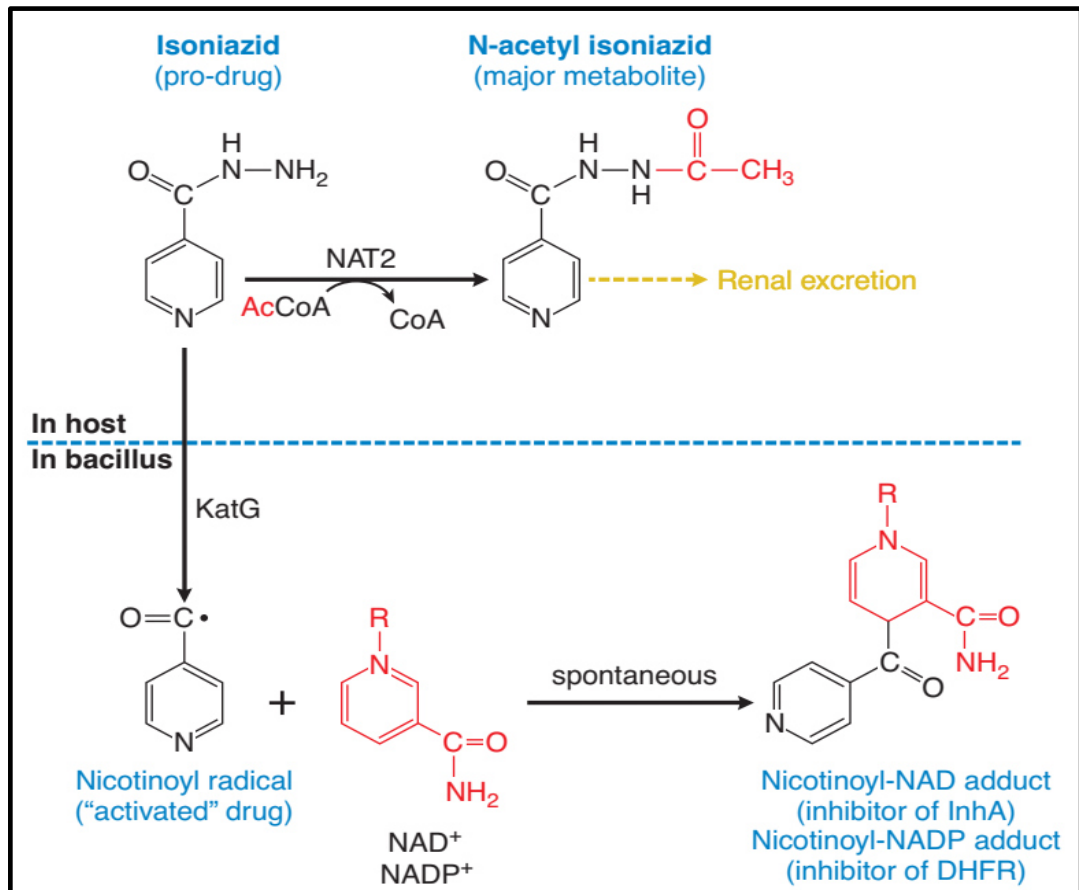


Figura 7. Metabolismo y activación de la isoniacida. En los seres humanos, la prodroga es metabolizada por isoformas del NAT2 (N-Acetiltransferasa 2) hasta su metabolito principal, N-acetil isoniacida, el cual es excretado a través del riñón. La isoniacida entra a la bacteria mediante difusión pasiva donde es "activado" por la

enzima catalasa peroxidasa hasta el radical nicotinílo, el cual reacciona de manera espontánea con el NAD⁺ y NADP⁺ para producir aductos que inhiben enzimas importantes en la síntesis de la pared celular y ácidos nucleicos. DFHR: dihidrofolato reductasa. Fuente: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, capítulo 56.

2.4 Diagnóstico y susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*

Actualmente, las pruebas microbiológicas de susceptibilidad a drogas antituberculosis conforman el “*Gold estandar*” en el tratamiento de la TB. Estas pruebas determinan la sensibilidad o resistencia de las cepas de MTB en base al desarrollo de éstas frente a concentraciones críticas (CC) de determinados fármacos antituberculosis. Sin embargo, el tiempo de duplicación de MTB es entre 15 a 20 horas lo cual dificulta la obtención rápida y oportuna de un diagnóstico adecuado. Ante esto, recientes avances en el diagnóstico molecular han facilitado el desarrollo de pruebas genotípicas rápidas que detectan mutaciones asociadas a resistencia en MTB. Entre las pruebas moleculares actualmente recomendadas por la OMS se encuentran: el ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0, el ESL GenoType MTBDRs/ v2.0 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) y el GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), las cuales se encargan de detectar mutaciones puntuales que confieren resistencia a drogas de primera y segunda línea. Finalmente, el GenoType MTBDR*plus* v2.0 ha sido incorporado en las políticas de Salud Pública de muchos países luego de pasar diversos procesos de validación a nivel local y mundial. Éste método obtuvo excelentes resultados de sensibilidad (en promedio superior al 91%) y especificidad (en promedio superior al 98%), demostrando su gran exactitud en el diagnóstico de susceptibilidad farmacológica frente a rifampicina e isoniacida (Bai et al. 2016). Asimismo, en el año 2011 el Perú realizó la validación de esta prueba molecular y la incorporó en su flujograma de diagnóstico y detención de

mutaciones de resistencia para muestras positivas a TB (Asencios et al. 2012; Puyén et al. 2016).

2.4.1 Ensayo de Sonda Lineal, GenoType MTBDR*plus* v2.0

El ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 es una prueba molecular rápida de tipo cualitativo utilizada en la identificación *in vitro* del CMTB y la determinación de la resistencia a RIF y/o INH a partir de muestras pulmonares con baciloscopia positiva. Este ensayo genético molecular está basado en la tecnología de “tiras de ADN” (DNA-*strip*) para la hibridación reversa de sondas de ADN específicas de determinadas mutaciones. La identificación de resistencia a RIF se lleva a cabo mediante la detección directa de las mutaciones con fuerte asociación estadística y experimental ubicadas en el gen *rpoB*. Para la detección de cepas de MTB con altos niveles de resistencia a isoniacida se analiza el gen *katG*, (Ando et al. 2010; Pym, Saint-Joanis y Cole 2002; Wengenack et al. 1997), y para la detección de aquellas con bajos niveles de resistencia a isoniacida se analiza la región promotora del gen *inhA* (Niehaus et al. 2015).

Cada tira reactiva del ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 está conformada por 27 sondas de hibridación, de las cuales las tres primeras corresponden a sondas de la **zona control**: sonda CC (control de conjugado), sonda AC (control de amplificado) y sonda TUB (control de CMTB). Luego se encuentran 13 sondas correspondientes a la **zona de resistencia a rifampicina**, la cual incluye una sonda de control de locus (sonda *rpoB*), 8 sondas tipo salvaje (*rpoB* WT1, *rpoB* WT2, *rpoB* WT3, *rpoB* WT4, *rpoB* WT5, *rpoB* WT6, *rpoB* WT7 y *rpoB* WT8) y 4 sondas tipo mutantes (*rpoB* MUT1, *rpoB* MUT2A, *rpoB* MUT2B y *rpoB* MUT3). Luego, se encuentra la **zona de**

resistencia a isoniacida, la cual comprende el análisis del gen *katG* con una sonda control de locus (sonda *katG*), una sonda salvaje (*katG* WT1) y dos sondas mutantes (*katG* MUT1 y *katG* MUT2), y la región promotora del gen *inhA* con una sonda control de locus (sonda *inhA*), dos sondas salvajes (*inhA* WT1 y *inhA* WT2) y cuatro sondas mutantes (*inhA* MUT1, *inhA* MUT2, *inhA* MUT3A y *inhA* MUT3B) (Figura 8).

Brevemente, la presencia de la sonda CC documenta una eficiente unión del conjugado a la tira reactiva, además de una adecuada reacción de sustrato. La presencia de la sonda AC evidencia que los procesos de Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (PCR multiplex) han sido exitosos, descartándose errores durante el proceso de amplificación o presencia de inhibidores de la PCR. La presencia de la sonda TUB es indicativo de que la muestra analizada pertenece al CMTB. Las sondas de control de locus (sondas *rpoB*, *katG* e *inhA*) detectan una región génica específica para el respectivo locus. Las sondas de tipo salvaje (WT) contienen las secuencias nucleotídicas sin ninguna mutación de resistencia. La presencia de todas las sondas salvaje de un gen (reacción positiva) se corresponde con la ausencia de todas las sondas mutantes (MUT) lo cual es indicativo de que la muestra analizada es sensible para el respectivo antibiótico. En caso de que exista una mutación, el respectivo amplicón conteniendo la mutación no se llegará a unir a la respectiva sonda salvaje. Por lo tanto, la ausencia de al menos una sonda salvaje evidenciará que la muestra analizada es resistente para el respectivo antibiótico.

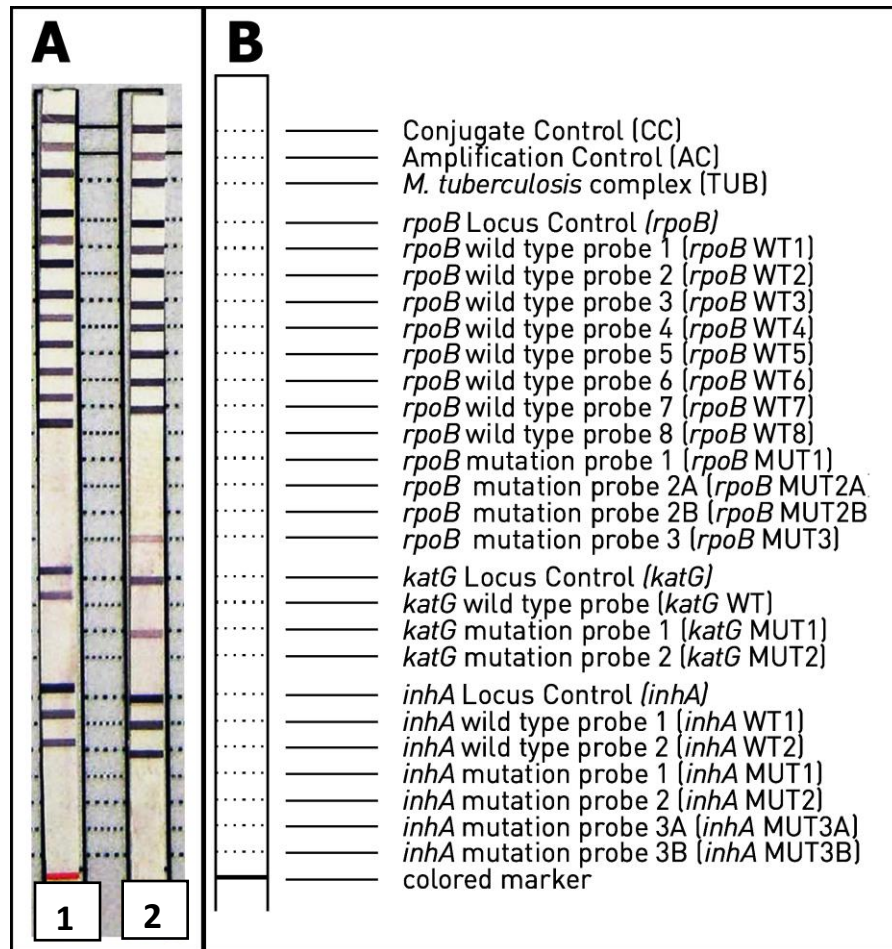


Figura 8: Interpretación del ESL GenoType MTBDRplus v2.0. A) La tira “1” evidencia una muestra sensible para ambas drogas, mientras que la tira “2” evidencia una muestra resistente a ambas drogas (TB-MDR) por reacción positiva de dos sondas mutantes en los genes *rpoB* (*rpoB* MUT3) y *katG* (*katG* MUT1). B) representación esquemática de la distribución de sondas existentes en la tira reactiva GenoType MTBDRplus v2.0.

2.4.1.1 Zona de resistencia a rifampicina

El ESL GenoType MTBDRplus v2.0, a través de las sondas tipo salvaje o silvestre (*wildtype*), cubre toda la RDRR del gen *rpoB*. Para tal efecto cuenta con 8 sondas tipo salvaje, las cuales a través de la ausencia de al menos una de ellas evidencian

de manera **indirecta** la presencia de una mutación resistente. Adicionalmente, cuenta con cuatro sondas mutantes que evidencian la presencia de las cuatro mutaciones más prevalentes asociados a la resistencia a rifampicina. Estas ayudan a determinar de manera **directa** y exacta el cambio mutacional que se encuentra presente en la muestra analizada (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de sondas *rpoB* del ESL GenoType MTBDRplus v2.0. Se especifican las 4 mutaciones detectadas de manera directa en el gen *rpoB*. La numeración de codones está basada en el gen *rpoB* de *E. coli* y fue establecida por Telenti y colaboradores (Telenti et al. 1993); mientras que la numeración ubicada entre paréntesis está basada en el genoma referencial de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3).

Sondas salvajes	Codones analizados	Sondas mutantes	Mutación
<i>rpoB</i> WT1	505-509		
<i>rpoB</i> WT2	510-513		
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V (D435V)
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y (H445Y) H526D (H445D)
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L (S450L)

Así se tiene que la existencia de la mutación causante del cambio del aminoácido ácido Aspártico por Valina en el codón 516 (D516V) causará una reacción negativa en la ubicación de las sondas *rpoB* WT3 y *rpoB* WT4, pero una reacción positiva en la sonda *rpoB* MUT1, dado que esta última contiene la secuencia nucleotídica de dicha mutación. Del mismo modo, el cambio aminoacídico de Histidina por Tirosina o ácido Aspártico en el codón 526 (H526Y o H526D, respectivamente) provocará una reacción negativa en la sonda *rpoB* WT7, mientras una reacción

positiva en la sonda *rpoB* MUT2A o *rpoB* MUT2B, respectivamente. Finalmente, la presencia de la mutación causante del cambio aminoacídico de Serina por Leucina en el codón 531 (S531L) traerá consigo una reacción negativa en la sonda *rpoB* WT8 y una reacción positiva en la sonda *rpoB* MUT3. Ante esto, se tiene que la reacción negativa de al menos en una sonda salvaje sería indicativo de la existencia de una mutación causante de resistencia a rifampicina (Hain Lifescience 2012).

2.4.1.2 Zona de resistencia a isoniacida

Gen *katG*

El ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 analiza únicamente el codón 315 del gen *katG* mediante una sonda salvaje (*katG* WT1) y dos sondas mutantes (*katG* MUT1 y *katG* MUT2) para la detección **directa** de mutaciones resistentes de alta prevalencia (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de sondas *katG* del ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0. Se analiza el codón 315 del gen *katG*. Se especifica la detección directa de dos mutaciones que producen el mismo cambio aminoacídico; sin embargo, la diferencia entre ambas se presenta a nivel nucleotídico.

Sondas salvajes	Codones analizados	Sondas mutantes	Mutación
<i>katG</i> WT1	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

Por lo tanto, ante la ausencia de una mutación en el codón 315 se evidenciará una reacción positiva en la sonda salvaje y reacciones negativas en ambas sondas

mutantes. Mientras que la presencia de mutaciones causantes del cambio aminoacídico de Serina por Treonina, S315T1 o S315T2 (cambio AGC → ACC o AGC → ACA, respectivamente (Brossier et al. 2006)) será evidenciada mediante la reacción negativa en la sonda salvaje y la reacción positiva en la sonda mutante *katG* MUT1 o *katG* MUT2 respectivamente. Además, la sola ausencia de la banda de reacción con la sonda salvaje (y ausencia de hibridación con las sondas mutantes) sería indicativo de una detección indirecta de alguna mutación resistente a isoniacida.

Gen *inhA*

El ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 permite analizar directamente la región promotora del gen *inhA*. Exactamente, evalúa las posiciones -8, -15 y -16 de la región promotora del gen *inhA*. A través de la sonda salvaje *inhA* WT1 se cubre las posiciones nucleotídicas -15 y -16, mientras que a través de la sonda salvaje *inhA* WT2 cubre la posición -8. Asimismo, cuenta con 4 sondas mutantes (*inhA* MUT1, *inhA* MUT2, *inhA* MUT3A e *inhA* MUT3B) las cuales permitirán detectar de manera directa mutaciones asociadas a resistencia frente a isoniacida que se hayan generado en cualquiera de las tres posiciones antes mencionadas (Tabla 3).

Tabla 3: relación de sondas *inhA* del ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0. Se analiza la región promotora del gen *inhA*. Las mutaciones son señaladas a nivel nucleotídico.

Sondas salvajes	Codones analizados	Sondas mutantes	Mutación
<i>inhA</i> WT1	-15 -16	<i>inhA</i> MUT1 <i>inhA</i> MUT2	c-15t a-16g
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A <i>inhA</i> MUT3B	t-8c t-8a

La ausencia de mutaciones en cualquiera de las tres posiciones analizadas provocará que sucedan reacciones positivas en ambas sondas salvajes y reacciones negativas en todas las sondas mutantes. Sin embargo, la ocurrencia del cambio nucleotídico Citosina por Timina en la posición -15 traerá consigo la reacción negativa en la sonda salvaje *inhA* WT1 y la reacción positiva en la sonda mutante *inhA* MUT1. Así mismo, el cambio nucleotídico de Adenina por Guanina en la posición -16 traerá consigo la reacción negativa en la sonda salvaje *inhA* WT1 y la reacción positiva en la sonda mutante *inhA* MUT2. Además, el cambio de Timina por Citosina en la posición -8 traerá consigo la reacción negativa en la sonda salvaje *inhA* WT2 y la reacción positiva en la sonda mutante *inhA* MUT3A. Finalmente, la sustitución del nucleótido Timina por Adenina nuevamente en la posición -8 traerá consigo la reacción negativa en la sonda salvaje *inhA* WT2 y la reacción positiva en la sonda mutante *inhA* MUT3B. Finalmente, la sola ausencia de hibridación con la sonda salvaje (y ausencia de ambas sondas mutantes) sería indicativo de una detección indirecta de alguna mutación resistente a isoniacida.

2.5 Haplotipos genéticos

Los haplotipos genéticos están constituidos por grupos de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP, *por sus siglas en inglés*) de uno o más genes presentes en un mismo cromosoma, los cuales al estar muy cercanos entre sí tienden a heredarse juntos. Esto quiere decir que los alelos de un haplotipo no se separan por algún proceso de recombinación y pueden transmitirse “en bloque”, lo que permite establecer combinaciones de variaciones dentro de un gen que pueden estar asociados con determinados fenotipos.

La variabilidad genética de poblaciones clonales, por ejemplo bacterias, es fundamental para su comportamiento adaptativo. Los genes específicos del entorno, sujetos a una selección relajada en un entorno no inductor, generan variaciones crípticas que mejoran el potencial de adaptación (Pfennig et al. 2010). Sin embargo, los entornos inductores, tal como la presión selectiva debido al uso de fármacos antibacterianos, generan un potencial de adaptación a aquellas cepas que contienen variantes genéticas que les proveen de una ventaja adaptativa. Incluso cuando se inicia la evolución de un sólo clon (haplotipo) bajo una presión de selección severa, la combinación de la tasa de mutación y el tamaño de la población son suficientes como para generar una variación genética en la población (Barrick y Lenski 2009; Lang, Botstein y Desai 2011), dando lugar a una mezcla de haplotipos cercanamente relacionados (o cepas). Como resultado se obtiene que las poblaciones no son genéticamente uniformes en la mayor parte del tiempo (Kao y Sherlock 2008).

La obtención de los haplotipos en una población bacteriana es capaz de revelar la estructura de la población, o estructura de los genes, y sus características evolutivas (Pulido-Tamayo et al. 2015). Así mismo, la obtención de haplotipos bacterianos permite elegir los tratamientos adecuados contra las enfermedades causadas por haplotipos específicos en una población.

El presente estudio busca analizar la diversidad genética subyacente a las cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* que circulan en el territorio peruano utilizando la información de variantes genéticas presentes a nivel de los genes de resistencia que son evaluados por el ESL GenoType MTBDR_{plus} v2.0.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Determinar la estructura genética de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes que circularon en el Perú, entre los años 2011 al 2015, usando los marcadores de resistencia del ensayo de sonda en línea GenoType MTBDR*plus* v2.0.

3.2 Objetivos específicos

- Calcular las frecuencias de las mutaciones detectadas en la prueba GenoType MTBDR*plus* v2.0 que confieren resistencia a la rifampicina e isoniacida, y comparar la distribución de frecuencias entre cada uno de los años de estudio.
- Determinar los haplotipos de cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en base a los principales marcadores génicos del ensayo de sonda lineal GenoType MTBDR*plus*.v2.0.
- Determinar y comparar la distribución geográfica de los haplotipos definidos a través de los años 2011 al 2015.
- Determinar la existencia de una asociación genética entre determinados haplotipos y las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes (TB-MDR), cepas monorresistentes a rifampicina, cepas monorresistentes a isoniacida y cepas extensamente drogorresistentes (TB-XDR), determinadas por el Método de Proporciones de Agar 7H10.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio descriptivo presenta un corte retrospectivo y analiza la información genética de los principales marcadores asociados a la resistencia frente a rifampicina e

isoniacida en cepas drogorresistentes de MTB que circularon en el Perú entre los años 2011-2015. Para este fin, se utilizaron datos de diagnósticos emitidos con anterioridad, razón por lo cual no se realizó experimentación alguna con las cepas ni con las personas de las cuales provinieron las muestras.

4.1 Población

Se seleccionaron 6589 muestras drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de un total de 39,453 resultados de pruebas diagnósticas del ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 realizadas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) del Instituto Nacional de Salud (INS). El periodo analizado comprendió los años 2011-2015. La población de estudio estuvo conformada por cepas provenientes de los 24 departamentos del Perú, y la provincia constitucional del Callao.

4.2 Material de laboratorio

- Tiras de resultados de diagnóstico molecular con patrones drogorresistentes del ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 emitidos durante los años 2011 al 2015.

4.3 Selección de casos

- **Criterios de inclusión**

- Resultados de diagnóstico molecular de cepas multidrogorresistentes y monorresistentes.
- Resultados de diagnóstico molecular de cepas con patrones de bandas de hibridación que estén de acuerdo con los controles de calidad y resultados

válidos según especificaciones del proveedor (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany).

- Resultados de diagnóstico molecular de cepas emitidos durante el periodo 2011-2015.

▪ **Criterios de exclusión**

- Resultados de diagnóstico molecular de cepas con sensibilidad simultánea para RIF e INH.
- Resultados de diagnóstico molecular de cepas que no posean las bandas de control (control de amplificado [AC], control de conjugado [CC] y los respectivos controles de locus génico [*rpoB*], [*katG*] e [*inhA*]).
- Resultados de diagnóstico molecular de cepas que no pertenezcan al complejo MTBC (ausencia de banda TUB)
- Resultados de diagnóstico molecular de cepas heteroresistentes (patrón sensible y resistente, presentes de modo simultáneo, para un determinado locus génico).
- Resultados de diagnóstico molecular de pacientes repetidos.

4.4 Obtención de datos

Se realizó la construcción de una base de datos con el programa informático *Microsoft Excel* v2013. Se analizó la presencia o ausencia de bandas de hibridación comprendidas en los tres locus génicos (*rpoB*, *katG* e *inhA*) del ESL. Esta base de datos fue creada en formato binario de acuerdo con el siguiente criterio: la presencia de banda

de hibridación fue nominada con el valor de uno (1), mientras que la ausencia de banda de hibridación fue nominada con el valor de cero (0).

4.5 Obtención de Metadatos

Se obtuvo la información epidemiológica relacionada a los resultados analizados a partir de la base de datos NetLab v1.0 del INS. Se recabó información de resultados de diagnóstico según el Método de Proporciones de Agar 7H10, el cual consistió en información de sensibilidad o resistencia frente a los fármacos: rifampicina, isoniacida, kanamicina, capreomicina, y alguna fluoroquinolona (ciprofloxacina o levofloxacina), tomando como referencia las concentraciones críticas recomendadas por la OMS (WHO 2018) (Tabla 4). Así mismo, se recabó información, tales como, sexo de los pacientes (masculino o femenino), lugar de procedencia de la muestra (Dirección de Salud de procedencia), año de emisión de resultados del diagnóstico por el método de Ensayo en Sonda Lineal (2011, 2012, 2013, 2014 o 2015), y estado de tratamiento del paciente (“Nunca tratado” o “Antes tratado”) al momento del envío de la muestra biológica primaria. No se trabajaron con identificadores personales de los pacientes. La identificación de cada muestra estuvo basada en códigos de laboratorio asignados a cada muestra al momento de llegar al INS (código NETLab).

Tabla 4. Lista de concentraciones críticas del Método de Proporciones. Las concentraciones críticas fueron establecidas por la OMS para el medio Agar 7H10. CC: concentración crítica.

	DROGAS	ABREVIATURA	CC
Drogas antituberculosis de primera línea	Rifampicina	RIF	1.0 µg/mL
	Isoniacida 0.2	INH 0.2	0.2 µg/mL
	Isoniacida 1.0	INH 1.0	1.0 µg/mL
	Kanamicina	KAN	5.0 µg/mL

Drogas antituberculosis de segunda línea	Capreomicina	CAP	10.0 µg/mL
	Ciprofloxacina	CIP	2.0 µg/mL
	Levofloxacina	LEV	1.0 µg/mL

4.6 Análisis estadísticos e informáticos

Se realizaron análisis descriptivos de las frecuencias de muestras y mutaciones que integraron el estudio, utilizando los programas estadísticos Microsoft Excel 2013 y el paquete VennDiagram v1.6.20 (Chen y Boutros 2011) del programa R v3.5.1 (Development Core Team 2011).

- **Análisis descriptivo del número de muestras**

Se realizó un análisis descriptivo de los casos ingresados al estudio, en función de:

- Año de procedencia
- Lugar de procedencia
- Distribución latitudinal (Norte, Centro y Sur)
- Distribución longitudinal (Costa, Sierra y Selva).
- Cantidad de casos con fenotipos TB-MDR y TB-monorresistente comprendidos en todo el estudio.

- **Análisis descriptivo de mutaciones**

Se realizó un análisis descriptivo de las frecuencias absolutas y relativas de las mutaciones asociadas a resistencia en función de su prevalencia por cada locus génico:

- Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia frente a rifampicina (locus *rpoB*).
- Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia frente a isoniacida (locus *katG* e *inhA*).

4.7 Evaluación de la diversidad alélica y ligamiento genético

La evaluación de la diversidad alélica de cada locus fue realizada mediante el uso del Índice de Simpson (1-D). Como la reproducción clonal puede enmascarar los efectos de la recombinación, se trabajaron con dos conjuntos de datos: uno incluía todas las muestras de cada localidad (sin corrección clonal), y el otro incluía los datos corregidos por clones de cada localidad de los que se eliminaron los genotipos idénticos (con corrección clonal). La determinación del ligamiento genético fue realizada a través de la determinación del Índice de Asociación (I_A) entre todos los locus de la población con corrección clonal, utilizando 1000 permutaciones. Posteriormente, la determinación del grado de asociación aportado por cada locus fue determinado mediante el análisis pareado (*pairwise*) de cada locus. Todos los análisis fueron realizados en el paquete poppr v2.8.1 de R (Kamvar, Tabima y Grünwald 2014).

4.8 Obtención y clasificación de haplotipos

Se realizó la creación de un *pseudolocus* mediante la concatenación de 21 marcadores en una sola secuencia. Se omitió la caracterización de las siguientes bandas: CC, AC, TUB, *rpoB*, *katG* e *inhA*, por tratarse de bandas controles. De este modo, se anidó la información contenida en la RDRR del gen *rpoB*, el codón 315 del gen *katG* y la región promotora del gen *inhA*. El orden de éstos fue determinado en función a las distancias intergénicas, según el genoma de referencia H37Rv (Genbank: NC_000962.3) (Figura 9). Los haplotipos fueron obtenidos utilizando los 21 marcadores presentes en el *pseudolocus* mediante el paquete GeneAIEx v6.5 (Peakall y Smouse 2006; 2012). Los haplotipos obtenidos fueron clasificados en cuatro grupos, según sus respectivas frecuencias (Bomba, Walter y Soranzo 2017) (Tabla 5).

Tabla 5. Criterio de clasificación de haplotipos. La clasificación fue realizada en función a la frecuencia acumulada durante los 5 años de estudio.

Clase de haplotipos	Frecuencia haplotípica	N° de muestras
Haplotipo común	$n > 5\%$	$n > 329.5$ muestras
Haplotipo menos común	$5\% \geq n > 1\%$	$329.5 \geq n > 65.9$
Haplotipo raro	$1\% \geq n; n \neq 1$	$65.9 \geq n; n \neq 1$
Haplotipo huérfano	$n = 1$	$n = 1$ muestra

Posteriormente, se realizó una prueba de normalidad mediante la visualización gráfica de un histograma de las frecuencias absolutas de los haplotipos y la prueba estadística de Shapiro-Wilk (Ghasemi y Zahediasl 2012). Luego, se determinaron las frecuencias absolutas de la distribución de haplotipos a lo largo de los 28 lugares de procedencia, y en función de los años de obtención de muestra. Así mismo, se evaluó estadísticamente si a lo largo de los años hubo un cambio de frecuencias de los haplotipos comunes o menos comunes mediante una prueba exacta de “Bondad de ajuste” usando el paquete XNomial v1.0.4 de R (<https://CRAN.R-project.org/package=XNomial>).

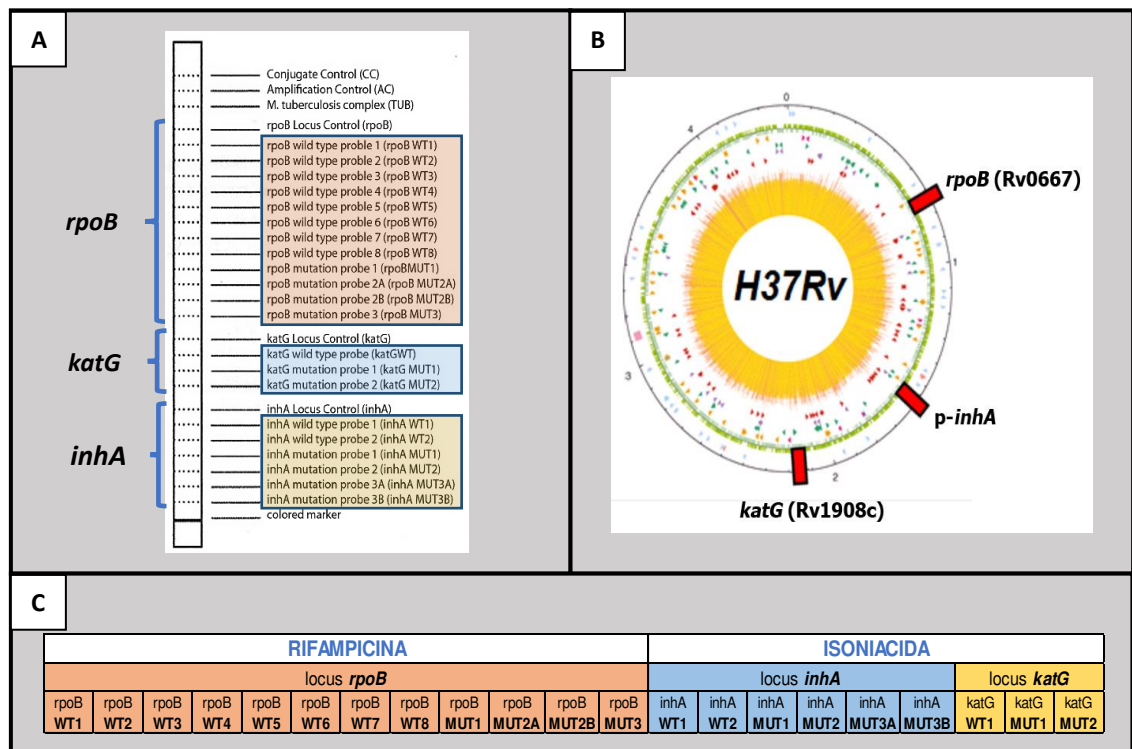


Figura 9. Proceso de anidación de los 21 marcadores de resistencia. A) ubicación de los loci y bandas de hibridación de acuerdo con la tira de diagnóstico del ESL GenoType MTBDRplus v2.0. Se resaltan en fondo naranja, celeste y amarillo solo las bandas que serán utilizadas en los análisis. B) posiciones de los genes estudiados en función del genoma completo de MTB. En paréntesis se denota la etiqueta de cada locus, según la anotación funcional del genoma referencial de MTB. C) estructura final del *pseudolocus* formado a partir de las posiciones físicas de los genes analizados y la secuencia de bandas de hibridación según las tiras del ESL GenoType MTBDRplus v2.0. *p-inhA*: región promotora del gen *inhA*.

4.9 Evaluación del poder discriminatorio de los haplotipos

La estimación de la diversidad y, por ende del poder discriminatorio del conjunto de haplotipos obtenidos, fue realizado utilizando el Índice de discriminación de Hunter-Gaston (IDHG) (Hunter y Gaston 1988). Este índice fue calculado usando la herramienta en línea: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php, la cual está basado en la siguiente ecuación:

$$\text{IDHG} = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Donde:

- **N** es el número total de cepas drogorresistentes incluidas en el análisis,
- **s** es el número total de haplotipos determinados, y
- **n_j** es el número de cepas que pertenecen al **j**th haplotipo.

4.10 Distribución geográfica de haplotipos

Se realizó la construcción de tres mapas de calor (*heatmaps*) con las frecuencias absolutas de los haplotipos más representativos (comunes y menos comunes) en

función de: la latitud (Norte, Centro y Sur), y la región natural (Costa, Sierra y Selva). Para esto se utilizó el paquete `pheatmap` v1.0.12 de R (<https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>).

4.11 Determinación de la similaridad y estructura genética de los Haplotipos

La similaridad de los haplotipos fue evaluada mediante la realización de un agrupamiento jerárquico a través del método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) para los haplotipos comunes y menos comunes (Michener y Sokal 1957) en R. Así mismo, se realizó la evaluación estadística de la diferenciación genética de los haplotipos: entre determinados grupos poblacionales (Tabla 6) mediante el test de AMOVA (Análisis Molecular de Varianza) usando el programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer 2010). Finalmente, se determinó la estructura genética total mediante la inferencia del número de grupos (*clusters*) a través del uso del Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) implementado en el paquete `adegenet` v 2.1.1 de R (Jombart, Devillard y Balloux 2010).

Tabla 6. Grupos poblacionales AMOVA. Agrupación de DISAs y DIREsAs en función de regiones geográficas (costa, sierra y selva), latitudes (norte, centro y sur) y densidad de población (Lima metropolitana y el resto del país).

Estructura=Costa_Sierra_Selva		Estructura=Norte_Centro_Sur		Estructura=LimaMet_Rest	
N° grupos=3		N° grupos=3		N° grupos=2	
Costa	Piura	Norte	Piura	Lima Metropolitana	Callao
	Lambayeque		Lambayeque		Lima Provincias
	La Libertad		La Libertad		Lima Ciudad
	Callao		Cajamarca		Lima Este
	Lima Provincias		Amazonas		Lima Sur
	Lima Ciudad		Tumbes		
	Lima Este		San Martín	Resto del país	Piura
	Lima Sur		Loreto		Lambayeque
	Ica		Callao		La Libertad
	Moquegua		Lima Provincias		Cajamarca
Tacna	Lima Ciudad	Amazonas			
	Lima Este	Tumbes			
Sierra	Cajamarca	Centro	Lima Sur		San Martín
	Ancash		Lima Este		Loreto
	Huánuco		Lima Sur		Ica
	Pasco		Ica		Ancash
	Huancavelica		Ancash		Huánuco
	Junín		Huánuco		Pasco
	Ayacucho		Pasco		Huancavelica
	Apurímac		Huancavelica		Junín
	Arequipa		Junín	Ucayali	
	Cusco		Ucayali	Pasco	
Puno	Moquegua	Huancavelica			
Selva	Amazonas	Sur	Tacna	Junín	
	Tumbes		Ayacucho	Ucayali	
	San Martín		Apurímac	Moquegua	
	Loreto		Arequipa	Tacna	
	Ucayali		Cusco	Ayacucho	
	Madre de Dios		Puno	Apurímac	
			Madre de Dios	Arequipa	
		Cusco			
		Puno			
		Madre de Dios			

4.12 Análisis de diversidad alfa y beta

Para el análisis de la diversidad local (diversidad alfa) se utilizó el programa Past v3.25 (Hammer, Harper y Ryan 2001) y se evaluaron los factores de riqueza y uniformidad de haplotipos de los diferentes lugares de procedencia. Para esto, se determinaron los índices de riqueza haplotípica (S), dominancia (D), diversidad de Simpson (1-D) (Simpson 1949) y la equitatividad de Shannon (H) (Hutcheson 1970). Estos índices fueron determinados con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (9999 *bootstraps*). Usando el índice de Simpson, se establecieron de manera arbitraria puntos de corte para la determinación de Diversidad baja ($1-D < 0.25$), Diversidad intermedia

($0.25 \leq 1-D < 0.75$), y Diversidad alta ($1-D \geq 0.75$). Por otro lado, se determinó la diversidad beta existente entre las muestras procedentes de Lima y Callao, así como el grado de aporte de los componentes de “reemplazo” y “riqueza” de haplotipos del índice de disimilaridad de Jaccard (Baselga 2010; 2012), mediante el paquete *betapart* v1.5.1 de R (Baselga y Orme 2012).

4.13 Asociación estadística de haplotipos

Finalmente, se ejecutaron pruebas de asociación estadística entre cada uno de los haplotipos determinados y las siguientes variables de importancia en Salud pública:

VARIABLES:

- Sexo del paciente: Masculino o Femenino
- Año de obtención de diagnóstico: 2011, 2012, 2013, 2014
- Fenotipos: TB sensible, TB-MDR, TB-XDR, TB-MonoINH, y TB-MonoRIF
- Estado de tratamiento: ‘Antes tratado’ y ‘Nunca tratado’.

Para esto, se utilizó el protocolo estandarizado para la evaluación de mutaciones asociadas a la resistencia recomendadas por la OMS (Miotto et al. 2017). De manera breve, las asociaciones entre los haplotipos y las variables de interés fueron evaluadas mediante el *p-value* del Test Exacto de Fisher, estableciendo un nivel de significancia del 5%. La fuerza de asociación fue determinada usando los valores de la ‘Tasa de Momios’ (OR, del inglés *Odds ratio*) y del ‘Cociente de probabilidad positiva’ (PLR, del inglés *Positive Likelihood Ratio*). Estos cálculos fueron realizados mediante un script que automatizó las evaluaciones usando el paquete *epiR* v1.0 de R (<https://CRAN.R-project.org/package=epiR>). El control de la tasa de falsos positivos (FDR, del inglés *False Discovery Rate*) para comparaciones múltiples fue realizado usando el método de Benjamini–Hochberg. Finalmente, los *p-values* corregidos por FDR se utilizaron como

base para establecer el nivel de asociación de significación final entre la presencia de un haplotipo y la variable de interés. Las asociaciones significantes fueron clasificadas como de alta, intermedia o mínima confianza en función a los valores de PLR y OR.

5 RESULTADOS

5.1 Análisis de muestras ingresadas al estudio

Se analizaron 6589 casos drogorresistentes de MTB, lo que corresponde al 18% del total de 36,964 resultados válidos emitidos mediante la metodología molecular GenoType MTBDR*plus* v2.0 en el periodo 2011-2015. A través de los años se evidenció un incremento de la cantidad de muestras que fueron analizadas; sin embargo, 5459 (82.85%) casos provienen de resultados emitidos en el periodo 2013 - 2015 (Tabla 7). La distribución latitudinal evidenció una alta carga de casos de TB provenientes del Centro (84.4%), Norte (10.9%) y Sur (4.6%) del país. Por otro lado, en función de la distribución regional, se obtuvo una alta prevalencia de casos en la Costa (81.9%), seguido por una distribución homogénea entre la Selva (9.1%) y la Sierra (9.0%) (Tabla 7). Respecto a los lugares de procedencia de las muestras, se tiene que solamente las DISAS 'Lima Ciudad' y 'Lima Este' albergaron el 55.13% del total de muestras analizadas; mientras que los lugares restantes presentan frecuencias menores al 6%. Así mismo, se observó que este patrón de frecuencias se mantuvo uniforme a lo largo de los 5 años (Tabla 7, Anexo 1).

Tabla 7. distribución de casos incluidos en el estudio. Distribución realizada en función del año de emisión de resultados y lugar de procedencia.

Distribución latitudinal	Regiones naturales	DISA	Año de obtención de resultados					Total (%)
			2011	2012	2013	2014	2015	
Norte	Costa	Piura	0	14	21	17	15	67 (1)
Norte	Costa	Lambayeque	1	36	50	60	28	175 (2.7)
Norte	Costa	La Libertad	46	93	72	25	11	247 (3.8)
Norte	Sierra	Cajamarca	0	2	4	1	2	9 (0.1)
Norte	Selva	Amazonas	0	1	0	2	0	3 (0.1)
Norte	Selva	Tumbes	0	7	9	17	0	33 (0.5)
Norte	Selva	San Martín	0	14	21	23	12	70 (1.1)
Norte	Selva	Loreto	0	22	16	34	43	115 (1.8)
Centro	Costa	Callao	16	0	37	135	201	389 (5.9)
Centro	Costa	Lima Provincias	1	87	99	46	13	246 (3.7)
Centro	Costa	Lima Ciudad	79	186	330	195	432	1222 (18.6)
Centro	Costa	Lima Este	55	148	647	838	722	2410 (36.6)
Centro	Costa	Lima Sur	17	14	19	96	169	315 (4.8)
Centro	Costa	Ica	0	59	62	55	59	235 (3.6)
Centro	Sierra	Ancash	0	38	31	83	68	220 (3.3)
Centro	Sierra	Huánuco	0	24	25	19	31	99 (1.5)
Centro	Sierra	Pasco	0	1	1	0	0	2 (0.03)
Centro	Sierra	Huancavelica	0	2	3	3	2	10 (0.1)
Centro	Sierra	Junín	0	39	40	29	39	147 (2.2)
Centro	Selva	Ucayali	0	60	58	89	62	269 (4.1)
Sur	Costa	Moquegua	0	0	1	1	3	5 (0.1)
Sur	Costa	Tacna	0	10	16	28	32	86 (1.3)
Sur	Sierra	Ayacucho	0	4	4	3	6	17 (0.3)
Sur	Sierra	Apurímac	0	0	0	1	2	3 (0.1)
Sur	Sierra	Arequipa	0	24	24	0	14	62 (0.9)
Sur	Sierra	Cusco	0	10	3	4	6	23 (0.4)
Sur	Sierra	Puno	0	0	0	1	0	1 (0.02)
Sur	Selva	Madre de Dios	0	20	26	29	34	109 (1.7)
Total			215	915	1619	1834	2006	6589 (100)
Porcentaje			3.26%	13.89%	24.57%	27.83%	30.44%	

El análisis de diagnóstico molecular determinó que en total 5920 (89.8%) casos evidenciaron un patrón genotípico de resistencia a isoniacida y 4371 (66.3%) casos

tuvieron un patrón genotípico de resistencia a rifampicina. De entre éstos, 3702 (56.26%) casos fueron genotípicamente diagnosticados como TB-MDR, 2218 (33.7%) como monorresistentes a isoniacida, y 669 (10.2%) como monorresistentes a rifampicina (Figura 10).

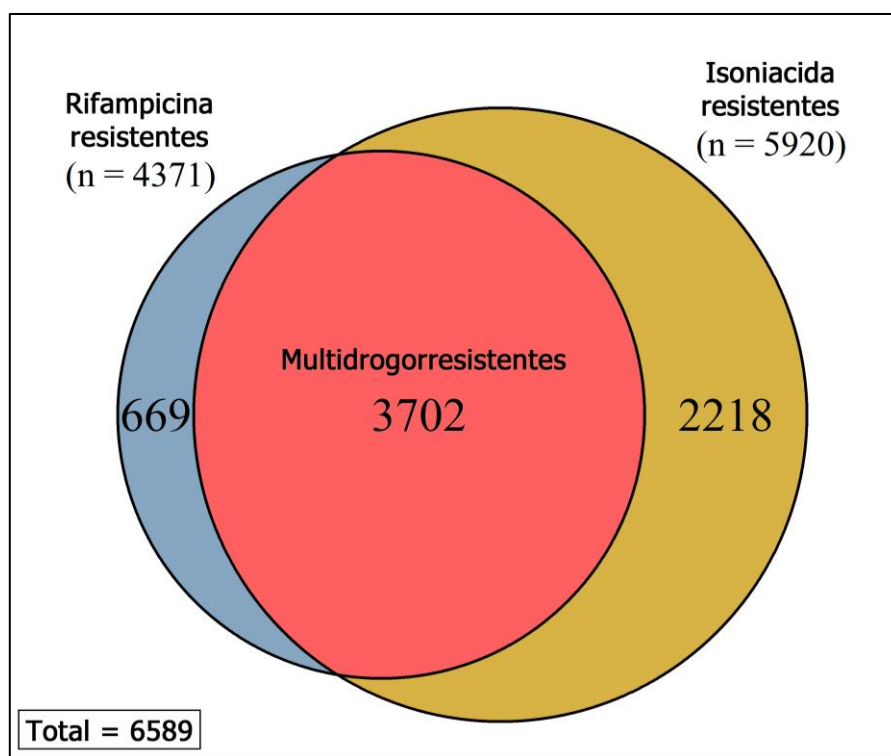


Figura 10. Casos con resistencia genotípica a rifampicina e isoniacida. 'Diagrama de Venn' mostrando la distribución de casos analizados en función de los genotipos diagnosticados por el GenoType MTBDRplus v2.0.

5.2 Análisis de mutaciones caracterizadas en el GenoType MTBDRplus v2.0

El análisis de patrones de resistencia frente a rifampicina en el gen *rpoB* reveló que en las cepas de MTB peruanas existe una alta prevalencia de dos mutaciones detectadas directamente: S531L (55.4%) y D516V (18.51%). Con frecuencias menores se evidenciaron mutaciones detectadas indirectamente que afectaban a los codones: 530-

533 (6.8% [ausencia de banda WT8]), 526-529 (4.4% [ausencia de WT7]), 514-515 (3.3% [ausencia de WT3]), 516 (2.9% [ausencia de WT3 y WT4]) y 510-512 (2.0% [ausencia de WT2]). Posterior a ellas, se encontraron las dos restantes mutaciones detectadas directamente: H526D (1.9%) y H526Y (1.8%). Finalmente, se evidenciaron diversos patrones de resistencia que en conjunto no sobrepasaron el 3% del total de casos con resistencia a rifampicina (Tabla 8).

Tabla 8. Mutaciones que confieren resistencia a rifampicina. Se señalan las bandas, silvestres (WT) y mutantes (MUT), y la presencia de los cambios de aminoácido, según corresponda. La tabla está ordenada en función decreciente del número de casos. Entre paréntesis se señala la frecuencia relativa (porcentaje) de las variantes respecto al total de casos genotípicamente resistentes a rifampicina.

gen <i>rpoB</i>			
Bandas de hibridación ausentes	Bandas de hibridación presentes	Cambio aminoácido	N (%)
WT8	MUT3	S531L	2422 (55.4)
WT3, WT4	MUT1	D516V	809 (18.5)
WT8	-	-	295 (6.8)
WT7	-	-	190 (4.4)
WT3	-	-	146 (3.3)
WT3, WT4	-	-	125 (2.9)
WT2	-	-	88 (2)
WT7	MUT2B	H526D	82 (1.9)
WT7	MUT2A	H526Y	80 (1.8)
WT2, WT3	-	-	52 (1.2)
WT2, WT3, WT4	-	-	11 (0.3)
WT4	-	-	8 (0.2)
WT2, WT7	-	-	7 (0.2)
WT3, WT8	-	-	5 (0.1)
Otros	-	-	51 (1.2)
Total			4371 (100)

Respecto al total de cepas con patrones genotípicos de resistencia a isoniácida, el análisis determinó que 3574 (60.4%) casos presentaron únicamente mutaciones en el gen *katG*, seguido de 2061 (34.8%) casos con mutaciones únicamente en la región promotora del gen *inhA*, y 285 (4.8%) casos con mutaciones simultáneas en ambos genes. En general, 3525 (59.5%) casos presentaron únicamente la mutación S315T1, seguido de 1519 (25.7%) casos con únicamente la mutación c-15t. Así, la presencia por separado de ambas mutaciones comprendió más del 82% del total de casos resistentes a isoniácida. Además, se detectaron 472 (8%) casos con resistencia indirecta en la región cercana a la posición -15 del gen *inhA* (ausencia del WT1 y MUT 1 y 2), y 245 (4.1%) casos con la doble mutación: *katG* S315T1 e *inhA* c-15t. Finalmente, se evidenciaron diversos patrones de resistencia que en conjunto no sobrepasaron el 2.7% del total de casos resistentes a isoniácida (Tabla 9).

Tabla 9: mutaciones que confieren resistencia a isoniácida. Se señalan las bandas, silvestres (WT) y mutantes (MUT), y la presencia de los cambios de aminoácido, según corresponda. La tabla está ordenada en función decreciente del número de casos. Entre paréntesis se señala la frecuencia relativa (porcentaje) de las variantes respecto al total de casos genotípicamente resistentes a isoniácida.

gen <i>katG</i>			gen <i>inhA</i>			
Banda de hibridación ausente	Banda de hibridación presente	Sustitución aminoácido	Banda de hibridación ausente	Banda de hibridación presente	Sustitución aminoácido	N (%)
WT	MUT1	S315T1	Genotipo sensible del gen <i>inhA</i>			3525 (59.5)
WT	-	-				32 (0.5)
WT	MUT2	S315T2				17 (0.3)

Genotipo sensible del gen <i>katG</i>			WT1	MUT1	c-15t	1519 (25.7)
			WT1	-	-	472 (8)
			WT2	MUT3A	t-8c	22 (0.4)
			WT1, WT2	-	-	22 (0.4)
			WT1, WT2	MUT1	-	19 (0.3)
			Otros	-	-	7 (0.1)
<hr/>						
WT	MUT1	S315T1	WT1	MUT1	c-15t	245 (4.1)
WT	MUT1	S315T1	WT2	MUT3A	t-8c	12 (0.2)
WT	MUT1	S315T1	WT1	-	-	9 (0.2)
WT	MUT1	S315T1	WT1, WT2	MUT1	-	7 (0.1)
Otros			Otros			12 (0.2)
<hr/>						
Total						5920 (100)

El análisis, a través de los años, de la presencia de las mutaciones detectadas directamente en los tres genes analizados evidenció que no hubo variación de sus frecuencias a través de los 5 años. De este modo, en el gen *rpoB*, la mutación de mayor prevalencia en este periodo fue la S531L, en el caso del gen *katG* fue la mutación S315T1, y en el gen *inhA* fue la c-15t (Anexo 2).

5.3 Evaluación de la diversidad alélica y ligamiento genético

La corrección clonal de la población original (*sin corrección clonal*) arrojó una nueva población sin clones, por cada localidad, conformada por un total de 585 individuos (*con corrección clonal*). Luego, el análisis de diversidad alélica de cada locus para las poblaciones '*sin corrección clonal*' y '*con corrección clonal*', dio como resultado un incremento en los valores promedios del Índice de Simpson (aumento de 0.1809 hasta 0.2110), la Heterocigosidad esperada (aumento de 0.1809 hasta 0.2114) y la equitatividad alélica (aumento de 0.5430 hasta 0.6034) a favor de la población sin clones; a excepción de cinco loci: *rpoB* WT8, *rpoB* MUT1, *rpoB* MUT3, *inhA* WT1 e *inhA*

MUT1, donde todos los índices de diversidad fueron menores a los de la contraparte 'sin corrección clonal' (Anexo 3).

En la prueba de asociación multilocus se obtuvo un valor de 'Índice de Asociación' (I_A) igual a 0.3627 y un Índice de asociación estandarizado' (r_{BarD}) igual a 0.0215. Ambos valores nos dan información de que estamos frente a una población de comportamiento clonal (asexual). Así mismo, se obtuvo un p -value menor a 0.05, por lo cual se rechazó la hipótesis nula y se asume que existe un desequilibrio de ligamiento entre todos los distintos loci (Figura 11).

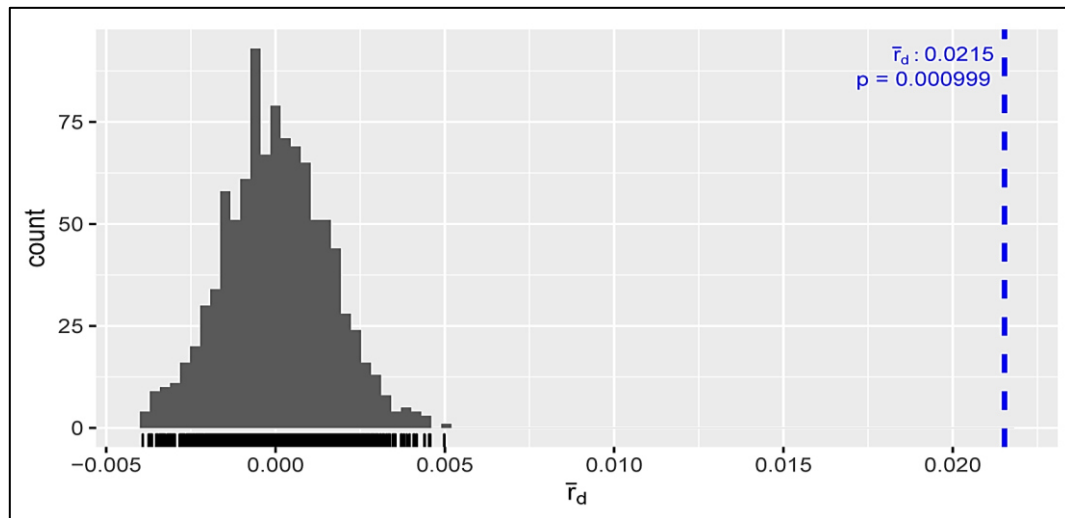


Figura 11: índice de asociación de los 21 marcadores moleculares. El análisis fue realizado sobre la población con corrección clonal ($n = 585$). La distribución de valores en gris (1000 permutaciones de los datos originales) muestran todos los posibles valores de r_{BarD} si la población tuviese un comportamiento sexual (No ligamiento). Se observa que el valor de r_{BarD} obtenido a partir de la data está totalmente alejado de la distribución sexual. \bar{r}_d : r_{BarD} .

El análisis pareado de asociación evidenció que el desequilibrio de ligamiento no ocurre a nivel de los 21 loci analizados, sino que es determinado principalmente por un alto

valor de ligamiento entre los siguientes pares: *rpoB* WT1 y *rpoB* WT6 ($r_{\text{BarD}} = 0.25$), *rpoB* WT3 y *rpoB* WT4 ($r_{\text{BarD}} = 0.53$), *rpoB* WT3 y *rpoB* MUT1 ($r_{\text{BarD}} = 0.41$), *rpoB* WT4 y *rpoB* MUT1 ($r_{\text{BarD}} = 0.57$), *rpoB* WT5 y *rpoB* WT6 ($r_{\text{BarD}} = 0.6$), *rpoB* WT7 y *rpoB* MUT2A ($r_{\text{BarD}} = 0.33$), *rpoB* WT7 y *rpoB* MUT2B ($r_{\text{BarD}} = 0.32$), *rpoB* WT8 y *rpoB* MUT3 ($r_{\text{BarD}} = 0.53$), *inhA* WT1 y *inhA* MUT1 ($r_{\text{BarD}} = 0.66$), *inhA* WT2 y *inhA* MTU3A ($r_{\text{BarD}} = 0.51$), *inhA* WT2 y *inhA* MUT3B ($r_{\text{BarD}} = 0.21$), *katG* WT y *katG* MUT1 ($r_{\text{BarD}} = 0.77$) (Figura 12, Anexo 4).

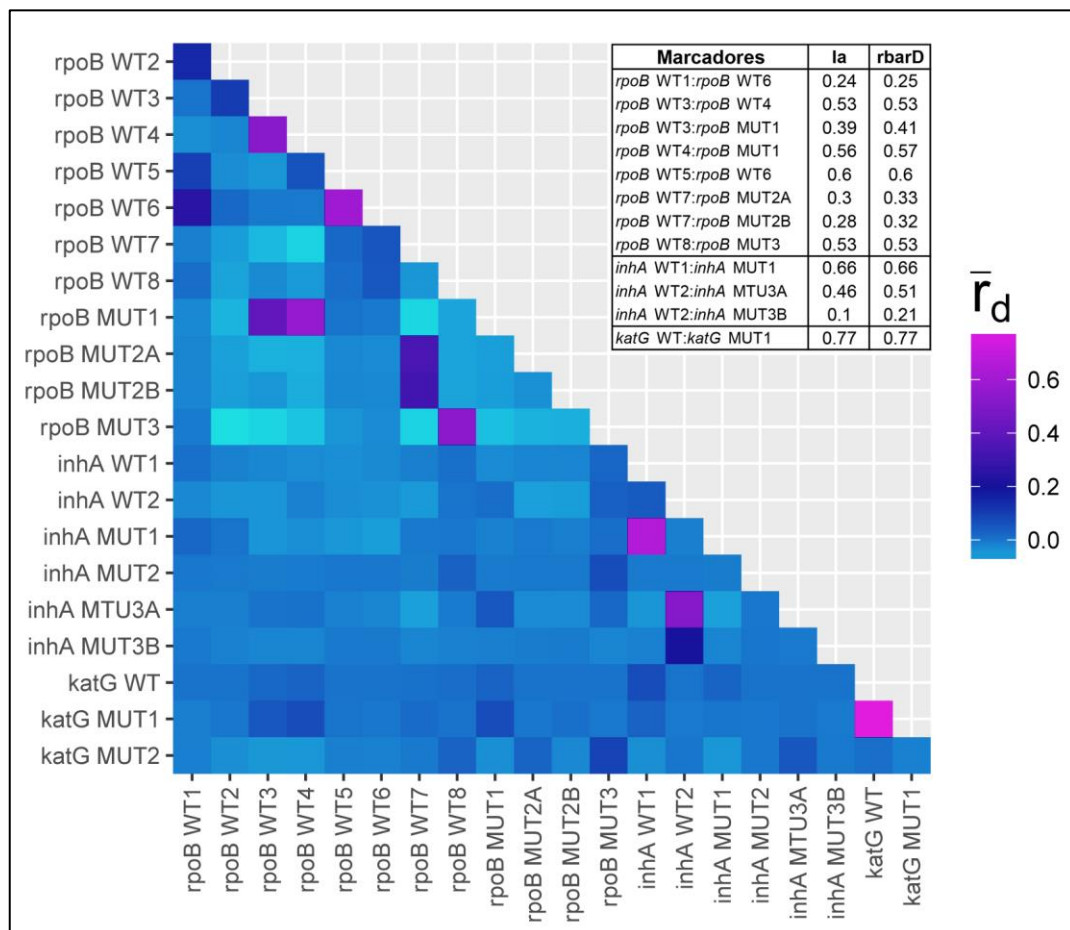


Figura 12: correlación genética de marcadores pareados. Mapa de calor que demuestra que el desequilibrio de ligamiento se debe principalmente a la fuerte asociación existente entre algunos pares de locus ($\bar{r}_d > 0.2$), Tabla: índices de

asociación pareados más representativos ($r_{\text{BarD}} > 0.2$) para los 21 marcadores analizados.

5.4 Obtención y análisis descriptivo de haplotipos

En total se obtuvieron 134 haplotipos cuyas frecuencias absolutas se encontraron en el rango de 1 a 1396 casos; siendo 1, 2 y 9.75 los cuartiles 1, 2 y 3, respectivamente. Este análisis intercuartílico mostró que el 75% de los mismos presentaba una frecuencia menor a 10 casos; es decir, eran haplotipos raros o únicos (Anexo 5). Además, se determinó gráfica y estadísticamente ($p\text{-value} = 2.2\text{e-}16$) que las frecuencias de haplotipos no se ajustaban a una distribución normal (Figura 13).

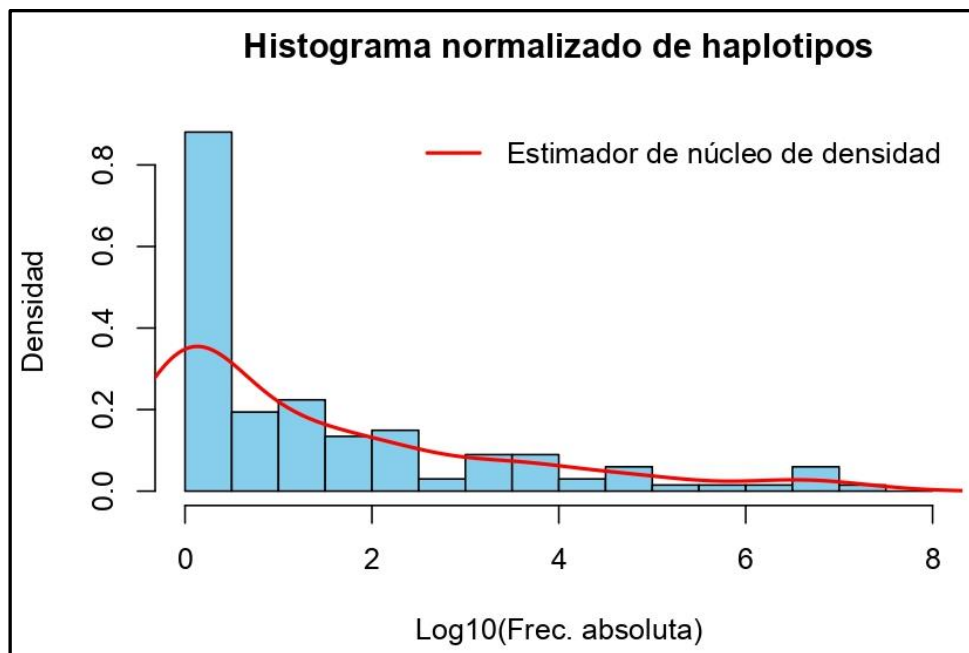


Figura 13: histograma normalizado de frecuencias haplotípicas. Histograma de densidades del logaritmo, en base 10, de las frecuencias haplotípicas. Se observa una línea de tendencia de densidad con cola a la izquierda.

De entre estos, 06 corresponden a la clase de 'haplotipos comunes', estando presentes en 4820 (73.2%) casos; y 07 corresponden a la clase de 'haplotipos menos comunes', estando presentes en 968 (14.7%) casos. Por lo tanto, solo los haplotipos comunes o menos comunes en conjunto poseen una representatividad del 87.9% de muestras analizadas. Por otro lado, se obtuvieron 62 'haplotipos raros' y 59 haplotipos huérfanos con representatividades del 11.26% y 0.9%, respectivamente (Figura 14, Anexo 5).

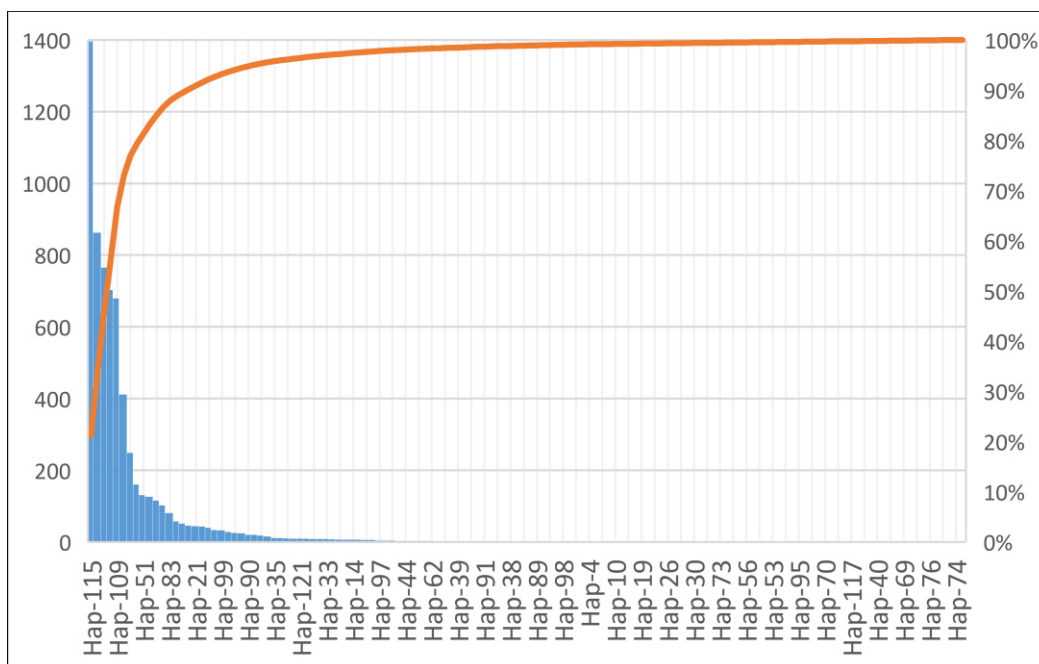


Figura 14: representatividad de los haplotipos. Número de casos presentes por cada haplotipo (eje vertical izquierdo) comparado contra el porcentaje acumulado (representatividad) aportado por cada haplotipo (línea acumulativa de color naranja, eje vertical derecho). Los 134 haplotipos se encuentran ordenados de mayor a menor frecuencia absoluta en el eje horizontal.

Del análisis de los 13 haplotipos comunes o menos comunes se determinó que 06 correspondían a un genotipo TB-MDR (hap-34, hap-41, hap-83, hap-101, hap-109 y hap-115), 03 a un genotipo TB-MonoRIF (hap-51, hap-102 y hap-116) y 04 a un genotipo TB-MonoINH (hap-123, hap-125, hap-126 y hap-134) (Tabla 10).

Tabla 10: estructuras génicas de los haplotipos comunes y menos comunes. Se señalan las frecuencias absolutas y mutaciones de resistencia de los haplotipos comunes y menos comunes. Los haplotipos están ordenados de manera descendente en función a su frecuencia absoluta. Los signos de interrogación denotan mutaciones detectadas indirectamente. 1: presencia de banda de hibridación, 0: ausencia de banda de hibridación.

HAPLOTIPOS		Frecuencia absoluta	RIFAMPICINA												ISONIACIDA											
			rpoB WT1	rpoB WT2	rpoB WT3	rpoB WT4	rpoB WT5	rpoB WT6	rpoB WT7	rpoB WT8	rpoB MUT1	rpoB MUT2A	rpoB MUT2B	rpoB MUT3	Variante	inhA WT1	inhA WT2	inhA MUT1	inhA MUT2	inhA MUT3A	inhA MUT3B	Variante	katG WT	katG MUT1	katG MUT2	Variante
Haplotipos comunes	Hap-41	766	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	D516V	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	S315T1
	Hap-109	680	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	S531L	0	1	1	0	0	0	c-15t	1	0	0	-	
	Hap-115	1396	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	S531L	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	S315T1	
	Hap-123	412	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	0	0	0	-15,-16	1	0	0	-
	Hap-126	703	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	0	1	1	0	0	0	c-15t	1	0	0	-
	Hap-134	863	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	S315T1
Haplotipos menos comunes	Hap-34	103	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	D516?	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	S315T1
	Hap-51	131	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	514,515	1	1	0	0	0	0	-	1	0	0	-
	Hap-83	81	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	526-529	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	S315T1
	Hap-101	127	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	530-533	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	S315T1
	Hap-102	116	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	530-533	1	1	0	0	0	0	-	1	0	0	-
	Hap-116	249	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	S531L	1	1	0	0	0	0	-	1	0	0	-	
	Hap-125	161	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	0	1	1	0	0	0	c-15t	0	1	0	S315T1

El análisis de frecuencias de haplotipos comunes y menos comunes a lo largo de los 5 años de análisis determinó que estadísticamente las proporciones de los haplotipos se mantuvieron constantes a lo largo de los años. Así al analizar el *p-value* obtenido mediante tres métodos distintos de análisis se decidió por aceptar la hipótesis nula (H_0), la cual establece que las proporciones observadas se ajustaban a proporciones esperadas constantes a lo largo de los distintos años (Tabla 11).

Tabla 11: frecuencias absolutas de los haplotipos comunes y menos comunes. Se detallan las frecuencias absolutas a través de los cinco años de estudio. Entre paréntesis se señala la frecuencia relativa (porcentaje) de los haplotipos respecto al total de casos diagnosticados por cada año. LLR: *p value* de la ‘razón de probabilidad’. Prob: *p value* del ‘Test exacto multinomial’. Chisq: *p value* del ‘Chi cuadrado de Pearson’.

CLASE	HAPLOTIPO	AÑO					TEST EXACTO		
		2011	2012	2013	2014	2015	LLR	Prob	Chisq
Común	Hap-109	15 (7)	113 (12.3)	176 (10.9)	183 (10.1)	193 (9.5)	0.84	0.84	0.88
	Hap-115	41 (19.1)	219 (23.9)	327 (20.2)	402 (22.1)	407 (20.1)	0.95	0.95	0.95
	Hap-123	12 (5.6)	37 (4)	84 (5.2)	123 (6.8)	156 (7.7)	0.84	0.84	0.84
	Hap-126	25 (11.6)	84 (9.2)	169 (10.4)	181 (10)	244 (12.1)	0.96	0.96	0.96
	Hap-134	35 (16.3)	113 (12.3)	221 (13.6)	246 (13.5)	248 (12.3)	0.94	0.94	0.94
	Hap-41	21 (9.8)	80 (8.7)	184 (11.4)	215 (11.8)	266 (13.2)	0.94	0.94	0.94
Menos común	Hap-101	2 (0.9)	20 (2.2)	44 (2.7)	24 (1.3)	37 (1.8)	0.94	0.94	0.94
	Hap-102	1 (0.5)	3 (0.3)	38 (2.3)	34 (1.9)	40 (2)	0.58	0.29	0.58
	Hap-116	13 (6)	42 (4.6)	71 (4.4)	66 (3.6)	57 (2.8)	0.93	0.93	0.93
	Hap-125	5 (2.3)	17 (1.9)	32 (2)	41 (2.3)	66 (3.3)	1.00	1.00	1.00
	Hap-34	8 (3.7)	12 (1.3)	31 (1.9)	23 (1.3)	29 (1.4)	0.66	0.66	0.58
	Hap-51	7 (3.3)	23 (2.5)	23 (1.4)	35 (1.9)	43 (2.1)	0.96	0.96	0.96
	Hap-83	2 (0.9)	13 (1.4)	18 (1.1)	23 (1.3)	25 (1.2)	1.00	1.00	1.00

	TOTAL	187 (87)	776 (84.8)	1418 (87.5)	1596 (87.8)	1811 (89.6)	
--	--------------	-------------	---------------	----------------	----------------	----------------	--

5.5 Similaridad genética de haplotipos

Los haplotipos comunes y menos comunes claramente se separaron en dos grupos. Esta separación estuvo marcada por la presencia o ausencia de la mutación S315T1 del gen *katG*. Además, los haplotipos monorresistentes a rifampicina se ubicaron en un solo grupo (Figura 15, *cluster* inferior). Finalmente, se determinó que los haplotipos comunes y menos comunes no se encuentran necesariamente separados por clústeres diferentes.

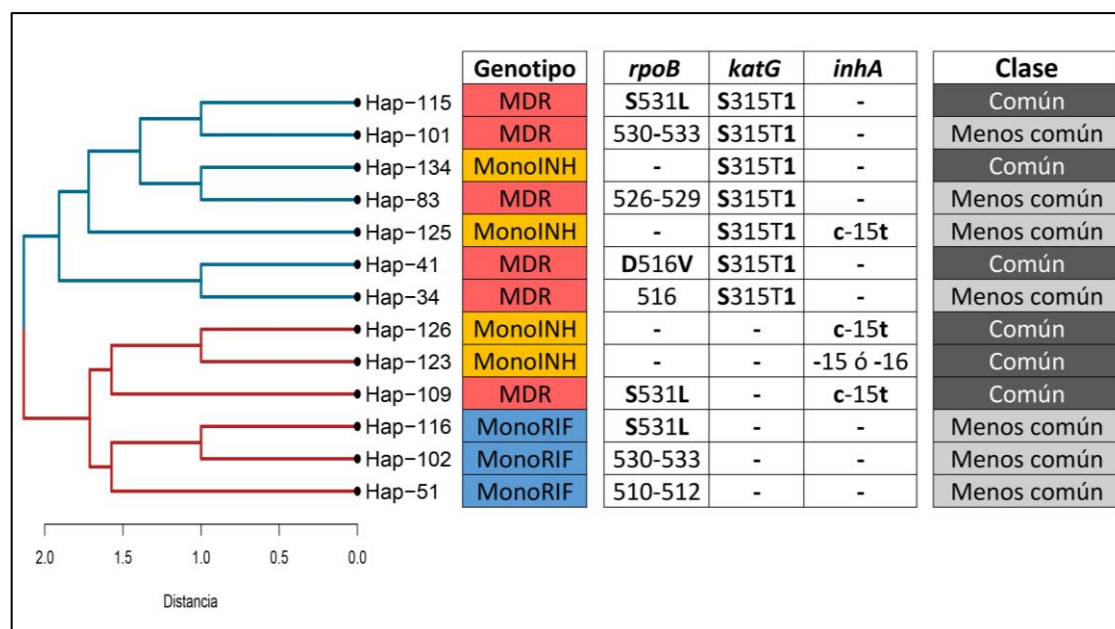


Figura 15. Fenograma de haplotipos representativos. Agrupamiento de haplotipos resistentes comunes y menos comunes en función de distancias fenéticas. Se muestran los cambios aminoacídicos para las mutaciones detectadas directamente; mientras que para la detección indirecta de resistencia se detalla el intervalo de codones o posición nucleotídica afectada.

5.6 Poder discriminatorio de los haplotipos

El IDHG obtenido para el uso de los haplotipos contando con el uso de los 134 subtipos fue de 0.89. Sin embargo, el análisis por separado de cada uno de los 21 marcadores utilizados para la construcción de cada haplotipo dio un promedio de IDHG de 0.21 (Anexo 3).

5.7 Distribución geográfica de haplotipos

El análisis de cuartiles de las frecuencias absolutas del número de haplotipos presentes en cada DISA/DIRESA arrojó que los valores de Rango Intercuartílicos (RIC) varían entre 8.5 y 38, para los haplotipos comunes, y entre 3.25 y 9.25, para los haplotipos menos comunes; lo cual contrasta con los valores máximos de cada uno de ellos, siendo entre 181 y 478, para los primeros, y entre 29 y 73 para los segundos. Así mismo, se determinó que ningún haplotipo se encuentra totalmente distribuido a lo largo de las 28 DISAS/DIRESAS, dado que todos evidenciaron valores mínimos de frecuencia iguales a cero (Anexo 6). Además, se observan varios valores atípicos superiores para cada uno de los 13 haplotipos analizados (Figura 16). El análisis de frecuencia de haplotipos comunes muestra que todas las DISAS/DIRESAS del Perú albergan al menos un haplotipo común. Esta distribución se encuentra concentrada en la Costa central del Perú, específicamente en la ciudad de Lima (este, sur, ciudad y provincias) y Callao. La mayor carga de haplotipos comunes se concentra en La DISA 'Lima Este', seguida de 'Lima Ciudad' y 'Callao'.

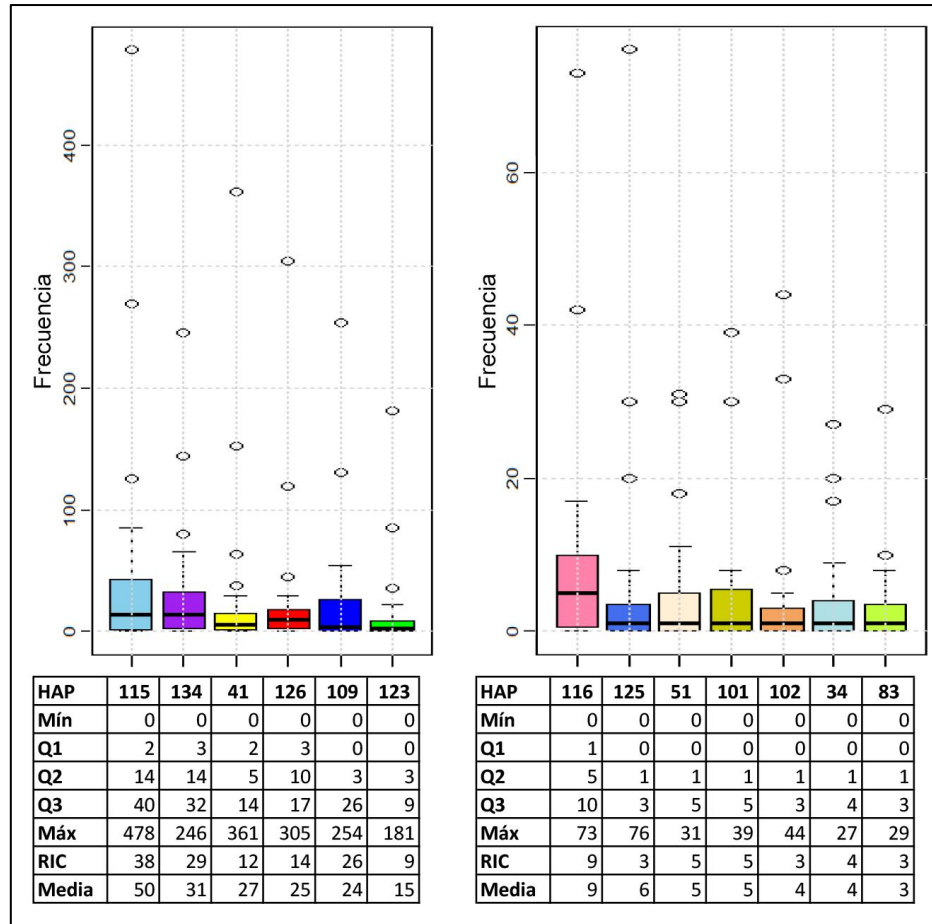


Figura 16. Distribución de frecuencias de los haplotipos representativos. Se observa una abundancia de valores atípicos superiores para los haplotipos comunes y menos comunes. Q: cuartil. RIC: rango intercuartílico.

Por otro lado, se evidencia una escasa distribución de estos seis haplotipos a lo largo de las demás regiones del Perú con excepción de los haplotipos 115 y 134. El haplotipo 115, se encuentra ampliamente distribuido en toda la zona central, con excepción de la DIRESA 'Pasco'; mientras que el haplotipo 134 se encuentra fuertemente distribuido en las DISAS de Lima, 'Callo' y La Libertad. En general existe una mayor carga de haplotipo comunes en la zona Centro y Norte a comparación del Sur (Figura 17, Tabla S5).

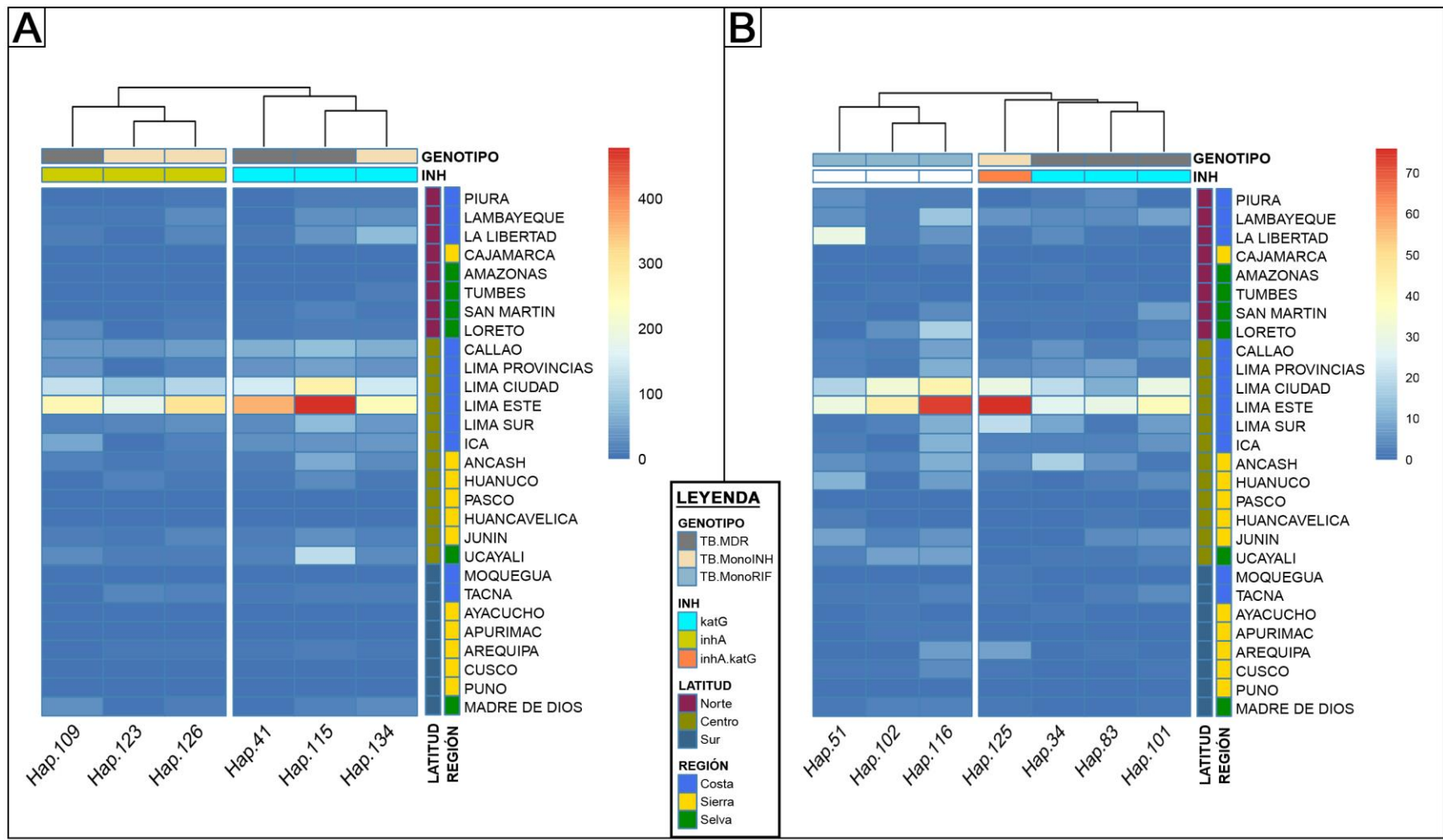


Figura 17: distribución de haplotipos más representativos a nivel nacional. Mapa de calor de la distribución de frecuencias absolutas de los haplotipos comunes (A) y menos comunes (B), a través de las 28 DISAS/DIRESAS de todo el país. Cada mapa de calor está separado en función de la distancia genética evidenciada mediante el dendrograma.

Por otro lado, el análisis de AMOVA determinó que no existe una estructuración genética ya que el mayor grado de variación se encuentra dentro de las poblaciones (97.79 - 98.15 %) y no entre grupos. Además, el índice F_{ST} de los tres casos varía entre 0.019 – 0.022, es decir no existe una significativa diferenciación entre los grupos (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados del AMOVA. Se detalla la varianza molecular para las tres estructuras propuestas por conveniencia. g.l: grados de libertad. Sig: significancia. F_{ST} : índice de fijación.

Estructura	Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Porcentaje variación	F_{ST}	Sig
– Costa – Sierra – Selva	Entre grupos	2	46.57	0.7%	0.021	0.000
	Dentro de grupos	25	176.22	1.4%		
	Dentro de poblaciones	6561	12291.69	97.9%		
– Norte – Centro – Sur	Entre grupos	2	43.34	0.8%	0.022	0.000
	Dentro de grupos	25	179.45	1.4%		
	Dentro de poblaciones	6561	12291.69	97.8%		
– Lima – Resto del Perú	Entre grupos	1	39.09	0.4%	0.019	0.000
	Dentro de grupos	26	183.70	1.5%		
	Dentro de poblaciones	6561	12291.69	98.2%		

Finalmente, el análisis discriminante de componentes principales determinó que solo utilizando los primeros 5 componentes principales se logró captar el 91.7% de la variabilidad de los marcadores, y se observa que, a nivel de todo el Perú, no existe una clara diferenciación genética entre los marcadores utilizados (Figura 18).

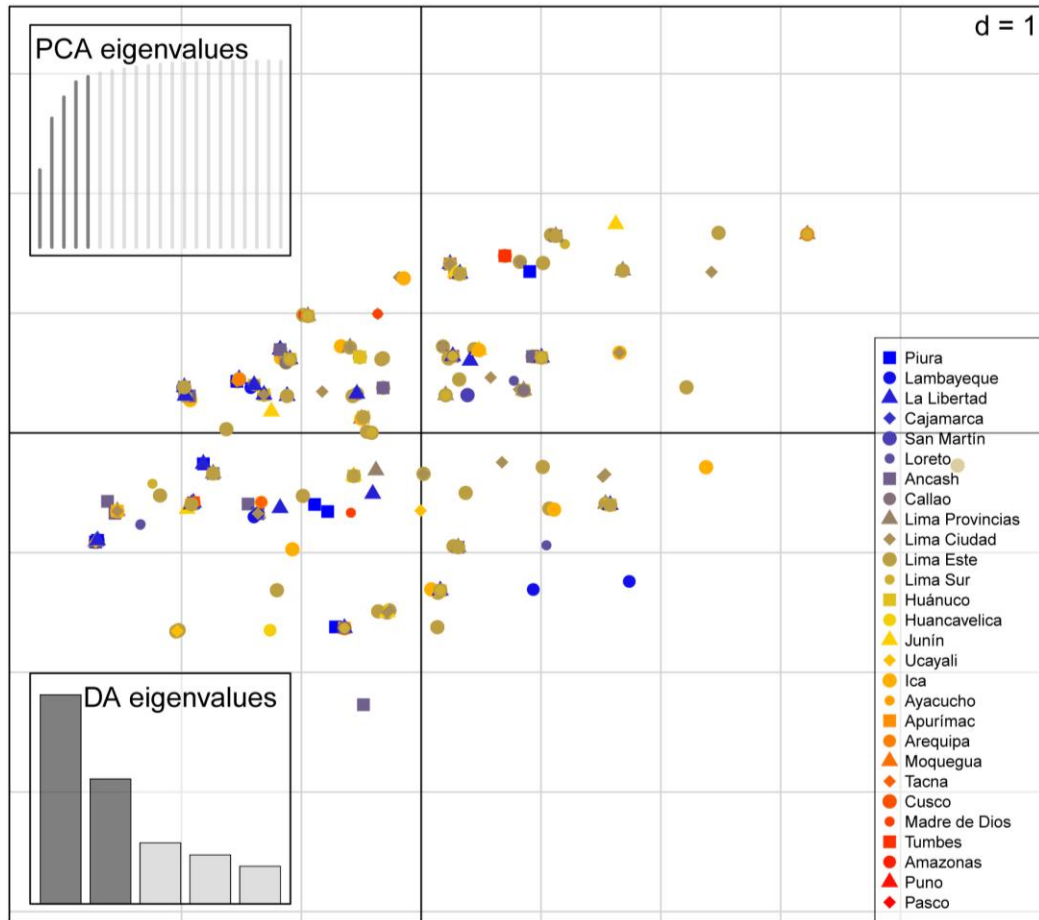


Figura 18: análisis discriminante de componentes principales.

Representación cartesiana de los dos mayores componentes principales obtenidos a partir del análisis de los 21 marcadores.

Respecto a la distribución de haplotipos comunes en los distritos pertenecientes a las provincias de Lima y Callao se observó que dichos haplotipos están presentes en casi todos los distritos (Figura 19, Anexo 7); sin embargo, la mayor prevalencia de haplotipos fue evidenciado en los distritos de Lima cercado, San Juan de Lurigancho, El Agustino y Ate. Los cuales en su mayoría pertenecen a la zona este de Lima. Así mismo, se observó que los haplotipos MDR (Hap-115, Hap-41 y Hap-109) afectaron en mayor proporción al distrito de Lima cercado, mientras que los haplotipos monorresistentes a isoniacida (Hap-134, Hap-126 y Hap-123), además de estar presentes en el distrito de Lima Cercado, también mostraron una gran proporción en el distrito de San Juan de

Lurigancho. Los haplotipos comunes MDR que están conformados por la mutación *rpoB* S531L (Hap-115 y Hap-109) presentaron una mayor representatividad en los distritos de la zona sur de Lima en comparación del haplotipo con la mutación *rpoB* D516V (Hap-41). Así mismo, este último haplotipo tuvo una alta representatividad en el distrito de El Agustino a comparación de los otros dos haplotipos MDR (Figura 19). Por otro lado, la distribución de los tres haplotipos monorresistentes a isoniacida evidenció que la mutación individual *katG* S315T (Hap-134) abarca casi todos los distritos de Lima y Callao; mientras que los haplotipos con mutaciones en la región promotora del gen *inhA* (Hap-126 y Hap-123) no se encuentran distribuido en una gran parte de la zona sur de Lima. Se observó también que el distrito de El Agustino tuvo una mayor proporción de haplotipos con mutaciones en el gen *inhA*. De manera similar, la distribución de los haplotipos menos comunes evidenció una fuerte prevalencia de estos en los distritos limítrofes previamente mencionados. Sin embargo, tampoco presentaron una alta representatividad en los distritos de la parte sur de Lima (Anexo 7).

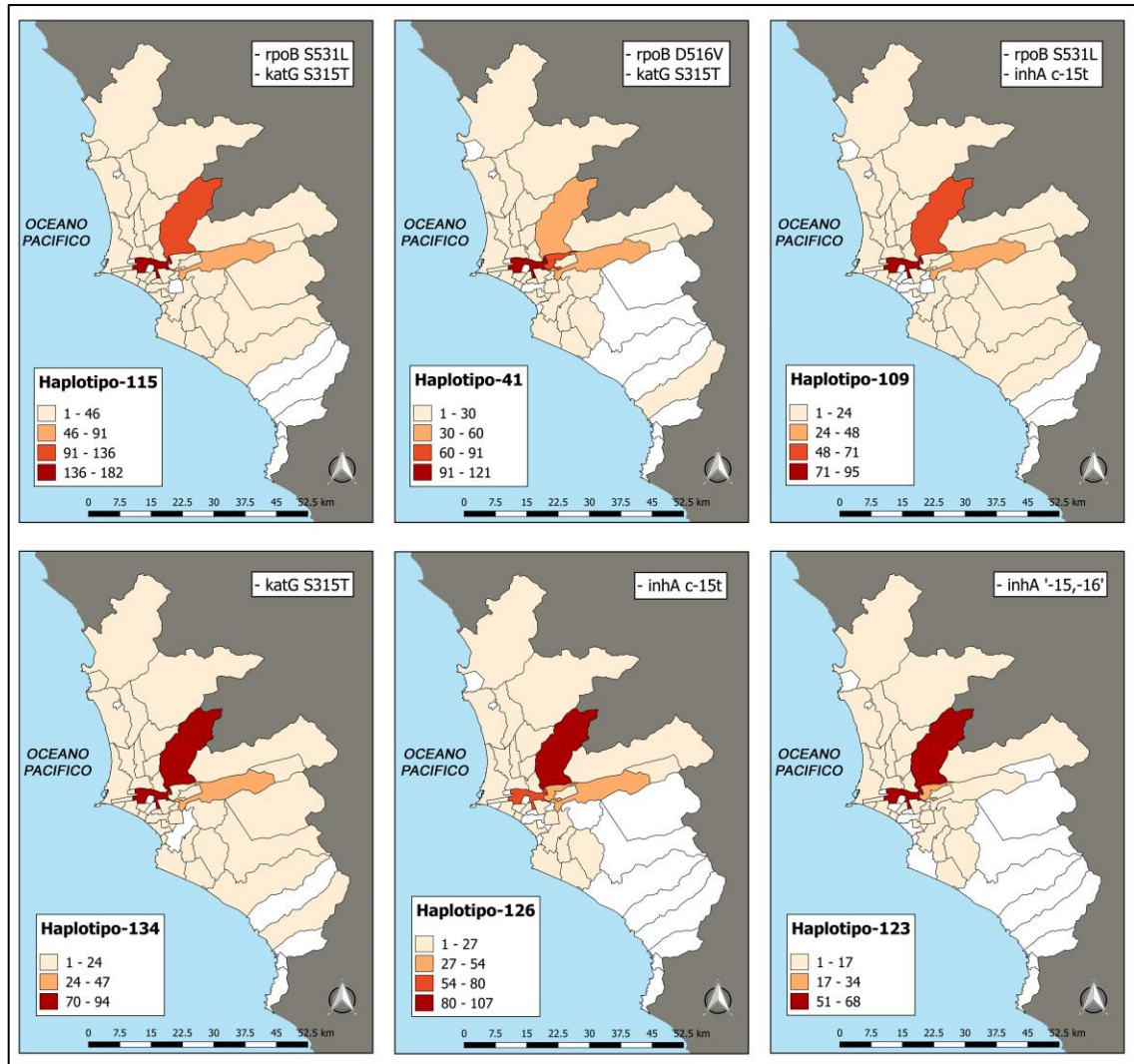


Figura 19: Distribución de haplotipos comunes en Lima y Callao. Se representa la distribución absoluta de casos (intensidad de fondo rojo) a nivel de distritos de Lima y Callao. Los distritos con ningún caso son representados en fondo blanco.

5.8 Análisis de diversidad alfa y beta

5.8.1 Diversidad alfa

Los análisis fueron obtenidos utilizando los 134 haplotipos generados previamente y se determinó que la zona central del Perú cuenta con una gran riqueza haplotípica (S), seguida de la zona norte y, por último, la zona sur. Sin embargo, se evidencia

que en el centro las regiones de Pasco y Huancavelica presentan una baja riqueza con valores de 1 y 7, respectivamente. En la zona norte, son los lugares de Cajamarca, Amazona y Tumbes, los cuales evidencian una baja riqueza con valores de solo 5, 3 y 12, respectivamente. Finalmente, en la zona Sur la mayor parte de lugares presenta una baja riqueza haplotípica (Tabla 13).

Por otro lado, el análisis de dominancia de haplotipos (D) evidenció que las regiones de Pasco y Puno muestran una dominancia completa ($D=1$), mientras que el resto muestra bajos valores de dominancia ($0.1 \leq D \leq 0.33$). De manera contraria, el índice de diversidad de Simpson ($1-D$) muestran a estas regiones con una mayor diversidad haplotípica a comparación de Pasco y Puno. El análisis de equitabilidad (heterogeneidad) fue realizado mediante el índice de Shannon-Wiener (H) evidenciando que en general, las regiones presentaron un índice de Shannon entre 1 y 3, excepto Pasco y Puno los cuales tuvieron valores de cero cada uno. De este modo, se determinó que 22 localidades presentaron una alta biodiversidad, 04 presentaron una biodiversidad intermedia y solo 02 tuvieron una baja biodiversidad (Figura 20, Tabla 13).

Tabla 13: índices de diversidad haplotípica según lugar de procedencia.

Los colores evidencian los valores de menor a mayor escala obtenidos, por cada índice. N: Número de muestras (abundancia), S: número de haplotipos (riqueza haplotípica), D: dominancia, '1-D': índice de diversidad de Simpson, H: índice de Shannon.

	PROCEDENCIA	N	S	D	1-D	H	GRADO DE BIODIVERSIDAD
Norte	PIURA	67	21	0.1	0.9	2.6	ALTA
	LAMBAYEQUE	175	29	0.1	0.9	2.72	ALTA
	LA LIBERTAD	247	29	0.16	0.84	2.33	ALTA
	CAJAMARCA	9	5	0.28	0.72	1.43	INTERMEDIA
	AMAZONAS	3	3	0.33	0.67	1.1	INTERMEDIA
	TUMBES	33	12	0.2	0.8	2.03	ALTA
	SAN MARTÍN	70	19	0.11	0.89	2.53	ALTA
LORETO	115	21	0.12	0.88	2.45	ALTA	
Centro	CALLAO	389	28	0.14	0.86	2.3	ALTA
	LIMA PROVINCIAS	246	31	0.11	0.89	2.58	ALTA
	LIMA CIUDAD	1222	65	0.11	0.89	2.71	ALTA
	LIMA ESTE	2410	80	0.11	0.89	2.69	ALTA
	LIMA SUR	315	37	0.11	0.89	2.71	ALTA
	ICA	235	28	0.13	0.87	2.44	ALTA
	ANCASH	220	27	0.12	0.88	2.57	ALTA
	HUANUCO	99	18	0.13	0.87	2.38	ALTA
	PASCO	2	1	1	0	0	BAJA
	HUANCAVELICA	10	7	0.16	0.84	1.89	ALTA
	JUNIN	147	22	0.1	0.9	2.59	ALTA
UCAYALI	269	24	0.25	0.75	2.06	ALTA	
Sur	MOQUEGUA	5	4	0.28	0.72	1.33	INTERMEDIA
	TACNA	86	16	0.15	0.85	2.18	ALTA
	AYACUCHO	17	9	0.15	0.85	2.04	ALTA
	APURIMAC	3	3	0.33	0.67	1.1	INTERMEDIA
	AREQUIPA	62	13	0.12	0.88	2.28	ALTA
	CUSCO	23	12	0.11	0.89	2.33	ALTA
	PUNO	1	1	1	0	0	BAJA
MADRE DE DIOS	109	20	0.17	0.83	2.2	ALTA	

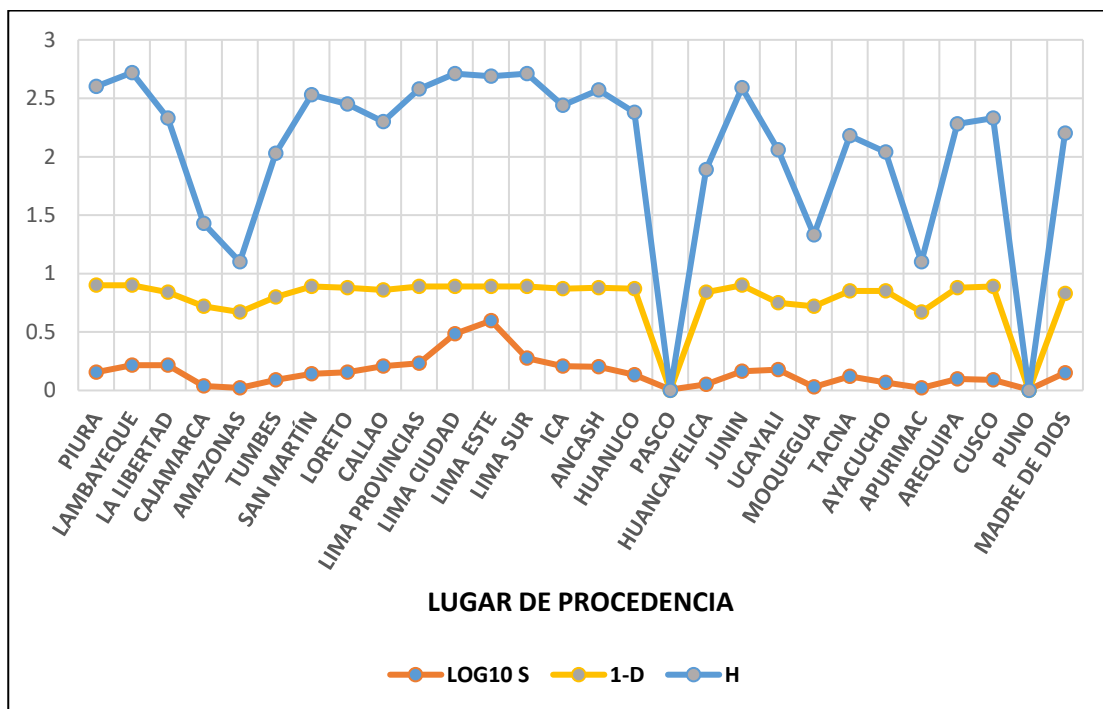


Figura 20: representación gráfica de índices de Biodiversidad haplotípica. S: riqueza haplotípica, '1-D': índice de diversidad de Simpson, H: índice de Shannon.

5.8.2 Diversidad beta

El análisis de diversidad beta entre las DISAS de Lima y callao evidenciaron que en general, todas las Disa presentan una gran diferenciación haplotípica entre ellas. La mayor diferenciación (60%) ocurrió entre las Disa de Callao y Lima este. Siendo que esta diferencia es principalmente debida al efecto de riqueza de haplotipos (60%) a comparación del reemplazo de especies (7%). Por otro lado, la menor diferenciación genética (36%) ocurrió entre Callao y Lima Provincias, siendo influenciada principalmente por el reemplazo de especies (30%) a comparación de la riqueza (6%) de haplotipos.

En general, la diversidad beta fue principalmente influenciada por la riqueza de haplotipos entre las comparaciones de Lima Ciudad-Callao, Lima Ciudad-Lima Provincias, Lima Este-Callao y Lima Este-Lima Provincias. Mientras que en el resto de las comparaciones fue predominante el componente de reemplazo de haplotipos, con excepción de la comparación entre Lima Sur-Lima Este, en el cual ambos componentes fueron relativamente similares (24% y 39% para el reemplazo y riqueza de haplotipos, respectivamente) (Figura 21).

Indice de Diversidad de Jaccard				
	Callao	Lima Provincias	Lima Ciudad	Lima Este
Lima Provincias	36%			
Lima Ciudad	63%	57%		
Lima Este	67%	63%	51%	
Lima Sur	49%	49%	58%	62%

Componente "Reemplazo de haplotipos"				
	Callao	Lima Provincias	Lima Ciudad	Lima Este
Lima Provincias	30%			
Lima Ciudad	19%	12%		
Lima Este	7%	6%	41%	
Lima Sur	35%	41%	32%	24%

Componente "Riqueza de haplotipos"				
	Callao	Lima Provincias	Lima Ciudad	Lima Este
Lima Provincias	6%			
Lima Ciudad	44%	45%		
Lima Este	60%	57%	9%	
Lima Sur	14%	8%	27%	39%

Figura 21: componentes de la diversidad beta en Lima y Callao. Cuadro comparativo del grado de diferenciación de la biodiversidad en las DISAS de lima y callao. Se detalla el grado de influencia de los componentes 'Reemplazo de haplotipos' y 'Riqueza de haplotipos' para cada una de las comparaciones pareadas.

5.9 Asociación de Haplotipos

5.9.1 Haplotipos y Sexo del paciente

El análisis de asociación de haplotipos con el sexo del paciente de quien se obtuvo la muestra original dio como resultado una asociación positiva del haplotipo común

109 con muestras aisladas de pacientes con sexo masculino; sin embargo, se evidenció una confianza mínima de asociación. Ningún haplotipo resultó asociado con aislamientos de pacientes con sexo femenino (Tabla 14).

5.9.2 Haplotipos y Fenotipos resistentes

5.9.2.1 Haplotipos y sensibilidad

Se obtuvieron 5 asociaciones confiables: 'Hap-23', 'Hap-51', 'Hap-63', 'Hap-84' y 'Hap-102'. Dos (40%) haplotipos correspondieron a la clase menos común, mientras que el resto a la clase rara. Todos los haplotipos presentaron mutaciones únicamente en el gen *rpoB* y evidenciaron discordancia categórica con la resistencia fenotípica a rifampicina. Ningún haplotipo evidenció la presencia de banda MUT alguna, pero sí la ausencia de las bandas: WT2 (Hap-23), WT3 (Hap-51), WT4 (Hap-63), WT7 (Hap-84) y WT8 (Hap-102) (Tabla 14). El análisis *Post hoc* de los resultados discordantes determinó que estas mutaciones discordantes estuvieron presentes en 231 muestras. Así mismo, se determinó que la ausencia individual de los marcadores *rpoB* WT2, WT3 y WT4, en conjunto, presentan un promedio de 72.5% de discordancia; mientras que la de los marcadores WT3-4, WT7 y WT8 presentan un promedio de 29.8%. Estos resultados indican que los tres primeros marcadores están más asociados con resultados fenotípicos sensibles, por el Método de Proporciones Agar 7H10, mientras que los tres últimos están más asociados con resultados fenotípicos resistentes (Figura 22).

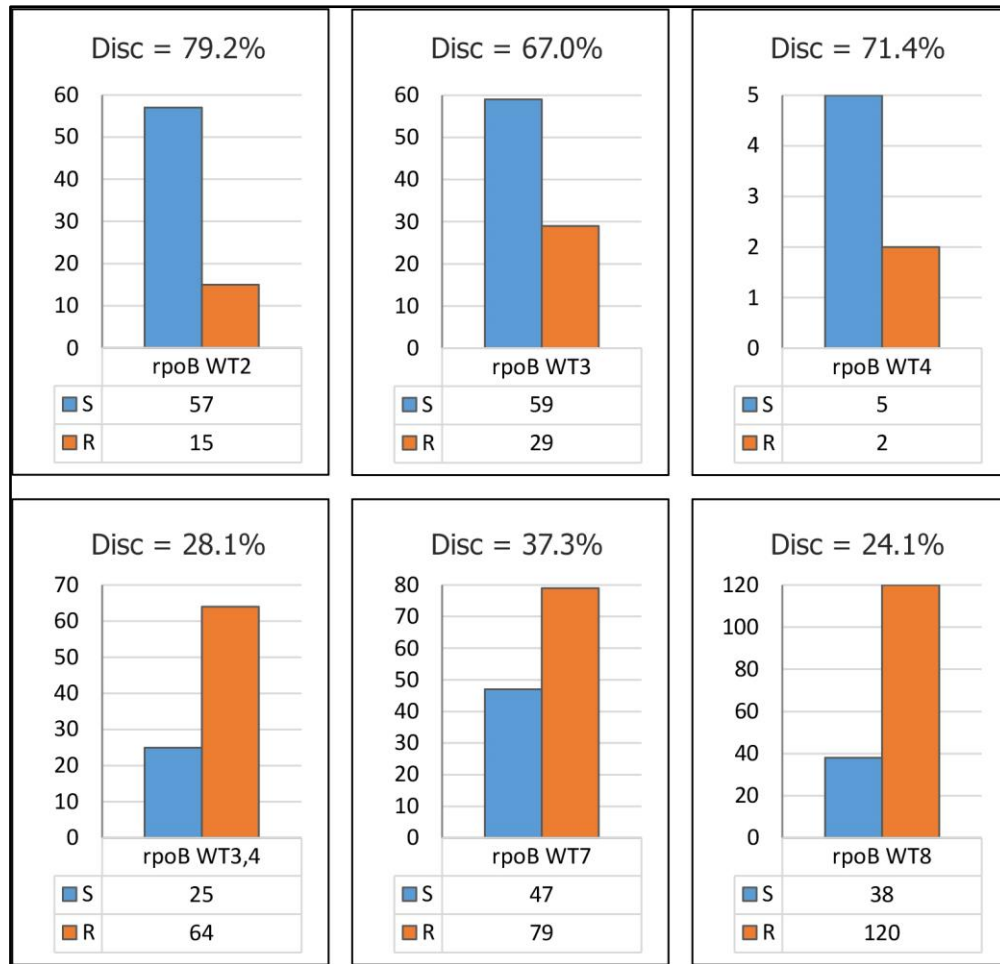


Figura 22: análisis de resultados discordantes para la resistencia a rifampicina. S: sensibilidad fenotípica a RIF, R: resistencia fenotípica a RIF. Disc: discordancia.

5.9.2.2 Haplotipos y monorresistencia a Isoniacida

Se obtuvieron 6 asociaciones confiables: 'Hap.21', 'Hap.123', 'Hap.125', 'Hap.126', 'Hap.132' y 'Hap.134'. De los cuales, tres (50%) haplotipos fueron de la clase común, uno (16.7%) menos común y dos (33.3%) raros. En dos haplotipos se observó que la resistencia fenotípica a isoniacida estuvo causada por mutaciones únicamente en el gen *katG*, mientras que en tres haplotipos estuvo causada por mutaciones en el gen *inhA*; solo un haplotipo presentó mutaciones simultáneas en estos dos genes. En general, las asociaciones tuvieron una alta confiabilidad con

excepción del Haplotipo 21, el cual presentó una confiabilidad intermedia; del mismo modo, este haplotipo fue el único que evidenció un patrón discordante debido a la presencia indirecta de una mutación en el gen *rpoB*, específicamente en los codones 510-512 (Tabla 14).

5.9.2.3 Haplotipos y monorresistencia a Rifampicina

Se obtuvieron 8 asociaciones confiables: 'Hap.35', 'Hap.42', 'Hap.51', 'Hap.84', 'Hap.88', 'Hap.93', 'Hap.102' y 'Hap.116'. Todos los haplotipos presentaron mutaciones únicamente en el gen *rpoB*. No se asoció ningún haplotipo de clase común. Tres (37.5%) haplotipos fueron de la clase menos común y cinco (62.5%) raros. Cuatro (50%) haplotipos presentaron mutaciones detectadas directamente mediante el GenoType MTBDR_{plus} v2.0, mientras que el resto presentó mutaciones detectadas indirectamente. Respecto a las mutaciones de detección directa se observó un haplotipo con cada una de las cuatro mutaciones. Las asociaciones tuvieron alta (62.5%) e intermedia (37.5%) confiabilidad. No se evidenciaron asociaciones con confiabilidad mínima (Tabla 14).

5.9.2.4 Haplotipos y multidrogorresistencia

Se obtuvieron 8 asociaciones confiables: 'Hap.35', 'Hap.42', 'Hap.51', 'Hap.84', 'Hap.88', 'Hap.93', 'Hap.102' y 'Hap.116'. Se observaron tres (25%) haplotipos de clase común, dos (16.7%) de clase menos común y siete (58.3%) de clase rara. Ocho haplotipos presentaron las mutaciones de detección directa, siendo la S531L la más frecuente presente en tres haplotipos, seguido de D516V y H526Y con dos haplotipos cada uno y H526D con un haplotipo. Respecto a la resistencia a isoniacida, siete (58.3%) haplotipos presentaron únicamente la mutación de detección directa S315T1 del gen *katG*, tres (25%) haplotipos presentaron

únicamente mutaciones en la región promotora del gen *inhA* (dos con la mutación c-15t y uno con mutación de detección indirecta) y dos (16.7%) haplotipos con las mutaciones simultáneas “c-15t y S315T1” de los genes *inhA* y *katG* respectivamente. Las asociaciones tuvieron alta (75%), intermedia (16.7%) y mínima (8.3%) confiabilidad (Tabla 14).

5.9.2.5 Haplotipos y extensa drogorresistencia

Se obtuvieron tres resultados de asociación confiables: ‘Hap.41’, ‘Hap.80’ y ‘Hap106’, de los cuales el primero es un haplotipo de clase común y el resto de clase rara. Los tres haplotipos presentan marcadores de resistencia para rifampicina e isoniacida simultáneamente. Respecto a la resistencia a rifampicina, dos haplotipos presentaron mutaciones de detección directa en el gen *rpoB* (D516V y S531L). Respecto a la resistencia a isoniacida, los tres haplotipos presentaron la mutación S315T1 en el gen *katG* y solo en dos haplotipos dichas mutaciones estuvieron acompañadas de mutaciones en el gen *inhA*. Los dos haplotipos raros evidenciaron una alta confiabilidad mientras que el común obtuvo una mínima confiabilidad (Tabla 14).

5.9.3 Haplotipos y Estado de Tratamiento

Se obtuvieron 6 asociaciones confiables, las cuales están divididas en grupos de tres respecto a la condición de ‘Antes Tratado’ y ‘Nunca Tratado’. Así, para el primero se asociaron los haplotipos: ‘Hap.109’, ‘Hap.115’ y ‘Hap.116’; para el segundo se asociaron los haplotipos: ‘Hap.123’, ‘Hap.126’ y ‘Hap.134’. Todos estos haplotipos fueron de clase común, a excepción del haplotipo 116 el cual fue de clase menos común. Respecto a los haplotipos asociados con la condición ‘Antes Tratado’, todos los haplotipos presentaron la mutación S531L en el gen *rpoB*, y un haplotipo

presentó la mutación c-15t en el gen *inhA*, mientras que otro presentó la mutación S315T1 en el gen *katG*. De este modo, resultaron asociados dos haplotipos correspondientes a genotipos multidrogoresistentes y un haplotipo correspondiente a genotipo monorresistente a rifampicina. Respecto a los haplotipos asociados con la condición 'Nunca Tratado', todos los haplotipos correspondieron a genotipos monorresistentes a isoniacida. De entre los cuales un haplotipo solo presentó la mutación S315T1 y los dos restantes presentaron variantes en el gen *inhA* (uno con la mutación c-15t y el otro con resistencia de detección indirecta en el mismo gen). Los seis haplotipos, a pesar de ser de la clase común en su mayoría, tuvieron un grado de confiabilidad mínima (Tabla 14).

6 DISCUSIÓN

La tuberculosis en el Perú constituye un problema de salud pública con un alto componente social, económico y político. Ante esto, el país ha fortalecido las intervenciones para enfrentar esta enfermedad orientadas a la disminución progresiva y sostenida de los casos de tuberculosis sensible y drogorresistente mediante el diagnóstico adecuado y tratamiento oportuno. De esta manera, se busca interrumpir la cadena de transmisión en la comunidad, a través de la captación oportuna y el seguimiento de casos y contactos de personas afectadas por la tuberculosis. Una de estas medidas ha comprendido la inclusión del diagnóstico molecular de la tuberculosis y detección de resistencia frente a las drogas rifampicina e isoniacida usando el ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 (Asencios et al. 2012; Obregón et al. 2018; Puyén et al. 2016).

El análisis de los haplotipos comunes y menos comunes obtenidos permitió determinar la existencia de una alta carga de MDR (10%) entre las cepas de MTB circulantes a nivel nacional. Este resultado es concordante con el reporte global de la tuberculosis del año 2019 en donde se incluye al Perú como uno de los 30 países a nivel mundial con mayor carga de TB-MDR (World Health Organization 2019). Sin embargo, solamente la detección de tres haplotipos comunes con monorresistencia a isoniacida, que representan el 30% del total de casos con tuberculosis resistentes analizados, evidencia la alta incidencia de este tipo de tuberculosis en el país. En el 2018 se estima que, a nivel mundial, la TB monorresistente a isoniacida en promedio afectó al 7.2% (95% IC: 6.2–8.2%) de casos nuevos y al 11.6% (95% CI: 9.9–13.3%) de casos antes tratados, comportamiento que se ha venido manteniendo desde años anteriores (World Health Organization 2017; 2018; 2019). El porcentaje nacional de TB monorresistente a INH (6%) establece que el Perú no es ajeno a esta realidad mundial. Esta mayor proporción de casos monorresistentes a INH, a comparación de los casos monorresistentes a RIF, ha sido observado desde la década

pasada y continúa extendiéndose hasta la actualidad en el Perú y el mundo (Alarcón et al. 2017; Dean et al. 2020; Jenkins, Zignol y Cohen 2011).

En el Perú, el uso del ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 permite detectar la monorresistencia a isoniacida adecuadamente. Sin embargo, a nivel global la resistencia a la rifampicina siempre ha sido priorizada, y las tecnologías han sido dirigidas a dicho objetivo (WHO 2013). Sin embargo, la no detección de resistencia a isoniacida, provocaría que los pacientes sensibles a la rifampicina con un estado de isoniacida desconocido pueden ser tratados erróneamente como tuberculosis sensible a los medicamentos. Por lo tanto, en el Perú los algoritmos de diagnóstico no deben desestimar los exámenes de resistencia a isoniacida, ya que el mal diagnóstico de esta resistencia ha sido asociada con malos resultados en el tratamiento o recaídas y el desarrollo de resistencia a los medicamentos adicionales, tales como la MDR, durante el tratamiento (Báez-Saldaña et al. 2016; Pecho-Silva, Navarro-Solsol y Chiappe-Gonzalez 2019; Stagg et al. 2017).

Caso aparte, la monorresistencia a RIF es rara a nivel mundial y también está asociada a malos resultados en el tratamiento además de evolucionar fácilmente a casos MDR y XDR (Mvelase et al. 2019). Los resultados determinan que nuestro país exhibe una muy baja incidencia (1.8%) del total de caso de TB, la cual también está de acuerdo con las incidencias globales (World Health Organization 2019). Así mismo, nuestras estadísticas revelan que 8.5 de cada 10 casos con resistencia a rifampicina serán casos MDR. Sin embargo, dado que en nuestro país se tiene incorporado en los programas nacionales de diagnóstico de la resistencia las metodologías moleculares GenoType MTBDR*plus* y Gene XPERT MTB/RIF, se asegura una correcta detección tanto de la TB monorresistente a rifampicina, así como a la TB-MDR.

El análisis de ligamiento génico y el análisis de las frecuencias de mutaciones detectadas por el ESL evidencian la gran estabilidad genética de las especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Dos Vultos et al. 2008), y el carácter clonal de las infecciones de MTB (Pérez-Lago et al. 2017). Así mismo, la inexistencia de una estructuración geográfica de los marcadores de resistencia establece que en el Perú continúan prevaleciendo los marcadores genéticos asociados a resistencia de RIF e INH de mayor incidencia en América y el resto del mundo (*rpoB* D516V, *rpoB* S531L, *katG* S315T, *inhA* c-15t), las cuales son detectadas de manera directa mediante el ESL GenoType MTBDRplus v2.0 (Asencios et al. 2012; Dantas et al. 2017; Javed et al. 2018; Lanzas et al. 2016; Liu et al. 2017; Nikolayevskyy et al. 2009). La elevada prevalencia de estas mutaciones puede estar asociada con el hecho de que específicamente estas alteraciones del genoma de MTB no tienen un costo, o presentan un muy bajo costo, en el *fitness* biológico de las cepas. Así mismo, se ha evidenciado la existencia de mutaciones compensatorias en otras regiones génicas, tales como el en *rpoC*, que están asociadas con estas mutaciones prevalentes, ayudando a la diseminación de estas cepas resistentes, incluso con mayor éxito a comparación de las cepas sensibles (Munir et al. 2019; Spies et al. 2013). Sin embargo, existe una moderada cantidad de cepas resistentes que no presentan estas mutaciones, sino que únicamente son determinadas por la ausencia de la banda salvaje. Respecto el caso del gen *rpoB*, solamente los genotipos y haplotipos conteniendo ausencia de sondas salvaje tales como: WT2, WT3, WT2-WT3, WT3-WT4, WT7 y WT8 comprenden poco más del 20% del total de cepas resistentes a RIF. Esta determinación indirecta de la resistencia revela la gran diversidad de mutaciones ocurriendo solamente en la RDRR del gen *rpoB*. Muchas de estas mutaciones han sido evaluadas en estudios previos y han sido determinadas como ocurrencia de inserciones, deleciones y variantes de nucleótido simple, tales como: D516A, D516T, N518del, L533P y S450W (Arandjelović et al. 2019; San et al. 2018; Vigo et al. 2019). Respecto al gen *katG*, se

observa que solo el 0.5% del total de casos resistentes a isoniacida presenta una determinación indirecta de la resistencia. Este comportamiento puede deberse a las distintas variaciones naturales del codón 315 reportadas en estudios previos: S315I, S315N, S315G y S315R (San et al. 2018; Unissa et al. 2017; Vigo et al. 2019). Distinto es el caso para el análisis de la región promotora del gen *inhA*, donde la determinación indirecta de la resistencia comprende al menos un considerable 8% del total de cepas resistentes a INH (específicamente ausencia del WT1). De acuerdo a la literatura científica, el cambio nucleotídico más probable, localizada en esta región génica, sería la mutación g-17t (Vigo et al. 2019; Walker et al. 2015).

El uso de haplotipos, a comparación de los SNPs, se presenta como una mejor herramienta para el análisis de las asociaciones entre los distintos componentes genéticos y las características fenotípicas producidas. Permite evaluar la interacción en 'cis' de los distintos marcadores genéticos (Liu, Zhang y Zhao 2008; Morris y Kaplan 2002), y mediante la inclusión tanto de SNPs comunes como raros se logra obtener una mejor comprensión de la variabilidad genética presente en los organismos (Sykes et al. 2011). El gran número de haplotipos obtenidos (n=134) evidencia una alta variabilidad de los marcadores genéticos en las muestras de MTB circulantes en el territorio nacional. La concatenación de los loci variables para formar 'haplotipos resistentes' permitió obtener un método con un alto poder discriminatorio (IDHG=0.89) para los genes de resistencia asociados a rifampicina e isoniacida. De acuerdo con diferentes estudios previos en MTB, valores del IDHG mayores a 0.6 caracterizan a los sistemas de discriminación con un alto poder resolutivo (Sola et al. 2003), y para la obtención de una mayor confiabilidad en el poder discriminatorio se dispone que al menos sean de 0.9 (Mokrousov 2017). Ante esto, el uso de los haplotipos de resistencia obtenidos permite una buena tipificación de la variabilidad genética de MTB a nivel de los genes *rpoB*, *inhA* y *katG*. La representatividad del 87.9% obtenida por solo 13

haplotipos (comunes y menos comunes), así como el análisis de genes individuales, muestran el predominio de un reducido número de mutaciones como causantes de la resistencia a rifampicina e isoniacida en el Perú. Por otro lado, la clara diferenciación del fenograma en dos grupos guiados por la presencia de la mutación *katG* S315T, así como la elevada prevalencia de ésta en los haplotipos TB-MDR comunes o menos comunes, corrobora que esta mutación es un fuerte predictor de la TB-MDR (Manson et al. 2017).

El análisis de haplotipos través de los departamentos muestra que no existe una estructuración significativa de los marcadores de resistencia a nivel regional o departamental. Sin embargo, se determina que las provincias de Lima y Callao continúan conteniendo la mayoría de los casos de TB-DR a nivel nacional (DGE-MINSA 2016; 2019). En especial el distrito de Lima cercado y aquellos pertenecientes a la zona este. Distritos que a través de los años han sido asociados con el hacinamiento y pobreza en la capital del país, los cuales son factores de conocida asociación con el desarrollo de la TB y sus diversas formas drogorresistentes (WHO 2005). Sin embargo, el análisis de diversidad beta demuestra que en las provincias de Lima y callao no existe una homogeneidad compartida de haplotipos entre las distintas direcciones de salud, lo cual evidencia una ligera estructuración local de haplotipos. Esto también se corrobora, por ejemplo, con la prevalencia de haplotipos TB-MDR en el distrito de cercado de Lima, y con la fuerte presencia de haplotipos monorresistentes a isoniacida hacia el distrito de san juan de Lurigancho.

Finalmente, el análisis de asociación entre todos los haplotipos y los resultados de la prueba *gold estandar* evidencian una alta concordancia entre las mutaciones encontradas y los respectivos fenotipos de resistencia. Sin embargo, se observan ciertas asociaciones entre mutaciones del gen *rpoB* y el fenotipo sensible a rifampicina, las cuales se encuentran

representadas por la única ausencia de las sondas salvajes WT2 (Hap-21 y 23), WT3 (Hap-51), WT4 (Hap-63), WT7 (Hap-84) y WT8 (Hap-102). Estos haplotipos también muestran distintos grados de asociación con fenotipos resistentes, lo cual evidencia que, en un porcentaje minoritario, existen mutaciones que no necesariamente confieren resistencia a rifampicina. Fuerte evidencia científica señala la existencia de mutaciones controversiales en estas regiones génicas, tales como los cambios no sinónimos L511P (WT2), D516Y/G (WT3, WT4), H526N/L/C/S (WT7), S531C (WT8) y L533P (WT8), las cuales dan como resultado fenotipos sensibles en medios de cultivo sólido (7H10, Lowenstein-Jensen) y/o líquido (MGIT) (Al-Mutairi et al. 2019; Jamieson et al. 2014; Miotto et al. 2018; Rigouts et al. 2013; Van Deun et al. 2013). Este tipo de mutaciones causan bajos niveles de resistencia (concentraciones críticas menores a las dispuestas por la OMS) a rifampicina, por lo que han sido asociadas con pobres resultados en el tratamiento, así como un retraso en el crecimiento en los medios de cultivo (Miotto et al. 2018; Torrea et al. 2019). Ante esto, se vienen realizando más estudios sobre el efecto de las distintas mutaciones detectadas en los genes de resistencia y determinando la asociación de estas con resistencia a bajas, intermedias o altas concentraciones. Llegándose a determinar la importancia de detección de éstas mediante distintas pruebas moleculares (GenoType MTBDR, Xpert MTB/RIF, Secuenciamiento de ADN, etc.) por encima de las pruebas fenotípicas, las cuales en general toman como punto de corte una sola concentración crítica (Chiang, Fan y Jou 2018; Miotto et al. 2018; Walker et al. 2015).

7 CONCLUSIONES

El análisis de haplotipos y mutaciones obtenidos por el ESL GenoType MTBDR*plus* v2.0 permite determinar las frecuencias de la TB-MDR, y TB monorresistentes a rifampicina e isoniacida circulantes en el territorio peruano. El Perú posee una importante carga de

tuberculosis monorresistente a isoniacida por lo que los algoritmos de diagnóstico a nivel nacional deben continuar incluyendo las pruebas que incorporen el análisis de la resistencia a este fármaco a fin de obtener un diagnóstico preciso. Así mismo, el uso de haplotipos resistentes permite conocer la estructura genética de las mutaciones que determinan la resistencia a isoniacida y rifampicina en las cepas peruanas de *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas de MTB drogorresistentes circulando en el territorio peruano contienen principalmente los marcadores genéticos de resistencia de mayor incidencia en América y el resto del mundo. Así mismo, se evidencia la potencial existencia de mutaciones controversiales que pueden afectar el correcto diagnóstico de los pacientes con tuberculosis. A través de los años las cepas drogorresistentes se encuentran circulando en todo el territorio nacional con una clara concentración en la capital del Perú; la cual, a su vez, alberga la mayor diversidad haplotípica.

Finalmente, este estudio sienta las bases para estudios posteriores de caracterización nucleotídica de los haplotipos que incorporan mutaciones detectadas indirectamente, y la evaluación respectiva de los efectos estructurales, funcionales y de crecimiento bacteriano causadas en las cepas peruanas de *Mycobacterium tuberculosis*.

8 BIBLIOGRAFÍA

- AGAPITO, J., NEYRA, V., CASTRO, J., ACCINELLI, R., RODRÍGUEZ, I. y ESPINOZA, J.R., 2002. Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a la rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 19, no. 3, pp. 117-123. ISSN 1726-4634.
- ALARCÓN, V., ALARCÓN, E., FIGUEROA, C. y MENDOZA-TICONA, A., 2017. Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 34, no. 2, pp. 299-310. ISSN 1726-4642.
- ALMEIDA DA SILVA, P.E.A. y PALOMINO, J.C., 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, no. 7, pp. 1417-1430. ISSN 1460-2091. DOI 10.1093/jac/dkr173.
- AL-MUTAIRI, N.M., AHMAD, S., MOKADDAS, E., ELDEEN, H.S. y JOSEPH, S., 2019. Occurrence of disputed *rpoB* mutations among *Mycobacterium tuberculosis* isolates phenotypically susceptible to rifampicin in a country with a low incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* [en línea], vol. 19. [Consulta: 31 julio 2019]. ISSN 1471-2334. DOI 10.1186/s12879-018-3638-z. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6318973/>.
- ANDO, H., KONDO, Y., SUETAKE, T., TOYOTA, E., KATO, S., MORI, T. y KIRIKAE, T., 2010. Identification of *katG* Mutations Associated with High-Level Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, no. 5, pp. 1793-1799. ISSN 0066-4804, 1098-6596. DOI 10.1128/AAC.01691-09.
- ARANDJELOVIĆ, I., MERKER, M., RICHTER, E., KOHL, T.A., SAVIĆ, B., SOLDATOVIĆ, I., WIRTH, T., VUKOVIĆ, D. y NIEMANN, S., 2019. Longitudinal Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis in a Hospital Setting, Serbia. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 25, no. 3, pp. 555-558. ISSN 1080-6040. DOI 10.3201/eid2503.181220.
- ARGYROU, A., JIN, L., SICONILFI-BAEZ, L., ANGELETTI, R.H. y BLANCHARD, J.S., 2006. Proteome-wide Profiling of Isoniazid Targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, vol. 45, no. 47, pp. 13947-13953. ISSN 0006-2960. DOI 10.1021/bi061874m.
- ASENCIOS, L., GALARZA, M., QUISPE, N., VÁSQUEZ, L., LEO, E., VALENCIA, E., RAMÍREZ, J., ACURIO, M., SALAZAR, R., MENDOZA-TICONA, A. y CÁCERES, O., 2012. Molecular test Genotype® MTBDRplus, an alternative to rapid detection of multidrug resistance tuberculosis. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, vol. 29, no. 1, pp. 92-98. ISSN 1726-4642.
- ASENCIOS, L., QUISPE, N., MENDOZA-TICONA, A., LEO, E., VÁSQUEZ, L., JAVE, O. y BONILLA, C., 2009. Vigilancia nacional de la resistencia a medicamentos

antituberculosos, Perú 2005-2006. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, vol. 26, no. 3, pp. 278-288. ISSN 1726-4634.

- ASHOK, R., AWDHESH, kalia y NISHAT, A., 1998. Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives - Volume 4, Number 2—June 1998 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 4, no. 2, pp. 195-209. DOI 10.3201/eid0402.980207.
- BÁEZ-SALDAÑA, R., DELGADO-SÁNCHEZ, G., GARCÍA-GARCÍA, L., CRUZ-HERVERT, L.P., MONTESINOS-CASTILLO, M., FERREYRA-REYES, L., BOBADILLA-DEL-VALLE, M., CANIZALES-QUINTERO, S., FERREIRA-GUERRERO, E., TÉLLEZ-VÁZQUEZ, N., MONTERO-CAMPOS, R., YANES-LANE, M., MONGUA-RODRIGUEZ, N., MARTÍNEZ-GAMBOA, R.A., SIFUENTES-OSORNIO, J. y PONCE-DE-LEÓN, A., 2016. Isoniazid Mono-Resistant Tuberculosis: Impact on Treatment Outcome and Survival of Pulmonary Tuberculosis Patients in Southern Mexico 1995-2010. *PLoS ONE* [en línea], vol. 11, no. 12. [Consulta: 5 enero 2020]. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0168955. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5193431/>.
- BAI, Y., WANG, Y., SHAO, C., HAO, Y. y JIN, Y., 2016. GenoType MTBDRplus Assay for Rapid Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, vol. 11, no. 3, pp. e0150321. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0150321.
- BARRICK, J.E. y LENSKI, R.E., 2009. Genome-wide mutational diversity in an evolving population of Escherichia coli. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 74, pp. 119-129. ISSN 0091-7451. DOI 10.1101/sqb.2009.74.018.
- BÁRTFAI, Z., SOMOSKÖVI, A., KÖDMÖN, C., SZABÓ, N., PUSKÁS, E., KOSZTOLÁNYI, L., FARAGÓ, E., MESTER, J., PARSONS, L.M. y SALFINGER, M., 2001. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, no. 10, pp. 3736-3739. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.39.10.3736-3739.2001.
- BASELGA, A., 2010. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. *Global Ecology and Biogeography*, vol. 19, no. 1, pp. 134-143. ISSN 1466-8238. DOI 10.1111/j.1466-8238.2009.00490.x.
- BASELGA, A., 2012. The relationship between species replacement, dissimilarity derived from nestedness, and nestedness. *Global Ecology and Biogeography*, vol. 21, no. 12, pp. 1223-1232. ISSN 1466-8238. DOI 10.1111/j.1466-8238.2011.00756.x.
- BASELGA, A. y ORME, C.D.L., 2012. betapart: an R package for the study of beta diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 3, no. 5, pp. 808-812. ISSN 2041-210X. DOI 10.1111/j.2041-210X.2012.00224.x.
- BOMBA, L., WALTER, K. y SORANZO, N., 2017. The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease. *Genome Biology* [en línea], vol. 18. [Consulta: 23 febrero 2020]. ISSN 1474-7596. DOI 10.1186/s13059-017-1212-4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408830/>.

- BROSSIER, F., VEZIRIS, N., TRUFFOT-PERNOT, C., JARLIER, V. y SOUGAKOFF, W., 2006. Performance of the Genotype MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampin and Isoniazid in Strains of Mycobacterium tuberculosis with Low- and High-Level Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 10, pp. 3659-3664. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.01054-06.
- BRUNTON, L., CHABNER, B. y KNOLLMAN, B., 2011. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12. S.l.: McGraw-Hill Education / Medica. ISBN 978-0-07-176939-6.
- CAWS, M., DUY, P.M., THO, D.Q., LAN, N.T.N., HOA, D.V. y FARRAR, J., 2006. Mutations Prevalent among Rifampin- and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from a Hospital in Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 7, pp. 2333-2337. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.00330-06.
- CHEN, H. y BOUTROS, P.C., 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, vol. 12, no. 1, pp. 35. ISSN 1471-2105. DOI 10.1186/1471-2105-12-35.
- CHIANG, T.-Y., FAN, S.-Y. y JOU, R., 2018. Performance of an Xpert-based diagnostic algorithm for the rapid detection of drug-resistant tuberculosis among high-risk populations in a low-incidence setting. *PLoS One*, vol. 13, no. 7, pp. e0200755. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0200755.
- CLIFF, J.M., KAUFMANN, S.H.E., MCSHANE, H., VAN HELDEN, P. y O'GARRA, A., 2015. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunological Reviews*, vol. 264, no. 1, pp. 88-102. ISSN 1600-065X. DOI 10.1111/imr.12269.
- COSCOLLA, M. y GAGNEUX, S., 2014. Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Seminars in Immunology*, vol. 26, no. 6, pp. 431-444. ISSN 1096-3618. DOI 10.1016/j.smim.2014.09.012.
- DANIEL, T.M., 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, vol. 100, no. 11, pp. 1862-1870. ISSN 0954-6111. DOI 10.1016/j.rmed.2006.08.006.
- DANIEL, T.M., 2011. Hermann Brehmer and the origins of tuberculosis sanatoria. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 15, no. 2, pp. 161-162, i. ISSN 1815-7920.
- DANTAS, N.G.T., SUFFYS, P.N., CARVALHO, W. da S., GOMES, H.M., DE ALMEIDA, I.N., FIGUEIREDO, L.J. de A., GONÇALVES, A.D., GOMGNIMBOU, M.K., REFREGIER, G., SOLA, C. y DE MIRANDA, S.S., 2017. Correlation between the BACTEC MGIT 960 culture system with Genotype MTBDRplus and TB-SPRINT in multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 112, no. 11, pp. 769-774. ISSN 0074-0276. DOI 10.1590/0074-02760170062.
- DEAN, A.S., ZIGNOL, M., CABIBBE, A.M., FALZON, D., GLAZIOU, P., CIRILLO, D.M., KÖSER, C.U., GONZALEZ-ANGULO, L.Y., TOSAS-AUGET, O., ISMAIL, N.,

- TAHSEEN, S., AMA, M.C.G., SKRAHINA, A., ALIKHANOVA, N., KAMAL, S.M.M. y FLOYD, K., 2020. Prevalence and genetic profiles of isoniazid resistance in tuberculosis patients: A multicountry analysis of cross-sectional data. *PLOS Medicine*, vol. 17, no. 1, pp. e1003008. ISSN 1549-1676. DOI 10.1371/journal.pmed.1003008.
- DEVELOPMENT CORE TEAM, R., 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R. Found. Stat. Comput.*, vol. 1.
- DGE-MINSA, 2016. *Análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú, 2015* [en línea]. febrero 2016. S.l.: Dirección General de Epidemiología. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3446.pdf>.
- DGE-MINSA, 2019. *Análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú 2019*. 2019. S.l.: s.n.
- DOS VULTOS, T., MESTRE, O., RAUZIER, J., GOLEC, M., RASTOGI, N., RASOLOFO, V., TONJUM, T., SOLA, C., MATIC, I. y GICQUEL, B., 2008. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One*, vol. 3, no. 2, pp. e1538. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0001538.
- EXCOFFIER, L. y LISCHER, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, vol. 10, no. 3, pp. 564-567. ISSN 1755-0998. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- FORRELLAD, M.A., KLEPP, L.I., GIOFFRÉ, A., SABIO Y GARCÍA, J., MORBIDONI, H.R., DE LA PAZ SANTANGELO, M., CATALDI, A.A. y BIGI, F., 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, vol. 4, no. 1, pp. 3-66. ISSN 2150-5608. DOI 10.4161/viru.22329.
- GAO, B. y GUPTA, R.S., 2012. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 76, no. 1, pp. 66-112. ISSN 1092-2172, 1098-5557. DOI 10.1128/MMBR.05011-11.
- GHASEMI, A. y ZAHEDIASL, S., 2012. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, vol. 10, no. 2, pp. 486-489. ISSN 1726-913X. DOI 10.5812/ijem.3505.
- GÜNTHER, G., GOMEZ, G.B., LANGE, C., RUPERT, S., VAN LETH, F. y TBNET, 2015. Availability, price and affordability of anti-tuberculosis drugs in Europe: a TBNET survey. *The European Respiratory Journal*, vol. 45, no. 4, pp. 1081-1088. ISSN 1399-3003. DOI 10.1183/09031936.00124614.
- GÜNTHER, G., VAN LETH, F., ALEXANDRU, S., ALTET, N., AVSAR, K., BANG, D., BARBUTA, R., BOTHAMLEY, G., CIOBANU, A., CRUDU, V., DAVILOVITS, M., DEDICOAT, M., DUARTE, R., GUALANO, G., KUNST, H., DE LANGE, W., LEIMANE, V., MAGIS-ESCURRA, C., MCLAUGHLIN, A.-M., MUYLLE, I., POLCOVÁ, V., PONTALI, E., POPA, C., RUMETSHOFER, R., SKRAHINA, A., SOLODOVNIKOVA, V., SPINU, V., TIBERI, S., VIIKLEPP, P. y LANGE, C., 2015.

- Multidrug-Resistant Tuberculosis in Europe, 2010–2011. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 21, no. 3, pp. 409-416. ISSN 1080-6040. DOI 10.3201/eid2103.141343.
- HAIN LIFESCIENCE, 2012. *GenoType MTBDRplus v2.0 - Manual*. febrero 2012. S.I.: s.n.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. y RYAN, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. , vol. 4, no. 1, pp. 9pp.
- HUNTER, P.R. y GASTON, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 26, no. 11, pp. 2465-2466. ISSN 0095-1137.
- HUTCHESON, K., 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology*, vol. 29, no. 1, pp. 151-154. ISSN 0022-5193. DOI 10.1016/0022-5193(70)90124-4.
- JAMIESON, F.B., GUTHRIE, J.L., NEEMUCHWALA, A., LASTOVETSKA, O., MELANO, R.G. y MEHAFFY, C., 2014. Profiling of rpoB Mutations and MICs for Rifampin and Rifabutin in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, no. 6, pp. 2157-2162. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.00691-14.
- JAVED, H., BAKUŁA, Z., PLEŃ, M., HASHMI, H.J., TAHIR, Z., JAMIL, N. y JAGIELSKI, T., 2018. Evaluation of Genotype MTBDRplus and MTBDRsl Assays for Rapid Detection of Drug Resistance in Extensively Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in Pakistan. *Frontiers in Microbiology* [en línea], vol. 9. [Consulta: 5 abril 2020]. ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2018.02265. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6169422/>.
- JENKINS, H.E., ZIGNOL, M. y COHEN, T., 2011. Quantifying the Burden and Trends of Isoniazid Resistant Tuberculosis, 1994–2009. *PLoS ONE* [en línea], vol. 6, no. 7. [Consulta: 5 enero 2020]. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0022927. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146514/>.
- JOMBART, T., DEVILLARD, S. y BALLOUX, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, vol. 11, pp. 94. ISSN 1471-2156. DOI 10.1186/1471-2156-11-94.
- KAMVAR, Z.N., TABIMA, J.F. y GRÜNWARD, N.J., 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, vol. 2, pp. e281. ISSN 2167-8359. DOI 10.7717/peerj.281.
- KAO, K.C. y SHERLOCK, G., 2008. Molecular Characterization of Clonal Interference during Adaptive Evolution in Asexual Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature genetics*, vol. 40, no. 12, pp. 1499-1504. ISSN 1061-4036. DOI 10.1038/ng.280.
- KELLEY, C.L., ROUSE, D.A. y MORRIS, S.L., 1997. Analysis of ahpC gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 9, pp. 2057-2058. ISSN 0066-4804.

- LANG, G.I., BOTSTEIN, D. y DESAI, M.M., 2011. Genetic Variation and the Fate of Beneficial Mutations in Asexual Populations. *Genetics*, vol. 188, no. 3, pp. 647-661. ISSN 0016-6731. DOI 10.1534/genetics.111.128942.
- LANZAS, F., IOERGER, T.R., SHAH, H., ACOSTA, W. y KARAKOUSIS, P.C., 2016. First Evaluation of GenoType MTBDRplus 2.0 Performed Directly on Respiratory Specimens in Central America. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 54, no. 10, pp. 2498-2502. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.01196-16.
- LEI, B., WEI, C.-J. y TU, S.-C., 2000. Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid ACTIVATION BY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KatG, ISOLATION, AND CHARACTERIZATION OF InhA INHIBITOR. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 4, pp. 2520-2526. ISSN 0021-9258, 1083-351X. DOI 10.1074/jbc.275.4.2520.
- LIU, N., ZHANG, K. y ZHAO, H., 2008. Haplotype-Association Analysis. *Advances in Genetics* [en línea]. S.l.: Academic Press, Genetic Dissection of Complex Traits, pp. 335-405. [Consulta: 5 abril 2020]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065266007004142>.
- LIU, Q., LI, G.-L., CHEN, C., WANG, J.-M., MARTINEZ, L., LU, W. y ZHU, L.-M., 2017. Diagnostic Performance of the GenoType MTBDRplus and MTBDRsl Assays to Identify Tuberculosis Drug Resistance in Eastern China. *Chinese Medical Journal*, vol. 130, no. 13, pp. 1521-1528. ISSN 0366-6999. DOI 10.4103/0366-6999.208248.
- LUCA, S. y MIHAESCU, T., 2013. History of BCG Vaccine. *Mædica*, vol. 8, no. 1, pp. 53-58. ISSN 1841-9038.
- MANSON, A.L., COHEN, K.A., ABEEL, T., DESJARDINS, C.A., ARMSTRONG, D.T., BARRY, C.E., BRAND, J., CHAPMAN, S.B., CHO, S.-N., GABRIELIAN, A., GOMEZ, J., JODALS, A.M., JOLOBA, M., JUREEN, P., LEE, J.S., MALINGA, L., MAIGA, M., NORDENBERG, D., NOROC, E., ROMANCENCO, E., SALAZAR, A., SSENGOOBA, W., VELAYATI, A.A., WINGLEE, K., ZALUTSKAYA, A., VIA, L.E., CASSELL, G.H., DORMAN, S.E., ELLNER, J., FARNIA, P., GALAGAN, J.E., ROSENTHAL, A., CRUDU, V., HOMORODEAN, D., HSUEH, P.-R., NARAYANAN, S., PYM, A.S., SKRAHINA, A., SWAMINATHAN, S., VAN DER WALT, M., ALLAND, D., BISHAI, W.R., COHEN, T., HOFFNER, S., BIRREN, B.W. y EARL, A.M., 2017. Genomic analysis of globally diverse Mycobacterium tuberculosis strains provides insights into emergence and spread of multidrug resistance. *Nature genetics*, vol. 49, no. 3, pp. 395-402. ISSN 1061-4036. DOI 10.1038/ng.3767.
- MATTEELLI, A., ROGGI, A. y CARVALHO, A.C., 2014. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. *Clinical Epidemiology*, vol. 6, pp. 111-118. ISSN 1179-1349. DOI 10.2147/CLEP.S35839.
- MICHENER, C.D. y SOKAL, R.R., 1957. A Quantitative Approach to a Problem in Classification. *Evolution*, vol. 11, no. 2, pp. 130-162. ISSN 0014-3820. DOI 10.2307/2406046.
- MINISTERIO DE SALUD - MINSA, PERÚ, 2018. Impacto económico de la tuberculosis en el Perú. [en línea], Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1820.pdf>.

- MIOTTO, P., CABIBBE, A.M., BORRONI, E., DEGANO, M. y 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* [en línea], vol. 56, no. 5. [Consulta: 21 noviembre 2019]. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.01599-17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5925711/>.
- MIOTTO, P., TESSEMA, B., TAGLIANI, E., CHINDELEVITCH, L., STARKS, A.M., EMERSON, C., HANNA, D., KIM, P.S., LIWSKI, R., ZIGNOL, M., GILPIN, C., NIEMANN, S., DENKINGER, C.M., FLEMING, J., WARREN, R.M., CROOK, D., POSEY, J., GAGNEUX, S., HOFFNER, S., RODRIGUES, C., COMAS, I., ENGELTHALER, D.M., MURRAY, M., ALLAND, D., RIGOUTS, L., LANGE, C., DHEDA, K., HASAN, R., RANGANATHAN, U.D.K., MCNERNEY, R., EZEWUDO, M., CIRILLO, D.M., SCHITO, M., KÖSER, C.U. y RODWELL, T.C., 2017. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *The European Respiratory Journal* [en línea], vol. 50, no. 6. [Consulta: 31 julio 2019]. ISSN 0903-1936. DOI 10.1183/13993003.01354-2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5898944/>.
- MOKROUSOV, I., 2017. Revisiting the Hunter Gaston discriminatory index: Note of caution and courses of change. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, vol. 104, pp. 20-23. ISSN 1873-281X. DOI 10.1016/j.tube.2017.02.002.
- MOKROUSOV, I., NARVSKAYA, O., OTTEN, T., LIMESCHENKO, E., STEKLOVA, L. y VYSHNEVSKIY, B., 2002. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, no. 5, pp. 1417-1424. ISSN 0066-4804.
- MORRIS, R.W. y KAPLAN, N.L., 2002. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles. *Genetic Epidemiology*, vol. 23, no. 3, pp. 221-233. ISSN 0741-0395. DOI 10.1002/gepi.10200.
- MUNIR, A., KUMAR, N., RAMALINGAM, S.B., TAMILZHALAGAN, S., SHANMUGAM, S.K., PALANIAPPAN, A.N., NAIR, D., PRIYADARSHINI, P., NATARAJAN, M., TRIPATHY, S., RANGANATHAN, U.D., PEACOCK, S.J., PARKHILL, J., BLUNDELL, T.L. y MALHOTRA, S., 2019. Identification and Characterization of Genetic Determinants of Isoniazid and Rifampicin Resistance in Mycobacterium tuberculosis in Southern India. *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1-13. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-019-46756-x.
- MURRAY, J.F., RIEDER, H.L. y 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*, vol. 20, no. 6, pp. 713-716. ISSN 1815-7920. DOI 10.5588/ijtld.16.0229.
- MUSSER, J.M., KAPUR, V., WILLIAMS, D.L., KREISWIRTH, B.N., VAN SOOLINGEN, D. y VAN EMBDEN, J.D., 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of Mycobacterium

- tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 173, no. 1, pp. 196-202. ISSN 0022-1899.
- MVELASE, N.R., BALAKRISHNA, Y., LUTCHMINARAIN, K. y MLISANA, K., 2019. Evolving rifampicin and isoniazid mono-resistance in a high multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis region: a retrospective data analysis. *BMJ Open*, vol. 9, no. 11, pp. e031663. ISSN 2044-6055, 2044-6055. DOI 10.1136/bmjopen-2019-031663.
- NIEHAUS, A.J., MLISANA, K., GANDHI, N.R., MATHEMA, B. y BRUST, J.C.M., 2015. High Prevalence of inhA Promoter Mutations among Patients with Drug-Resistant Tuberculosis in KwaZulu-Natal, South Africa. *PLOS ONE*, vol. 10, no. 9, pp. e0135003. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0135003.
- NIKOLAYEVSKYY, V., BALABANOVA, Y., SIMAK, T., MALOMANOVA, N., FEDORIN, I. y DROBNIEWSKI, F., 2009. Performance of the Genotype® MTBDRPlus assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation. *BMC Clinical Pathology*, vol. 9, pp. 2. ISSN 1472-6890. DOI 10.1186/1472-6890-9-2.
- OBREGÓN, G., ZEVALLOS, K., ALARCÓN, V., PUYÉN, Z.M., CHÁVEZ INAGAKI, O., MENDOZA-TICONA, A., ALARCÓN-ARRASCUE, E., HELDAL, E. y MOORE, D. a. J., 2018. Rapid drug susceptibility testing and treatment outcomes for multidrug-resistant tuberculosis in Peru. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 22, no. 11, pp. 1350-1357. ISSN 1815-7920. DOI 10.5588/ijtld.17.0894.
- PEAKALL, R. y SMOUSE, P.E., 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, vol. 6, no. 1, pp. 288-295. ISSN 1471-8286. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- PEAKALL, R. y SMOUSE, P.E., 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, vol. 28, no. 19, pp. 2537-2539. ISSN 1367-4803. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- PECHO-SILVA, S., NAVARRO-SOLSOL, A.C. y CHIAPPE-GONZALEZ, A., 2019. Resistencia a isoniácida, un problema de salud pública: historia y tratamiento. *Revista Peruana de Investigación en Salud*, vol. 3, no. 2, pp. 81-88. ISSN 2616-6097. DOI 10.35839/repis.3.2.264.
- PÉREZ-LAGO, L., HERRANZ, M., NAVARRO, Y., RUIZ SERRANO, M.J., MIRALLES, P., BOUZA, E. y GARCÍA-DE-VIDEYMA, D., 2017. Clonal Complexity in Mycobacterium tuberculosis Can Hamper Diagnostic Procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 55, no. 5, pp. 1388-1395. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.00149-17.
- PFENNIG, D.W., WUND, M.A., SNELL-ROOD, E.C., CRUICKSHANK, T., SCHLICHTING, C.D. y MOCZEK, A.P., 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 25, no. 8, pp. 459-467. ISSN 0169-5347. DOI 10.1016/j.tree.2010.05.006.

- PIATEK, A.S., TELENTI, A., MURRAY, M.R., EL-HAJJ, H., JACOBS, W.R., KRAMER, F.R. y ALLAND, D., 2000. Genotypic analysis of Mycobacterium tuberculosis in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, no. 1, pp. 103-110. ISSN 0066-4804.
- PULIDO-TAMAYO, S., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A., SWINGS, T., VAN DEN BERGH, B., DUBEY, A., STEENACKERS, H., MICHIELS, J., FOSTIER, J. y MARCHAL, K., 2015. Frequency-based haplotype reconstruction from deep sequencing data of bacterial populations. *Nucleic Acids Research*, vol. 43, no. 16, pp. e105. ISSN 1362-4962. DOI 10.1093/nar/gkv478.
- PUYÉN, Z.M., ACOSTA, J., OBREGON, G., PACHECO, E., RAMIREZ, H., MENDOZA, A., MARÍN, D. y HARRIES, A.D., 2016. Use and evaluation of a line probe assay in patients with tuberculosis in Peru: 2011–2013. *Revista Panamericana de Salud Pública*, vol. 39, pp. 19-25. ISSN 1020-4989, 1020-4989, 1680-5348.
- PYM, A.S., SAINT-JOANIS, B. y COLE, S.T., 2002. Effect of katG Mutations on the Virulence of Mycobacterium tuberculosis and the Implication for Transmission in Humans. *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 9, pp. 4955-4960. ISSN 0019-9567, 1098-5522. DOI 10.1128/IAI.70.9.4955-4960.2002.
- RIGOUTS, L., GUMUSBOGA, M., DE RIJK, W.B., NDUWAMAHORO, E., UWIZEYE, C., DE JONG, B. y VAN DEUN, A., 2013. Rifampin Resistance Missed in Automated Liquid Culture System for Mycobacterium tuberculosis Isolates with Specific rpoB Mutations. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 8, pp. 2641-2645. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.02741-12.
- SAN, L.L., AYE, K.S., OO, N.A.T., SHWE, M.M., FUKUSHIMA, Y., GORDON, S.V., SUZUKI, Y. y NAKAJIMA, C., 2018. Insight into multidrug-resistant Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis isolates in Myanmar. *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 76, pp. 109-119. ISSN 1201-9712. DOI 10.1016/j.ijid.2018.06.009.
- SIMPSON, E.H., 1949. Measurement of Diversity. *Nature*, vol. 163, no. 4148, pp. 688-688. ISSN 1476-4687. DOI 10.1038/163688a0.
- SINHA, P., GUPTA, A., PRAKASH, P., ANUPURBA, S., TRIPATHI, R. y 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* [en línea], vol. 16. ISSN 1471-2334. DOI 10.1186/s12879-016-1450-1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4788904/>.
- SLAYDEN, R.A. y BARRY, C.E., 2000. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. *Microbes and Infection*, vol. 2, no. 6, pp. 659-669. ISSN 1286-4579.
- SOLA, C., FILLIOL, I., LEGRAND, E., LESJEAN, S., LOCHT, C., SUPPLY, P. y RASTOGI, N., 2003. Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular*

Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, vol. 3, no. 2, pp. 125-133. ISSN 1567-1348. DOI 10.1016/s1567-1348(03)00011-x.

- SOMASUNDARAM, S., RAM, A. y SANKARANARAYANAN, L., 2014. Isoniazid and Rifampicin as Therapeutic Regimen in the Current Era: A Review. *Journal of Tuberculosis Research* [en línea], vol. 2014. [Consulta: 2 marzo 2018]. ISSN 2329-8448. DOI 10.4236/jtr.2014.21005. Disponible en: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=44054>.
- SONG, K.-S., NIMSE, S.B., KIM, H.J., YANG, J. y KIM, T., 2016. Accurate Detection of Rifampicin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains. *Sensors (Basel, Switzerland)* [en línea], vol. 16, no. 3. ISSN 1424-8220. DOI 10.3390/s16030376. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813951/>.
- SPIES, F.S., VON GROLL, A., RIBEIRO, A.W., RAMOS, D.F., RIBEIRO, M.O., DALLA COSTA, E.R., MARTIN, A., PALOMINO, J.C., ROSSETTI, M.L., ZAHA, A. y DA SILVA, P.E.A., 2013. Biological cost in Mycobacterium tuberculosis with mutations in the rpsL, rrs, rpoB, and katG genes. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, vol. 93, no. 2, pp. 150-154. ISSN 1873-281X. DOI 10.1016/j.tube.2012.11.004.
- SREEVATSAN, S., PAN, X., STOCKBAUER, K.E., CONNELL, N.D., KREISWIRTH, B.N., WHITTAM, T.S. y MUSSER, J.M., 1997. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 18, pp. 9869-9874. ISSN 0027-8424.
- SREEVATSAN, S., PAN, X., ZHANG, Y., DERETIC, V. y MUSSER, J.M., 1997. Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and -susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 3, pp. 600-606. ISSN 0066-4804.
- STAGG, H.R., LIPMAN, M.C., MCHUGH, T.D. y JENKINS, H.E., 2017. Isoniazid-resistant tuberculosis: a cause for concern? *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 21, no. 2, pp. 129-139. ISSN 1815-7920. DOI 10.5588/ijtld.16.0716.
- SYKES, J., CHENG, L., XU, W., TSAO, M.-S., LIU, G. y PINTILIE, M., 2011. Addition of multiple rare SNPs to known common variants improves the association between disease and gene in the Genetic Analysis Workshop 17 data. *BMC Proceedings*, vol. 5, no. Suppl 9, pp. S97. ISSN 1753-6561. DOI 10.1186/1753-6561-5-S9-S97.
- TELENTI, A., HONORÉ, N., BERNASCONI, C., MARCH, J., ORTEGA, A., HEYM, B., TAKIFF, H.E. y COLE, S.T., 1997. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, no. 3, pp. 719-723. ISSN 0095-1137.
- TELENTI, A., IMBODEN, P., MARCHESI, F., LOWRIE, D., COLE, S., COLSTON, M.J., MATTER, L., SCHOPFER, K. y BODMER, T., 1993. Detection of rifampicin-

resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet (London, England)*, vol. 341, no. 8846, pp. 647-650. ISSN 0140-6736.

- TORREA, G., NG, K.C.S., VAN DEUN, A., ANDRÉ, E., KAISERGRUBER, J., SSENGOOBA, W., DESMARETZ, C., GABRIELS, S., DRIESEN, M., DIELS, M., ASNONG, S., FISSETTE, K., GUMUSBOGA, M., RIGOUTS, L., AFFOLABI, D., JOLOBA, M. y DE JONG, B.C., 2019. Variable ability of rapid tests to detect *Mycobacterium tuberculosis* *rpoB* mutations conferring phenotypically occult rifampicin resistance. *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1-9. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-019-48401-z.
- UNISSA, A.N., DOSS C, G.P., KUMAR, T., SWATHI, S., LAKSHMI, A.R. y HANNA, L.E., 2017. Analysis of interactions of clinical mutants of catalase-peroxidase (KatG) responsible for isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* with derivatives of isoniazid. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 11, pp. 57-67. ISSN 2213-7173. DOI 10.1016/j.jgar.2017.06.014.
- VAN DEUN, A., AUNG, K.J.M., BOLA, V., LEBEKE, R., HOSSAIN, M.A., DE RIJK, W.B., RIGOUTS, L., GUMUSBOGA, A., TORREA, G. y DE JONG, B.C., 2013. Rifampin Drug Resistance Tests for Tuberculosis: Challenging the Gold Standard. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 8, pp. 2633-2640. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.00553-13.
- VÁSQUEZ C, L., ASENCIOS S, L., QUISPE T, N., DÍAZ V, S., CARRILLO P., C., PORTOCARRERO C, J., SUÁREZ A, P., CANALES, R., ALARCÓN, E., YI CHU, A., AGAPITO P, J., SABOGAL T, I. y TORRES T, A., 1997. Vigilancia de la resistencia a los medicamentos antituberculosos en el Perú, 1995-96. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 14, no. 1, pp. 5-14. ISSN 1726-4634.
- VIGO, A., SOLARI, L., SANTOS, D. y PUYÉN, Z.M., 2019. Mutaciones que confieren resistencia a fármacos antituberculosis de primera línea en Perú: una revisión sistemática de la literatura. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 36, no. 4, pp. 636-45. ISSN 1726-4642. DOI 10.17843/rpmesp.2019.364.4722.
- VILLEMIN, J.-A., 1865. *Cause et nature de la tuberculose*. 1865. S.l.: l'Académie de Médecine.
- 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-BÉGUEC, C., GAUDIN, C., PARKHILL, J., DIEL, R., SUPPLY, P., CROOK, D.W., SMITH, E.G., WALKER, A.S., ISMAIL, N., NIEMANN, S., PETO, T.E.A. y 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*, vol. 15, no. 10, pp. 1193-1202. ISSN 1474-4457. DOI 10.1016/S1473-3099(15)00062-6.
- WENGENACK, N.L., UHL, J.R., ST AMAND, A.L., TOMLINSON, A.J., BENSON, L.M., NAYLOR, S., KLINE, B.C., COCKERILL, F.R. y RUSNAK, F., 1997. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG(S315T) is a competent catalase-peroxidase with

reduced activity toward isoniazid. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 176, no. 3, pp. 722-727. ISSN 0022-1899.

WHO, 2005. *Addressing poverty in TB control - Options for National TB programmes*. 2005. S.I.: WHO/HTM/TB/2005.352.

WHO, 2013. *Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children: Policy Update* [en línea]. Geneva: World Health Organization. [Consulta: 4 abril 2020]. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. ISBN 978-92-4-150633-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK258608/>. NBK258608

WHO, 2018. *Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB* [en línea]. 2018. S.I.: s.n. [Consulta: 28 mayo 2019]. Disponible en: https://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_report_concentrations_TB_drug_susceptibility/en/.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008. *Global Tuberculosis Control 2008: surveillance, planning, financing* [en línea]. 2008. S.I.: Geneva: World Health Organization. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43831/1/9789241563543_eng.pdf?ua=1&ua=1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017. *Global tuberculosis report 2017*. 2017. S.I.: Geneva: World Health Organization.

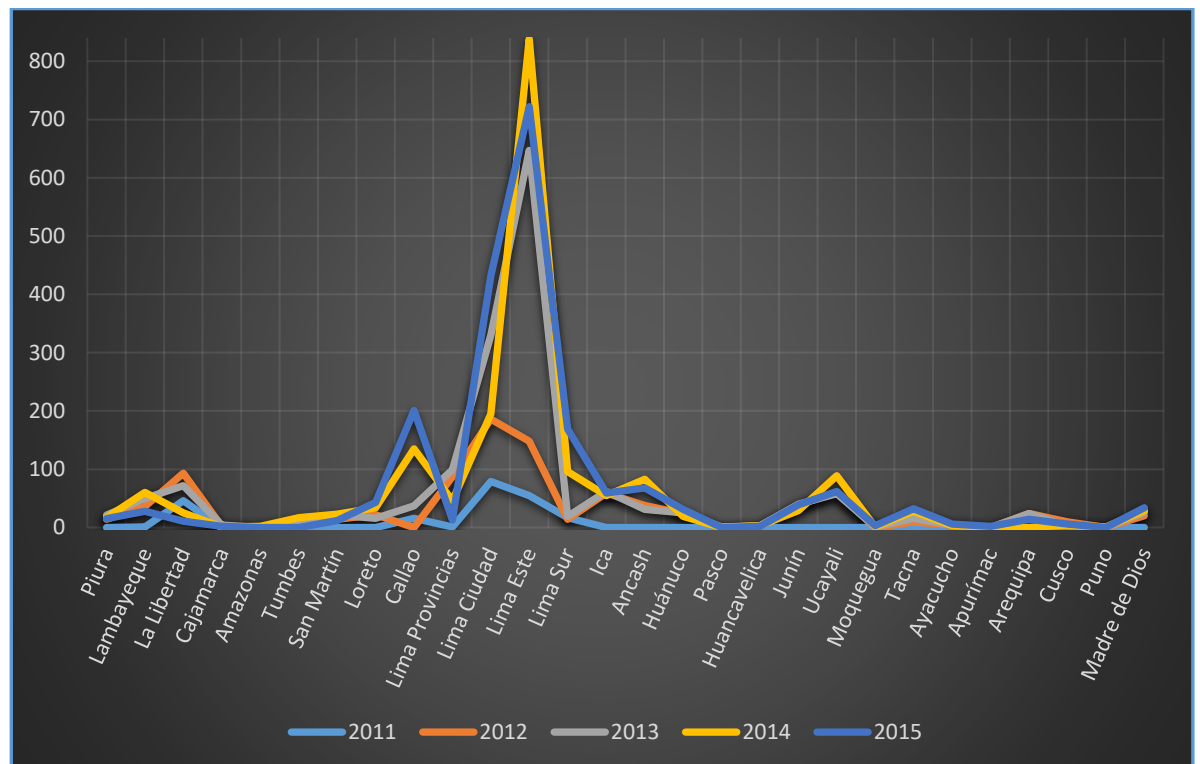
WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. *Global Tuberculosis Report 2018*. 2018. S.I.: Geneva: World Health Organization.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019. *Global Tuberculosis Report 2019*. 2019. S.I.: Geneva: World Health Organization.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1: distribución de casos por departamentos, periodo 2011-2015.

Distribución de las frecuencias absolutas de todos los casos estudiados en función al lugar de procedencia de la muestra, para cada uno de los años analizados.



9.2 Anexo 2: prevalencias de mutaciones de detección directa.

Distribución de porcentajes de todas las mutaciones detectadas mediante bandas MUT en los tres genes analizados, a través de los 5 años de estudio. A) porcentajes de las mutaciones del gen *rpoB*: D516V (MUT1), H526Y (MUT2A), H526D (MUT2B) y S350L (MUT3). B) porcentajes de las mutaciones del gen *katG*: S315T1 (MUT1) y S315T2 (MUT2). C) porcentajes de las mutaciones en la región promotora del gen *inhA*: c-15t (MUT1), a-16g (MUT2), t-8c (MUT3A) y t-8a (MUT3B).



9.3 Anexo 3: diversidad alélica de los 21 marcadores genéticos.

Evaluación de la diversidad alélica en cada uno de los loci analizados para las poblaciones ‘sin corrección clonal’ (izquierda) y ‘con corrección clonal’ (derecha). 1-D: índice de Simpson, Hexp: Heterocigosidad esperada (diversidad genética de N_e), E.5: equitatividad alélica (*evenness*).

POBLACIÓN SIN CORRECCIÓN CLONAL					POBLACIÓN CON CORRECCIÓN CLONAL				
locus	alelos	1-D	Hexp	E.5	locus	alelos	1-D	Hexp	E.5
<i>rpoB</i> WT1	2	0.0024	0.0024	0.2584	<i>rpoB</i> WT1	2	0.0270	0.0270	0.3699
<i>rpoB</i> WT2	2	0.0491	0.0491	0.4139	<i>rpoB</i> WT2	2	0.1704	0.1706	0.5613
<i>rpoB</i> WT3	2	0.2915	0.2915	0.6912	<i>rpoB</i> WT3	2	0.3659	0.3665	0.7827
<i>rpoB</i> WT4	2	0.2513	0.2513	0.6466	<i>rpoB</i> WT4	2	0.2834	0.2839	0.6821
<i>rpoB</i> WT5	2	0.0033	0.0033	0.2693	<i>rpoB</i> WT5	2	0.0369	0.0370	0.3916
<i>rpoB</i> WT6	2	0.0045	0.0045	0.2807	<i>rpoB</i> WT6	2	0.0500	0.0501	0.4153
<i>rpoB</i> WT7	2	0.1079	0.1079	0.4933	<i>rpoB</i> WT7	2	0.3321	0.3327	0.7394
<i>rpoB</i> WT8	2	0.4863	0.4864	0.9733	<i>rpoB</i> WT8	2	0.4337	0.4345	0.8815
<i>rpoB</i> MUT1	2	0.2170	0.2170	0.6101	<i>rpoB</i> MUT1	2	0.1592	0.1594	0.5496
<i>rpoB</i> MUT2A	2	0.0240	0.0240	0.3624	<i>rpoB</i> MUT2A	2	0.0911	0.0913	0.4733
<i>rpoB</i> MUT2B	2	0.0258	0.0258	0.3669	<i>rpoB</i> MUT2B	2	0.0849	0.0851	0.4655
<i>rpoB</i> MUT3	2	0.4657	0.4657	0.9353	<i>rpoB</i> MUT3	2	0.3011	0.3016	0.7023
<i>inhA</i> WT1	2	0.4544	0.4544	0.9157	<i>inhA</i> WT1	2	0.4532	0.4540	0.9137
<i>inhA</i> WT2	2	0.0290	0.0290	0.3747	<i>inhA</i> WT2	2	0.1648	0.1651	0.5555
<i>inhA</i> MUT1	2	0.3960	0.3961	0.8243	<i>inhA</i> MUT1	2	0.3780	0.3786	0.7990
<i>inhA</i> MUT2	2	0.0003	0.0003	0.2041	<i>inhA</i> MUT2	2	0.0034	0.0034	0.2701
<i>inhA</i> MTU3A	2	0.0106	0.0106	0.3172	<i>inhA</i> MTU3A	2	0.0564	0.0565	0.4257
<i>inhA</i> MUT3B	2	0.0009	0.0009	0.2297	<i>inhA</i> MUT3B	2	0.0102	0.0102	0.3155
<i>katG</i> WT	2	0.4853	0.4853	0.9713	<i>katG</i> WT	2	0.4998	0.5006	0.9995
<i>katG</i> MUT1	2	0.4880	0.4880	0.9764	<i>katG</i> MUT1	2	0.4899	0.4908	0.9802
<i>katG</i> MUT2	2	0.0055	0.0055	0.2879	<i>katG</i> MUT2	2	0.0402	0.0403	0.3980
mean	2	0.1809	0.1809	0.5430	mean	2	0.2110	0.2114	0.6034

9.4 Anexo 4: valores de índice de Asociación pareado para los 21 marcadores.

	la	rbarD		la	rbarD		la	rbarD
rpoB WT1:rpoB WT2	0.1100	0.1500	rpoB WT3:rpoB WT5	-0.0330	-0.0490	rpoB WT5:rpoB MUT3	-0.0340	-0.0480
rpoB WT1:rpoB WT3	0.0008	0.0014	rpoB WT3:rpoB WT6	-0.0076	-0.0100	rpoB WT5:inhA WT1	-0.0260	-0.0390
rpoB WT1:rpoB WT4	-0.0260	-0.0410	rpoB WT3:rpoB WT7	-0.0810	-0.0810	rpoB WT5:inhA WT2	-0.0310	-0.0380
rpoB WT1:rpoB WT5	0.0880	0.0890	rpoB WT3:rpoB WT8	-0.0370	-0.0370	rpoB WT5:inhA MUT1	-0.0330	-0.0490
rpoB WT1:rpoB WT6	0.2400	0.2500	rpoB WT3:rpoB MUT1	0.3900	0.4100	rpoB WT5:inhA MUT2	-0.0032	-0.0056
rpoB WT1:rpoB WT7	-0.0110	-0.0170	rpoB WT3:rpoB MUT2A	-0.0660	-0.0750	rpoB WT5:inhA MTU3A	-0.0220	-0.0230
rpoB WT1:rpoB WT8	0.0039	0.0067	rpoB WT3:rpoB MUT2B	-0.0430	-0.0500	rpoB WT5:inhA MUT3B	-0.0081	-0.0097
rpoB WT1:rpoB MUT1	-0.0240	-0.0320	rpoB WT3:rpoB MUT3	-0.0940	-0.0940	rpoB WT5:katG WT	-0.0004	-0.0006
rpoB WT1:rpoB MUT2A	-0.0210	-0.0250	rpoB WT3:inhA WT1	-0.0270	-0.0270	rpoB WT5:katG MUT1	0.0007	0.0011
rpoB WT1:rpoB MUT2B	-0.0210	-0.0240	rpoB WT3:inhA WT2	-0.0440	-0.0450	rpoB WT5:katG MUT2	-0.0190	-0.0190
rpoB WT1:rpoB MUT3	-0.0086	-0.0140	rpoB WT3:inhA MUT1	-0.0450	-0.0450	rpoB WT6:rpoB WT7	0.0400	0.0530
rpoB WT1:inhA WT1	0.0015	0.0026	rpoB WT3:inhA MUT2	-0.0036	-0.0150	rpoB WT6:rpoB WT8	0.0350	0.0480
rpoB WT1:inhA WT2	-0.0240	-0.0330	rpoB WT3:inhA MTU3A	-0.0014	-0.0018	rpoB WT6:rpoB MUT1	-0.0092	-0.0100
rpoB WT1:inhA MUT1	0.0120	0.0200	rpoB WT3:inhA MUT3B	-0.0100	-0.0260	rpoB WT6:rpoB MUT2A	-0.0320	-0.0340
rpoB WT1:inhA MUT2	-0.0031	-0.0048	rpoB WT3:katG WT	0.0180	0.0180	rpoB WT6:rpoB MUT2B	-0.0320	-0.0320
rpoB WT1:inhA MTU3A	-0.0180	-0.0200	rpoB WT3:katG MUT1	0.0470	0.0470	rpoB WT6:rpoB MUT3	-0.0280	-0.0360
rpoB WT1:inhA MUT3B	-0.0075	-0.0083	rpoB WT3:katG MUT2	-0.0360	-0.0510	rpoB WT6:inhA WT1	-0.0270	-0.0370
rpoB WT1:katG WT	-0.0010	-0.0016	rpoB WT4:rpoB WT5	0.0390	0.0540	rpoB WT6:inhA WT2	-0.0390	-0.0450
rpoB WT1:katG MUT1	-0.0110	-0.0190	rpoB WT4:rpoB WT6	-0.0098	-0.0120	rpoB WT6:inhA MUT1	-0.0420	-0.0560
rpoB WT1:katG MUT2	-0.0160	-0.0160	rpoB WT4:rpoB WT7	-0.0940	-0.0940	rpoB WT6:inhA MUT2	-0.0033	-0.0065
rpoB WT2:rpoB WT3	0.0990	0.1000	rpoB WT4:rpoB WT8	-0.0530	-0.0530	rpoB WT6:inhA MTU3A	-0.0260	-0.0270
rpoB WT2:rpoB WT4	-0.0260	-0.0260	rpoB WT4:rpoB MUT1	0.5600	0.5700	rpoB WT6:inhA MUT3B	-0.0086	-0.0110
rpoB WT2:rpoB WT5	-0.0310	-0.0390	rpoB WT4:rpoB MUT2A	-0.0670	-0.0730	rpoB WT6:katG WT	-0.0010	-0.0014
rpoB WT2:rpoB WT6	0.0160	0.0190	rpoB WT4:rpoB MUT2B	-0.0640	-0.0710	rpoB WT6:katG MUT1	-0.0046	-0.0062
rpoB WT2:rpoB WT7	-0.0560	-0.0570	rpoB WT4:rpoB MUT3	-0.0880	-0.0880	rpoB WT6:katG MUT2	-0.0220	-0.0220
rpoB WT2:rpoB WT8	-0.0600	-0.0620	rpoB WT4:inhA WT1	-0.0380	-0.0380	rpoB WT7:rpoB WT8	-0.0490	-0.0490
rpoB WT2:rpoB MUT1	-0.0780	-0.0780	rpoB WT4:inhA WT2	-0.0220	-0.0230	rpoB WT7:rpoB MUT1	-0.0920	-0.0950
rpoB WT2:rpoB MUT2A	-0.0580	-0.0610	rpoB WT4:inhA MUT1	-0.0390	-0.0390	rpoB WT7:rpoB MUT2A	0.3000	0.3300
rpoB WT2:rpoB MUT2B	-0.0560	-0.0590	rpoB WT4:inhA MUT2	-0.0037	-0.0150	rpoB WT7:rpoB MUT2B	0.2800	0.3200
rpoB WT2:rpoB MUT3	-0.0950	-0.0970	rpoB WT4:inhA MTU3A	0.0013	0.0017	rpoB WT7:rpoB MUT3	-0.0940	-0.0940
rpoB WT2:inhA WT1	-0.0210	-0.0220	rpoB WT4:inhA MUT3B	-0.0110	-0.0250	rpoB WT7:inhA WT1	-0.0200	-0.0200
rpoB WT2:inhA WT2	-0.0480	-0.0480	rpoB WT4:katG WT	0.0270	0.0270	rpoB WT7:inhA WT2	-0.0540	-0.0550
rpoB WT2:inhA MUT1	0.0000	0.0000	rpoB WT4:katG MUT1	0.0670	0.0670	rpoB WT7:inhA MUT1	-0.0098	-0.0098
rpoB WT2:inhA MUT2	-0.0036	-0.0120	rpoB WT4:katG MUT2	-0.0360	-0.0500	rpoB WT7:inhA MUT2	-0.0037	-0.0150
rpoB WT2:inhA MTU3A	-0.0160	-0.0180	rpoB WT5:rpoB WT6	0.6000	0.6000	rpoB WT7:inhA MTU3A	-0.0480	-0.0600
rpoB WT2:inhA MUT3B	-0.0100	-0.0210	rpoB WT5:rpoB WT7	0.0100	0.0150	rpoB WT7:inhA MUT3B	-0.0110	-0.0260
rpoB WT2:katG WT	-0.0011	-0.0011	rpoB WT5:rpoB WT8	0.0041	0.0062	rpoB WT7:katG WT	0.0016	0.0016

	la	rbarD		la	rbarD		la	rbarD
rpoB WT2:katG MUT1	-0.0056	-0.0058	rpoB WT5:rpoB MUT1	0.0012	0.0015	rpoB WT7:katG MUT1	0.0120	0.0120
rpoB WT2:katG MUT2	-0.0330	-0.0410	rpoB WT5:rpoB MUT2A	-0.0270	-0.0290	rpoB WT7:katG MUT2	-0.0078	-0.0110
rpoB WT3:rpoB WT4	0.5300	0.5300	rpoB WT5:rpoB MUT2B	-0.0260	-0.0280	rpoB WT8:rpoB MUT1	-0.0620	-0.0640
rpoB WT8:rpoB MUT2A	-0.0560	-0.0640	rpoB MUT2B:inhA MTU3A	-0.0340	-0.0340	inhA MTU3A:inhA MUT3B	-0.0088	-0.0120
rpoB WT8:rpoB MUT2B	-0.0530	-0.0630	rpoB MUT2B:inhA MUT3B	-0.0094	-0.0150	inhA MTU3A:katG WT	-0.0005	-0.0006
rpoB WT8:rpoB MUT3	0.5300	0.5300	rpoB MUT2B:katG WT	-0.0003	-0.0004	inhA MTU3A:katG MUT1	-0.0012	-0.0016
rpoB WT8:inhA WT1	0.0045	0.0045	rpoB MUT2B:katG MUT1	0.0019	0.0022	inhA MTU3A:katG MUT2	0.0440	0.0440
rpoB WT8:inhA WT2	0.0002	0.0002	rpoB MUT2B:katG MUT2	-0.0270	-0.0290	inhA MUT3B:katG WT	-0.0007	-0.0019
rpoB WT8:inhA MUT1	-0.0062	-0.0062	rpoB MUT3:inhA WT1	0.0200	0.0200	inhA MUT3B:katG MUT1	-0.0047	-0.0120
rpoB WT8:inhA MUT2	0.0068	0.00290	rpoB MUT3:inhA WT2	0.0330	0.0340	inhA MUT3B:katG MUT2	-0.0082	-0.0100
rpoB WT8:inhA MTU3A	-0.0110	-0.0150	rpoB MUT3:inhA MUT1	0.0073	0.0073	katG WT:katG MUT1	0.7700	0.7700
rpoB WT8:inhA MUT3B	-0.0092	-0.0240	rpoB MUT3:inhA MUT2	0.0160	0.0660	katG WT:katG MUT2	0.0059	0.0087
rpoB WT8:katG WT	0.0061	0.0061	rpoB MUT3:inhA MTU3A	0.0130	0.0160	katG MUT1:katG MUT2	-0.015	-0.0220
rpoB WT8:katG MUT1	-0.0010	-0.0010	rpoB MUT3:inhA MUT3B	-0.0110	-0.0260	katG WT:katG MUT2	0.0059	0.0087
rpoB WT8:katG MUT2	0.0190	0.0270	rpoB MUT3:katG WT	-0.0002	-0.0002	katG MUT1:katG MUT2	-0.015	-0.0220
rpoB MUT1:rpoB MUT2A	-0.0570	-0.0590	rpoB MUT3:katG MUT1	-0.0091	-0.0091			
rpoB MUT1:rpoB MUT2B	-0.0550	-0.0570	rpoB MUT3:katG MUT2	0.0640	0.0890			
rpoB MUT1:rpoB MUT3	-0.0830	-0.0850	inhA WT1:inhA WT2	0.0370	0.0380			
rpoB MUT1:inhA WT1	-0.0320	-0.0330	inhA WT1:inhA MUT1	0.6600	0.6600			
rpoB MUT1:inhA WT2	0.0061	0.0061	inhA WT1:inhA MUT2	-0.0029	-0.0130			
rpoB MUT1:inhA MUT1	-0.0220	-0.0230	inhA WT1:inhA MTU3A	-0.0360	-0.0470			
rpoB MUT1:inhA MUT2	-0.0036	-0.0120	inhA WT1:inhA MUT3B	-0.0083	-0.0210			
rpoB MUT1:inhA MTU3A	0.0430	0.0480	inhA WT1:katG WT	0.0710	0.0710			
rpoB MUT1:inhA MUT3B	-0.0100	-0.0200	inhA WT1:katG MUT1	0.0280	0.0280			
rpoB MUT1:katG WT	0.0250	0.0260	inhA WT1:katG MUT2	-0.0280	-0.0410			
rpoB MUT1:katG MUT1	0.0660	0.0690	inhA WT2:inhA MUT1	-0.0180	-0.0190			
rpoB MUT1:katG MUT2	-0.0330	-0.0390	inhA WT2:inhA MUT2	-0.0036	-0.0120			
rpoB MUT2A:rpoB MUT2B	-0.0440	-0.0440	inhA WT2:inhA MTU3A	0.4600	0.5100			
rpoB MUT2A:rpoB MUT3	-0.0670	-0.0740	inhA WT2:inhA MUT3B	0.1000	0.2100			
rpoB MUT2A:inhA WT1	-0.0210	-0.0240	inhA WT2:katG WT	0.0005	0.0005			
rpoB MUT2A:inhA WT2	-0.0580	-0.0600	inhA WT2:katG MUT1	-0.0120	-0.0120			
rpoB MUT2A:inhA MUT1	-0.0110	-0.0120	inhA WT2:katG MUT2	-0.0028	-0.0034			
rpoB MUT2A:inhA MUT2	-0.0034	-0.0088	inhA MUT1:inhA MUT2	-0.0036	-0.0150			
rpoB MUT2A:inhA MTU3A	-0.0350	-0.0360	inhA MUT1:inhA MTU3A	-0.0460	-0.0600			
rpoB MUT2A:inhA MUT3B	-0.0095	-0.0150	inhA MUT1:inhA MUT3B	-0.0100	-0.0260			
rpoB MUT2A:katG WT	-0.0011	-0.0012	inhA MUT1:katG WT	0.0210	0.0210			
rpoB MUT2A:katG MUT1	-0.0055	-0.0063	inhA MUT1:katG MUT1	-0.0038	-0.0038			
rpoB MUT2A:katG MUT2	0.0210	0.0220	inhA MUT1:katG MUT2	-0.0350	-0.0510			
rpoB MUT2B:rpoB MUT3	-0.0640	-0.0720	inhA MUT2:inhA MTU3A	-0.0033	-0.0070			

rpoB MUT2B:inhA WT1	-0.0230	-0.0270		inhA MUT2:inhA MUT3B	-0.0026	-0.0030			
rpoB MUT2B:inhA WT2	-0.0550	-0.0580		inhA MUT2:katG WT	-0.0003	-0.0013			
rpoB MUT2B:inhA MUT1	-0.0160	-0.0180		inhA MUT2:katG MUT1	-0.0016	-0.0071			
rpoB MUT2B:inhA MUT2	-0.0034	-0.0085		inhA MUT2:katG MUT2	-0.0032	-0.0059			

9.5 Anexo 5: estructura genética de los 134 haplotipos.

Estructura genética, en código binario, de cada haplotipo en función de la presencia y/o ausencia de las 21 zonas de hibridación (marcadores genéticos) de la tira GenoType MTBDR*plus* v2.0. 1: presencia de banda de hibridación, 0: ausencia de banda de hibridación. N: frecuencia absoluta de cada haplotipo a través de los 5 años analizados.

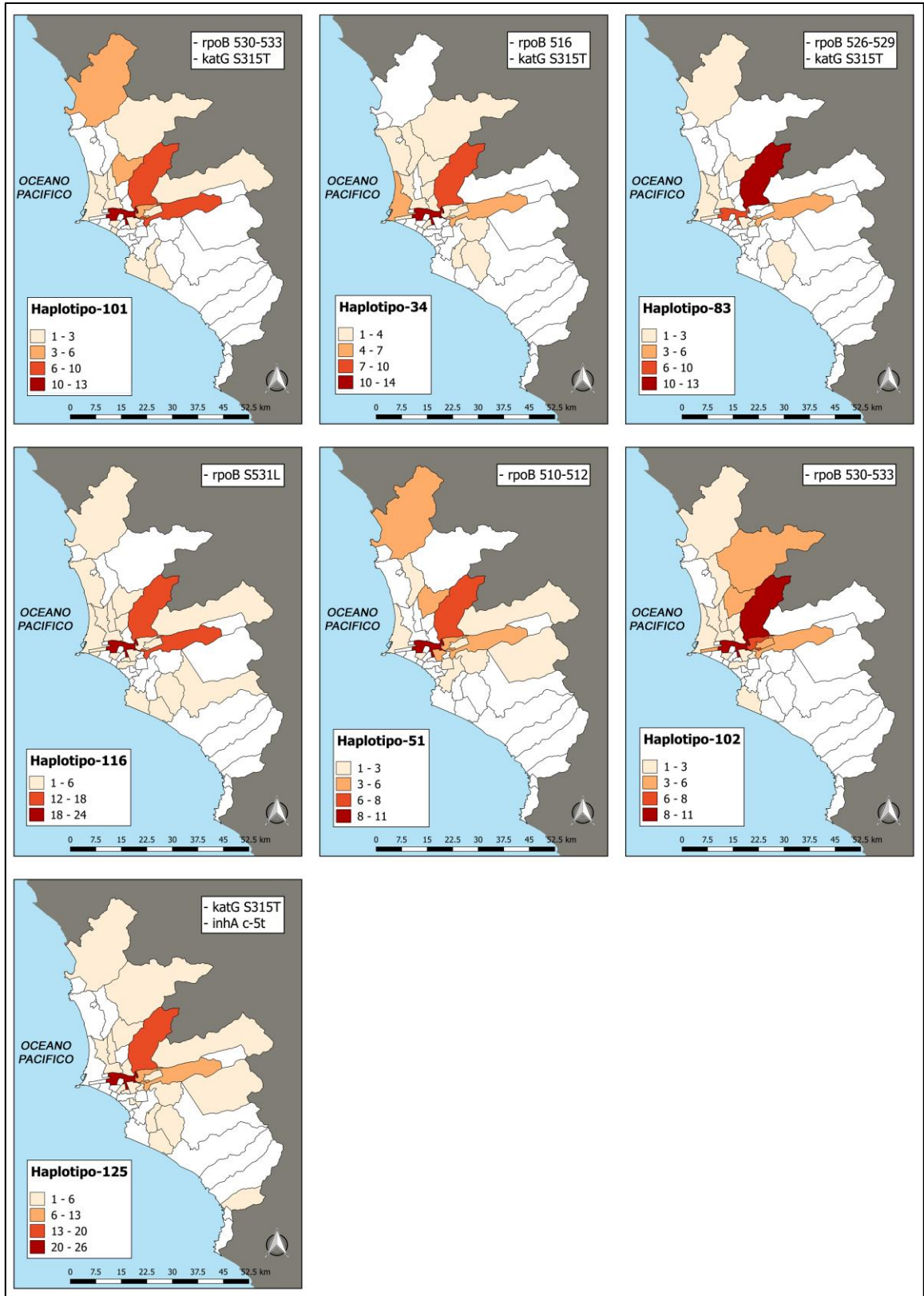
Código	<i>rpoB</i>											<i>inhA</i>					<i>katG</i>			N	Clase		
	WT1	WT2	WT3	WT4	WT5	WT6	WT7	WT8	MUT1	MUT2A	MUT2B	MUT3	WT1	WT2	MUT1	MUT2	MUT3A	MUT3B	WT			MUT1	MUT2
Hap-1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-3	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	raro
Hap-4	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-5	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-6	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	2	raro
Hap-7	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-8	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	11	raro
Hap-9	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	Huérfano
Hap-10	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-11	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	2	raro
Hap-12	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-13	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	40	raro
Hap-14	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	7	raro
Hap-15	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-16	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	Huérfano
Hap-17	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	5	raro
Hap-18	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-19	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-20	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-21	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	45	raro
Hap-22	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	9	raro
Hap-23	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	34	raro
Hap-24	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-25	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-26	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-27	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-28	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	Huérfano
Hap-29	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	Huérfano
Hap-30	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-31	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-32	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	Huérfano
Hap-33	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	9	raro
Hap-34	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	103	Menos común
Hap-35	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	12	raro

9.6 Anexo 6: distribución departamental de los haplotipos.

Distribución de las frecuencias absolutas de los 134 haplotipos en función las DISAS y DIREAS de obtención de muestras.

DISA DIRESA	Norte							Centro										Sur						TOTAL					
	Costa			Sierra	Selva			Costa					Sierra					Selva	Costa			Sierra			Selva				
	PIURA	LAMBAYEQUE	LA LIBERTAD	CAJAMARCA	AMAZONAS	TUMBES	SAN MARTÍN	LORETO	CALLAO	LIMA PROVINCIAS	LIMA CIUDAD	LIMA ESTE	LIMA SUR	ICA	ANCASH	HUANUCO	PASCO	HUANCVELICA	JUNIN	UCAYALI	MOQUEGUA	TACNA	AYACUCHO		APURIMAC	AREQUIPA	CUSCO	PUNO	MADRE DE DIOS
Hap-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Hap-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Hap-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-8	0	1	0	0	0	0	3	0	0	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
Hap-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Hap-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-13	0	0	0	0	0	0	0	1	7	9	17	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
Hap-14	0	0	1	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Hap-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-17	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Hap-18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-19	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hap-21	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0	14	13	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	45
Hap-22	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Hap-23	0	0	16	0	0	0	0	1	1	1	4	1	0	8	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34
Hap-24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

9.7 Anexo 7: distribución de haplotipos ‘menos comunes’, Lima y Callao.



10 GLOSARIO

Ácido Desoxirribonucleico (ADN): es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos, y algunos virus. Es responsable de la transmisión hereditaria. La función principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información para construir otros componentes de las células, como las proteínas y las moléculas de ARN.

Amplicón: fragmento específico de ADN, de un organismo objetivo, que se copia millones de veces mediante la PCR. La secuencia de estos fragmentos amplificados proporciona información detallada sobre las variantes nucleotídicas presentes en determinadas regiones génicas de interés.

Bioseguridad: proceso de aplicar una combinación de controles administrativos, principios de contención, prácticas y procedimientos, equipo de seguridad, preparación para emergencias e instalaciones adecuadas que permitan que el personal del laboratorio trabaje de manera segura con microorganismos potencialmente infecciosos. La bioseguridad también tiene como objetivo prevenir la exposición no intencional a patógenos o su liberación accidental.

Cepa: variante genética o subtipo de un microorganismo, usualmente propagada de forma clonal.

Concentración Crítica: la concentración crítica se define como la concentración más baja de un agente antituberculoso *in vitro* que inhibirá el crecimiento del 99% de las cepas fenotípicamente salvajes (sensibles) del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Ensayo de Sonda en Línea (ESL): prueba de susceptibilidad a fármacos, que utilizan PCR y métodos de hibridación reversa, para la detección rápida de mutaciones asociadas con resistencia a fármacos. Los ensayos de sonda de línea están diseñados para identificar el complejo *M. tuberculosis* y detectar simultáneamente mutaciones asociadas con la resistencia a los medicamentos.

Fitness biológico: también conocida como aptitud, adecuación o eficacia biológica, es la representación cuantitativa de la selección natural dentro de la biología evolutiva. Se puede definir con respecto a un genotipo o a un fenotipo en un entorno dado. En cualquier caso, describe el éxito reproductivo individual y es igual a la contribución promedio al conjunto de genes de la próxima generación que realizan los individuos del genotipo o fenotipo especificado.

Gen: es la unidad física y funcional básica de la herencia. Los genes están formados por ADN. Algunos genes actúan como instrucciones para producir moléculas llamadas proteínas. Sin embargo, muchos genes no codifican proteínas.

Gold estándar: también conocida como *test de referencia* es un término utilizado para definir aquellas pruebas de diagnóstico que tienen la máxima fiabilidad a la hora de diagnosticar una determinada enfermedad.

Hibridación reversa: unión complementaria de las moléculas diana (ácidos nucleicos de secuencia no conocida) con las moléculas de la sonda (ácidos nucleicos de secuencia

conocida) inmovilizadas en un soporte sólido, como tiras de nitrocelulosa. Esta unión depende de la complementariedad de bases y de la temperatura.

Locus: posición particular en un genoma que determina la ubicación de un gen o un marcador molecular. El plural de locus es 'Loci'.

Método de proporción: es el método más común utilizado para probar la susceptibilidad de los aislamientos del complejo *M. tuberculosis*. En este método, el inóculo utilizado se controla probando dos diluciones de una suspensión de cultivo, y el crecimiento (es decir, el número de colonias) en un medio de control sin un agente antituberculoso se compara con el crecimiento (el número de colonias) presente en un medio que contiene la concentración crítica del agente antituberculoso que se está probando; Se calcula la relación entre el número de colonias en el medio que contiene el agente antituberculoso y el número de colonias en el medio sin el agente antituberculoso, y la proporción se expresa como un porcentaje. Se utiliza una proporción crítica del 1% para diferenciar la proporción de organismos resistentes dentro de una cepa particular que se utiliza para determinar la resistencia a un medicamento en particular.

Mutación génica: alteración permanente de la secuencia de ADN que conforma un gen.

NETLab: sistema de información electrónica que, a través de la web, permite consultar los resultados de las pruebas de laboratorio realizadas por el Instituto Nacional de Salud (INS) y la Red de Laboratorios de Referencia.

Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP): son el tipo más común de variación genética. Cada SNP representa una diferencia en un solo nucleótido en el ADN. Por ejemplo, un SNP

puede reemplazar el nucleótido citosina (C) con el nucleótido timina (T) en un cierto tramo de ADN.

Pruebas moleculares: son pruebas de laboratorio utilizadas para determinar la existencia de moléculas diana (ADN, ARN y proteínas) en muestras biológicas. Sirven para el diagnóstico de distintas enfermedades y caracterización de alteraciones génicas que conducen a la resistencia frente a determinados medicamentos.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): es una técnica molecular utilizada para la amplificación exponencial de un segmento específico de ADN mediante múltiples ciclos de síntesis de ADN a partir de oligonucleótidos cebadores cortos.

Resistencia antimicrobiana: capacidad que tienen los microorganismos (bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los compuestos antimicrobianos (antibióticos, antivíricos y antipalúdicos) actúen en contra de ellos. Debido a esto, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otros.

Sonda: fragmento definido de ADN o ARN, marcado en forma radioactiva o química, que se utiliza para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante técnicas de hibridación.