



Monteserin, Johana

Genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* prevalentes en Argentina y su relación con mutaciones de resistencia a isoniacida



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Monteserin, J. (2016) *Genotipos de Mycobacterium tuberculosis prevalentes en Argentina y su relación con mutaciones de resistencia a isoniacida. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes* <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/205>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* prevalentes en Argentina y su relación con mutaciones de resistencia a isoniacida

Johana Monteserin

johamonteserin@gmail.com

Resumen

Argentina tiene muy diversas regiones en cuanto a geografía, composición étnica y carga de tuberculosis (TB). El Área Metropolitana de Buenos Aires, ubicada en la región pampeana, presenta tasas moderadas de TB y atrae inmigrantes del resto del país y extranjeros. Jujuy, una provincia andina, está poblada mayormente por nativos americanos y su tasa de TB está entre las más altas del país. Este trabajo tuvo tres objetivos: (i) comparar la estructura de población de *Mycobacterium tuberculosis* en esas dos áreas del país en el contexto de los países de la región; (ii) analizar la frecuencia de genotipos resistentes epidémicos en las subpoblaciones de *M. tuberculosis* de Argentina con distintos perfiles de sensibilidad a drogas; (iii) en el grupo resistente a drogas, determinar la relación entre genotipo, mutación responsable de resistencia a isoniacida (INH) y *clustering*. Fueron analizados 740 aislamientos de Argentina representativos de las dos áreas del país arriba mencionadas y se los comparó con 2897 aislamientos de otros 6 países de América del Sur. La genotipificación se realizó mediante *spoligotyping*, y en casos selectos, por MIRU-VNTR24. El análisis de *clustering* se realizó mediante RFLP IS6110. La asignación de genotipos se realizó según SITVIT WEB database (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/). En 362 aislamientos resistentes a INH se determinó presencia de mutación *katG315* e *inhA* (-15) por *multiplex allele-PCR*. En Argentina predominó ampliamente el linaje 4 Euro-Americano. Las familias más frecuentemente representadas fueron LAM y T, seguidas por Haarlem, con diferencias geográficas. La estructura de población de Jujuy se asemejó más a la de Bolivia y Perú que a la de Buenos Aires y resultó mucho menos heterogénea. Los genotipos T1 Tuscany y H2, que en el resto del mundo están representados en frecuencias bajas y áreas muy restringidas, en Argentina se asocian a cepas epidémicas resistentes. En particular, el genotipo SIT2 H2 es extremadamente raro entre aislamientos pansensibles de nuestro país y su frecuencia aumenta a medida que se amplía el perfil de resistencia a drogas. Se observó que las mutaciones *katG315* e *inhA* (-15) son mutuamente excluyentes. Se demostró que las cepas que presentan mutación *katG315*, pero no las que presentan mutación *inhA* (-15) tienen tendencia a acumular ulterior resistencia ($p < 0,0001$) y alta probabilidad de estar en *cluster* ($p = 0,0035$). Las cepas resistentes a INH que no presentan ninguna de las dos mutaciones se asocian a ausencia de transmisión ($p < 0,0001$). Se concluye que: (i) la estructura de población de *M. tuberculosis* en Argentina fue concordante con la de los países de la región, con variaciones regionales (ii) En Argentina, SIT2 H2, el

genotipo de la cepa M, causante del mayor brote de TB multirresistente del país, es más proclive que otros a desarrollar resistencia y transmitirse; (iii) aun entre cepas resistentes diferentes de las mayoritarias de brote, la mutación *katG315* es la más frecuente en Argentina, se asocia a resistencia a un número creciente de drogas y a transmisión.

Directora: Dra. Viviana Ritacco

Co-directora: Dra. Lucrecia Delfederico

Contenido

Abreviaturas	4
INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
Historia de la tuberculosis.....	5

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
La situación de la TB en el mundo.....	11
TB en Argentina.....	12
El problema de la TB multirresistente (TB MDR) en el mundo	13
Brotos epidémicos de TB MDR/XDR en el mundo	14
Transmisión epidémica de TB MDR en Argentina.....	15
Genotipificación	16
Mecanismos de resistencia a INH	18
Detección fenotípica y genotípica de resistencia a INH.....	19
Antecedentes del tema	20
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS GENERALES	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Diseño del estudio.....	25
Muestras	26
Extracción del ADN.....	29
Genotipificación	29
<i>Spoligotyping</i>	29
RFLP IS6110	30
MIRU-VNTR 24.....	31
Análisis computarizado de genotipos	31
Detección de las mutaciones que confieren resistencia a INH	32
Análisis estadístico	33
RESULTADOS.....	34
Estructura de población de <i>M. tuberculosis</i> en Argentina.....	34
Área Metropolitana de Buenos Aires.....	44
Jujuy.....	45
Argentina en el contexto de la región.....	46
Frecuencia de clados de brote MDR según perfil de resistencia	46
Resistencia a INH y mutaciones <i>katG315</i> e <i>inhA</i> (-15).....	48
Relación de mutaciones <i>katG315</i> e <i>inhA</i> (-15) con perfil de resistencia	49

Relación de mutación de resistencia a INH con genotipo.....	49
Relación de mutación de resistencia a INH con <i>clustering</i>	50
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS	59
MATERIAL SUPLEMENTARIO	69

Abreviaturas

AC: Antes de Cristo
ADN: ácido desoxirribonucleico
BCG: Bacilo Calmette-Guérin
bp: pares de bases
CIM: concentración inhibitoria mínima
CMTB: complejo *M. tuberculosis*
CRISPRs: (*polymorphisms in the clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)
DC: después de Cristo
DR: (*direct repeat*) repeticiones directas
EMB: etambutol
H: Haarlem
INH: isoniácida
IS: (*insertion sequence*) secuencia de inserción
LAM: (*Latin American & Mediterranean*), Latinoamérica y Mediterráneo
LSPs: (*large sequence polymorphisms*) polimorfismos de secuencia larga
MIRUs: (*mycobacterial interspersed repetitive units*) unidades micobacterianas repetidas intercaladas
MUT: (*mutated*) mutado
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCR: (*polymerase chain reaction*) reacción en cadena de la polimerasa
PGRSs: (*polymorphic GC-rich repetitive sequences*), secuencias polimórficas repetitivas ricas en GC
PPD: Derivado proteico purificado
PZA: pirazinamida
RFLP: (*restriction fragment length polymorphism*), polimorfismos del largo de los fragmentos de restricción
RIF: rifampicina
S: familia S
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SM: estreptomina
SNPs: (*single nucleotide polymorphisms*) polimorfismos de un solo nucleótido
T: familia T
TB: tuberculosis
TB MDR: tuberculosis multirresistente (resistente al menos a isoniácida y rifampicina)
TB XDR: tuberculosis extremadamente resistente (tuberculosis multirresistente con resistencia adicional a una quinolona y una droga inyectable de segunda línea)
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
VNTR: (*variable number tandem repeat*) repetición en tándem de número variable
WT: (*wild type*) fenotipo silvestre
X: familia X

INTRODUCCIÓN

Historia de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es considerada una de las primeras enfermedades humanas. A través de la historia ha sido denominada de diversas maneras: consunción, tisis, mal del rey, peste blanca o plaga blanca. Es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años. Un temprano progenitor de *M. tuberculosis* fue probablemente contemporáneo de, y co-evolucionó con, los primeros homínidos en el este de África. Esta antigua enfermedad fue documentada en Egipto, India y China, hace 5000, 3300 y 2300 años, respectivamente [Cardoso-Leão & Portaels 2007].

En el año 460 AC, Hipócrates identificó la tisis como la enfermedad más diseminada de todos los tiempos. Aunque Aristóteles (384-322 AC) la consideró contagiosa, la mayoría de los autores griegos creían que la enfermedad era de naturaleza hereditaria y, en parte, la consecuencia de las debilidades mentales y morales del individuo. Galeno (131–201 DC) definió la tisis como una ulceración de los pulmones, el pecho o la garganta, acompañada por tos, fiebre y consunción.

A principios del siglo XVII, en Europa comenzó la epidemia de TB conocida como la “Gran Plaga Blanca” que continuó por siglos. La muerte por TB era considerada inevitable y, para el año 1650, la TB era la principal causa de muerte. Las altas densidades poblacionales y las pobres condiciones sanitarias que caracterizaban las crecientes ciudades de Europa y América del Norte proveían el ambiente para la propagación de este patógeno. La epidemia se esparció lentamente más allá de Europa por la exploración y la colonización. La TB ya existía en América pre-colombina, pero era esporádica entre los nativos.

En Europa, la incidencia de la TB había aumentado progresivamente durante la Edad Media y el Renacimiento, desplazando a la lepra, hasta alcanzar su máxima expansión bien entrado el siglo XVIII, y hasta finales del XIX, en el contexto de los desplazamientos masivos de campesinos hacia las ciudades en busca de trabajo. La revolución industrial agregó sus problemas: hacinamiento, pobreza, jornadas de trabajo interminables, viviendas húmedas y mal ventiladas, muy propicias para la propagación aerógena de gérmenes [Cardoso-Leão & Portaels 2007].

Al margen de los movimientos culturales y sociales, fueron los avances científicos los que marcaron la diferencia en el conocimiento de la TB. A mediados del siglo XIX, el francés Jean-Antoine Villemin demostró que la tisis podía contagiarse tras inocular material purulento de humanos a ganado y de ganado a conejos. Sobre la base de esta polémica y

revolucionaria evidencia, postuló que un microorganismo específico podía causar la enfermedad. Pocos años después, en 1882, Robert Koch aplicó un novedoso método de tinción a muestras de esputo procedentes de pacientes con tuberculosis, revelando por primera vez el agente causal de la enfermedad: *M. tuberculosis*, denominado bacilo de Koch en su honor. En 1908, el mismo Koch desarrolló la tuberculina, que posteriormente dio lugar a un derivado proteico purificado estándar del bacilo (denominado PPD) que se creía útil como agente inmunizante [Ritacco & Kantor 2015].

Los avances en el conocimiento del agente causal, el mecanismo de transmisión y los primeros estudios epidemiológicos pusieron en evidencia la menor incidencia de la TB en determinados climas. Estos conocimientos promovieron la aparición de instituciones denominadas sanatorios para tuberculosos, los cuales proveían una función dual. En primer lugar, protegían a la población general de la exposición a las personas enfermas, que eran fuente de contagio. En segundo lugar, ofrecían reposo, aire fresco y una buena nutrición a los pacientes con TB.



Figura 1. "Estación Climatérica Santa María" ubicada en el Valle de Punilla de las Sierras de Córdoba, inaugurada en 1900. Centro Sanatorial para un centenar de tuberculosos, que con el correr de los años amplió su capacidad a más de un millar de pacientes hospitalizados.

Fuente: <http://www.taringa.net/posts/imagenes/13210020/Hospital-Psiquiatrico-1920-y-HOY-Cba.html> (Acceso 15 de noviembre de 2015).



Figura 2. Vista del pabellón para indigentes mujeres, "Dr. José Penna". Años 1920-23.

Fuente:

<http://www.taringa.net/posts/imagenes/13210020/Hospital-Psiquiatrico-1920-y-HOY-Cba.html> (Acceso 15 de noviembre de 2015)

A principios del siglo XX, las autoridades de salud pública reconocieron que la TB era prevenible y no heredable, lo que alentó la creación de asociaciones para educar a la comunidad a través de campañas sanitarias orientadas al control de la propagación de la enfermedad (Figura 3).

En 1921 Albert Calmette y Camille Guérin produjeron la vacuna contra la TB empleando una variante atenuada de *Mycobacterium bovis*. Esta vacuna, denominada BCG, es aún ampliamente utilizada en vastas áreas del mundo donde la TB es prevalente para prevenir formas diseminadas en los infantes.

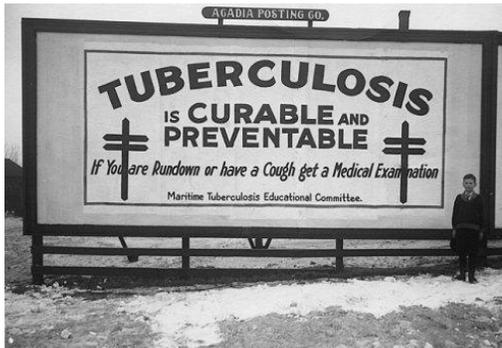


Figura 3. Campañas públicas de educación y concientización para mostrar a las poblaciones es curable y prevenible.

Fuente: <http://sct.poumon.ca/tb/tbhistory/prevention/> (Acceso 15 de noviembre de 2015)

En 1944, en plena Guerra Mundial, Albert Schatz y Selman Waksman descubrieron, a partir de un pequeño hongo, la estreptomycin (SM), sustancia capaz de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* con eficacia limitada, pero superior a los tratamientos empleados hasta ese momento. Este hito se considera el comienzo de la era moderna de la tuberculosis, aunque muy pronto aparecieron los primeros casos de TB resistente a este fármaco, lo que indujo la formulación de terapias combinadas. La verdadera revolución se produjo algunos años después, en 1952, con el desarrollo de la isoniacida (INH), el primero de los antibióticos específicos que lograrían convertir a la TB en una enfermedad curable en la mayoría de los casos. La aparición de la rifampicina (RIF) en la década de los sesenta acortó notablemente los tiempos de curación con terapia múltiple, lo que contribuyó a disminuir el número de casos

nuevos de manera importante hasta la década de los ochenta [Cardoso-Leão & Portaels 2007].



Figura 4. Medalla y estampilla conmemorativas de la Liga Argentina contra la Tuberculosis

La TB es más frecuente en hombres que mujeres y afecta principalmente a adultos en edad económicamente productiva. La enfermedad se transmite por vía aérea. Un individuo con TB activa exhala gotas microscópicas infecciosas, las cuales permanecen en la atmósfera y pueden ser inhaladas por otros individuos que se encuentren cerca. En general, sólo una pequeña proporción de personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrolla enfermedad activa, pero la probabilidad es mayor entre las personas con asociaciones morbosas, en particular aquellas co-infectadas con VIH. Sin tratamiento, la mortalidad por TB es alta. Los tratamientos actuales recomendados para los nuevos casos de TB sin riesgo de fármacorresistencia consisten en un régimen de seis meses. Los primeros dos meses con cuatro drogas de primera línea: INH, RIF, etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA); los siguientes cuatro meses con INH y RIF. Con un buen cumplimiento del tratamiento se logra la cura del 86% de los casos [WHO TB Report 2015].

Mycobacterium tuberculosis

Las bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* son bacilos inmóviles y no esporulados pertenecientes al orden Actinomycetales. Contienen un alto porcentaje (61-71%) de guanina y citosina (G+C) en su genoma, una pared celular con alto contenido de lípidos y varios ácidos micólicos característicos de la envoltura de las micobacterias. Estos lípidos poco convencionales actúan como reservas de carbono y energía. También están involucrados en la estructura y funcionamiento de membranas y de orgánulos membranosos dentro de la célula. Los lípidos constituyen más de la mitad del peso seco de la célula. La composición lipídica de los bacilos puede variar durante su ciclo de vida en cultivo, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes. La envoltura celular confiere las principales características del

género: ácido alcohol resistencia, extrema hidrofobicidad, persistencia en las lesiones, resistencia a antibióticos y sus distintivas características inmunológicas. Es probable que también contribuya al lento crecimiento de algunas especies ya que habría una restricción en el ingreso de nutrientes [Barrera 2007].

La envoltura celular distingue a las especies de este género de otros procariontes. Está compuesta por **cápsula**, **pared celular** y **membrana plasmática**. En *M. tuberculosis* la superficie expuesta al medio exterior es la **cápsula**, esencialmente compuesta de polisacáridos, proteínas y una menor cantidad de lípidos. Tres tipos de polisacáridos se encuentran en la cápsula: α -D-glucano, D-arabino-D-mananos y D-mananos. El α -D-glucano, es el principal carbohidrato de la cápsula. Varias funciones biológicas, relacionadas con la inmunopatogenia, han sido atribuidas a los polisacáridos de la cápsula [Kaur 2009] (Figura 5).

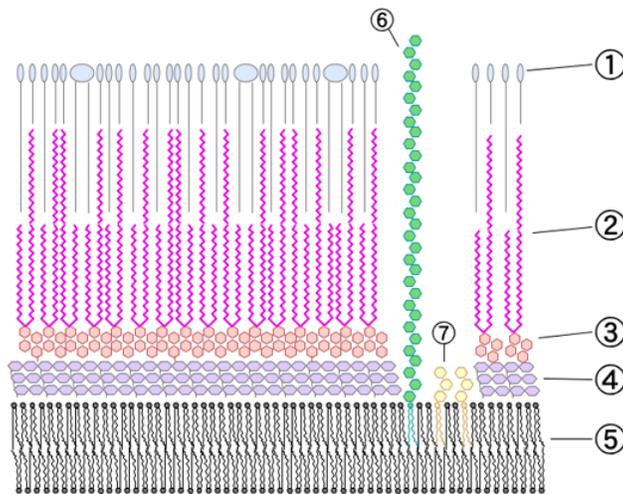


Figura 5. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*. 1-lípidos externos, 2-ácidos micólicos, 3-polisacáridos (arabinogalactano), 4-peptidoglicano, 5-membrana plasmática, 6-lipoarabinomananos, 7-fosfatidil inositol manósido.

Fuente: en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium. (Acceso 12 de noviembre de 2015).

Al igual que en la mayoría de las bacterias, la **pared celular** protege los contenidos celulares, provee soporte mecánico y es responsable de la forma. Sin embargo, la pared celular de micobacterias es única entre los procariontes. Está constituida por una capa interna de péptidoglicano, responsable de la forma y la integridad estructural de la bacteria. La estructura de este estrato es diferente de la de las demás bacterias, presenta residuos químicos inusuales y un alto número de enlaces cruzados. El grado de reticulación del péptidoglicano en la pared celular de *M. tuberculosis* es del 70-80%, mientras que en *Escherichia coli* solo es de 20-30%.

Otros polisacáridos compuestos de arabinosa y galactosa se encuentran unidos covalentemente al péptidoglicano. Son los arabinogalactanos, cuyos extremos exteriores

están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, llamados ácidos micólicos, los cuales pueden comprender 60–90 átomos de carbono. Los ácidos micólicos son importantes para la supervivencia de las micobacterias, son capaces de impedir tanto la entrada de drogas hidrofóbicas como la deshidratación, y también permiten un crecimiento más efectivo de las micobacterias dentro del macrófago. Otros grupos importantes que forman parte de la pared celular son la trehalosa y el lipoarabinomanano. Este último componente, se encuentra unido a la membrana plasmática, atraviesa toda la pared celular y está constituido por una mezcla heterogénea de manosa y arabinosa unidas a lipopolisacáridos de alto peso molecular. Este componente es específico de cada especie y está involucrado en la unión de la bacteria al macrófago y también se le atribuye una acción parácrina atrayendo leucocitos durante la formación del granuloma.

La **pared celular** también contiene proteínas intercaladas. Algunas de ellas en proceso de exportación y otras residentes. Muchas de estas proteínas son responsables de la construcción de la pared celular durante el ciclo de vida del bacilo. También se encuentran algunas proteínas llamadas porinas, la cuales forman canales hidrofílicos permitiendo el pasaje pasivo de pequeñas moléculas de solutos a través de la capa de ácidos micólicos [Berg 2007, de Souza 2008, Fenton & Vermeulen 1996, Kaur 2009, Morandi 2013].

La **membrana citoplasmática** de las micobacterias no parece ser peculiar, excepto por la presencia de lipopolisacáridos. Estructura celular vital, provee protección osmótica, regula el tráfico de solutos entre el citoplasma y el medio ambiente. Contiene proteínas con diferentes funciones: proteínas censoras de la concentración de determinadas moléculas en el medio ambiente, proteínas transductoras de señales, enzimas involucradas en procesos metabólicos y generación de energía, transportadores selectivos de nutrientes e iones [Barrera 2007].

Aun con muchas características en común, las especies del género *Mycobacterium* muestran diversidad en otros aspectos. La mayoría vive y replica libremente en los ecosistemas y rara vez o nunca causa enfermedad. Solo unas pocas micobacterias pueden volverse patógenos exitosos en vertebrados superiores. En contraste, algunas especies de micobacterias no crecen en vida libre en la naturaleza, son hospedador dependientes como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, y los miembros del complejo *M. tuberculosis*. *Mycobacterium leprae* representa el caso extremo, pues aún no se ha logrado su desarrollo *in vitro*. El complejo *M. tuberculosis* incluye siete especies estrechamente relacionadas: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium canettii* y *Mycobacterium mungi*.

M. tuberculosis es considerado genéticamente monomórfico, porque tiene bajos niveles de diversidad genética y homoplasia (eventos de mutaciones independientes que resultan en

el mismo genotipo entre aislamientos con diferentes ancestros) y muy raros eventos de recombinación homóloga. Sin embargo, en comparación con otras bacterias monomórficas, presenta sustancial variación en su ADN. Los polimorfismos identificados como *large sequence polymorphisms* (LSPs) y *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) son filogenéticamente informativos y útiles para los estudios de población y epidemiológicos.

Además, el cromosoma posee otras regiones repetitivas que son fuentes de variabilidad: la secuencia de inserción IS6110, las secuencias polimórficas repetitivas ricas en GC (*polymorphic GC-rich repetitive sequences*, PGRSs), así como también polimorfismos en las repeticiones cortas palindrómicas agrupadas regularmente espaciadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPRs) y repeticiones en tándem de número variable (*variable number tandem repeats*, VNTR). Todos ellos han sido aplicados a estudios de epidemiología molecular [Achtman 2008, Kato-Maeda 2011a].

La situación de la TB en el mundo

La carga mundial de TB sigue siendo enorme. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2014 se produjeron 9,6 millones de casos nuevos y 1,5 millones de personas murieron por esta enfermedad (1,1 millón de muertes ocurrieron en personas VIH negativos y 0,4 millones entre personas portadoras del virus).

La mayoría de los casos nuevos estimados en 2014 ocurrieron en el sudeste asiático y en la región occidental del Pacífico (58%), mientras que en el continente africano se concentra el 28% de los casos. Menores proporciones en la región del este mediterráneo (8%), en la región europea (3%) y en la región de las Américas (3%). India, Indonesia y China suman el 43% de los casos a nivel mundial. Las tasas más bajas se encuentran predominantemente en los países con mayores ingresos, como los de Europa occidental, Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda. En estos países las tasas de incidencia son menores a 10 casos por 100 000 habitantes [WHO TB Report 2015]. Figura 6.

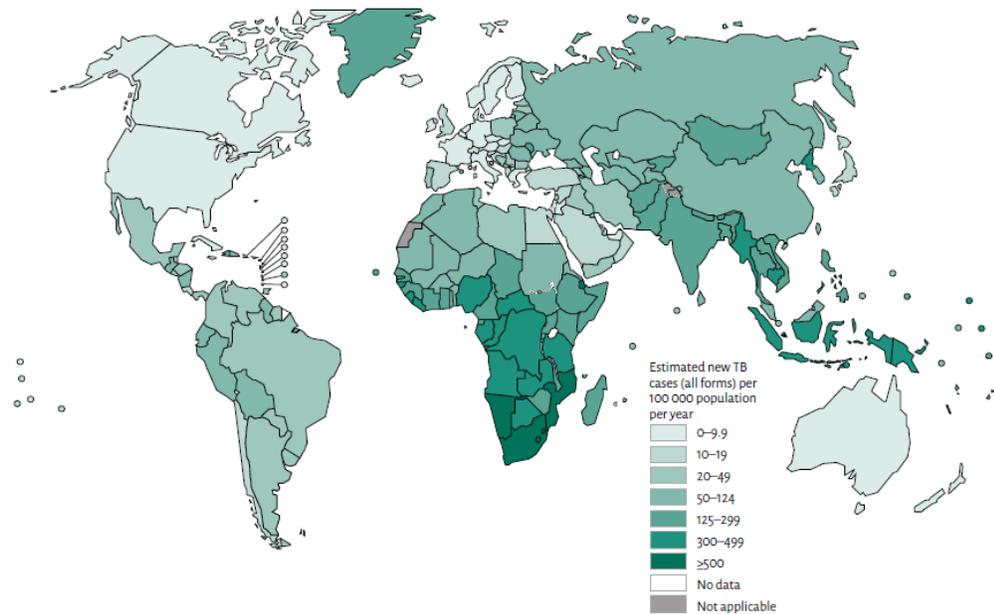


Figura 6. Tasas estimadas de incidencia de TB a nivel mundial en 2014. [WHO Global tuberculosis report 2015].

TB en Argentina

En 2014, en Argentina se notificaron 10525 casos de TB. La tasa de notificación para ese año fue 22,5 casos por cada 100 000 habitantes. Las cifras son coherentes con la leve y sostenida tendencia al descenso de la TB registrada en las últimas décadas.

La distribución de los casos de TB en las provincias es muy desigual. En 2014, la tasa de notificación más alta correspondió a la provincia de Salta con 46,6 casos cada 100 000 habitantes. El valor más bajo se observó en la provincia de San Luis, con 5,7 casos cada 100 000 habitantes. La tasa de la provincia de Salta fue 8,2 veces más alta que la tasa de San Luis y 2,1 veces mayor que la general del país. Además de Salta, Jujuy, Formosa, la Ciudad de Buenos Aires y Chaco completan el grupo de las 5 provincias con mayores tasas de notificación en el país. Además de San Luis, otras 7 provincias tienen tasas menores de 10 casos por 100 000 habitantes. Estas son: Catamarca, Río Negro, San Juan, La Rioja, Córdoba, Neuquén y Mendoza [Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Emilio Coni”, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), con base en los datos de los Programas de Control de las 24 Jurisdicciones del país. Ministerio de Salud de la Nación]. Figura 7.

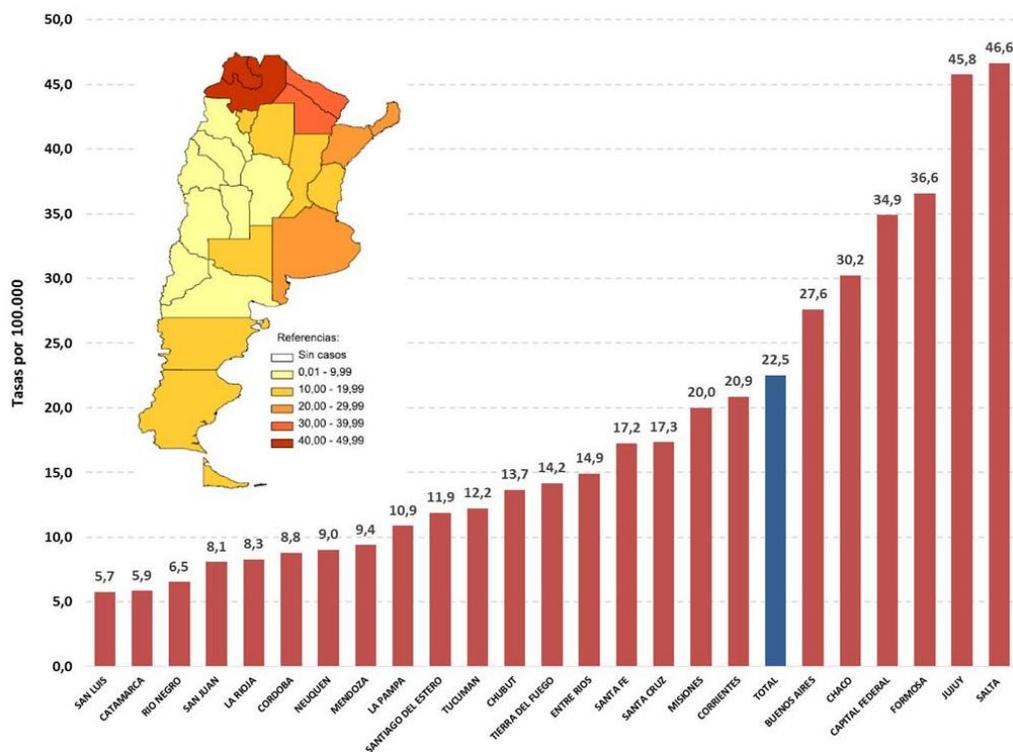


Figura 7. Notificación de casos de tuberculosis incidentes de todas las formas por jurisdicción, en Argentina 2014. Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Emilio Coni", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), con base en los datos de los Programas de Control de las 24 Jurisdicciones del país. Ministerio de Salud de la Nación.

El problema de la TB multirresistente (TB MDR) en el mundo

La historia de la TB cambió luego de la introducción de las primeras drogas anti-TB y la rápida aparición del fenómeno de la fármacorresistencia. El mayor desafío para el control y el tratamiento de la TB es la **multirresistencia de *M. tuberculosis*, definida como la producida por bacilos con resistencia al menos a INH y RIF**, las dos drogas más potentes de primera línea. El tratamiento de la **TB MDR** requiere el uso de drogas de segunda línea, menos eficaces, mucho más tóxicas y costosas durante períodos muy prolongados.

La mayoría de los antibióticos que pueden ser usados en el tratamiento de la TB son efectivos cuando las bacterias están en división activa. En la fase intensiva del tratamiento, los fármacos empleados actúan contra las bacterias en crecimiento, lo cual provoca la rápida conversión de un esputo positivo a negativo. La fase de continuación de tratamiento es esencial para eliminar las bacterias persistentes o de lento crecimiento. La TB debe ser tratada efectivamente con drogas de primera línea como INH, RIF, PZA, EMB y SM. Sin embargo esta primera línea de terapia en algunos casos puede fallar por varias razones: mala calidad de las drogas, pobre adherencia al tratamiento, tratamiento incompleto, intermitente o

inadecuado, mala absorción de una o varias de las drogas administradas, o contagio de formas resistentes. Todas estas condiciones contribuyen a la emergencia de bacterias resistentes a drogas en el hospital y la comunidad. Por lo tanto, la detección precoz, el tratamiento correcto de la TB, y el seguimiento hasta la negativización bacteriológica son parte importante de las estrategias para prevenir la emergencia de TB MDR. Existen, además, cepas de *M. tuberculosis* con **resistencia extendida (TB XDR)**, definidas como aquellas cepas de TB MDR que además presentan resistencia a alguna fluoroquinolona y al menos a una de las drogas inyectables de segunda línea: kanamicina, amikacina y capreomicina [Senol, 2013].

A nivel mundial, se estima que 3,3% de los casos nuevos y 20,2% de los casos con tratamiento previo tienen TB MDR. En 2014, 190 mil muertes ocurrieron por TB MDR. Los mayores niveles de TB asociada a fármacorresistencia se encuentran en el este de Europa y Asia central. Para el año 2014 se estimó que ocurrieron 300 mil casos nuevos de TB MDR en el mundo, más de la mitad de los casos fueron diagnosticados en India, China y la Federación Rusa. [WHO TB Report 2015] (Figura 8).

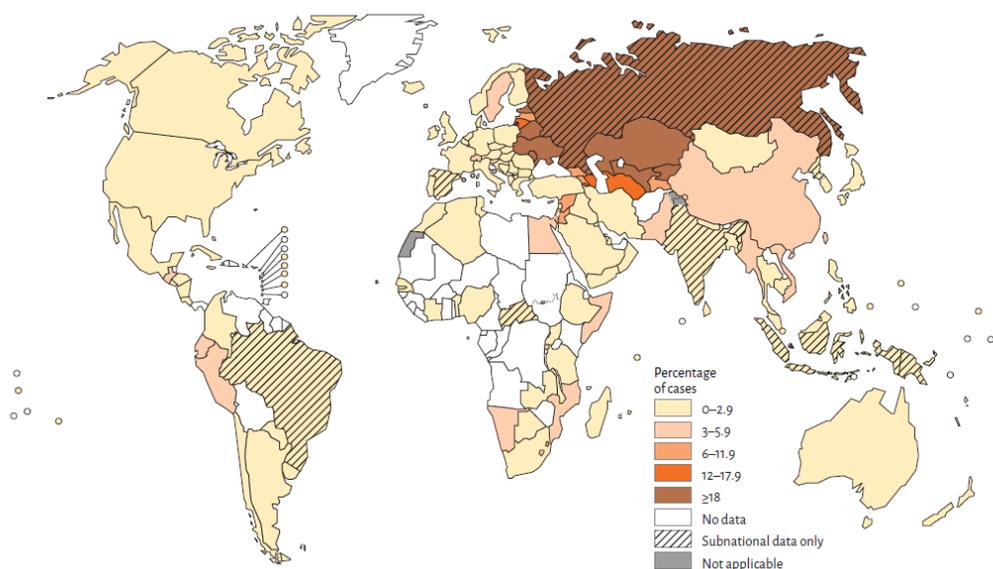


Figura 8. Porcentajes de casos nuevos de TB MDR en 2014. La figura está basada en los años más recientes de los que se dispone información, la cual varía entre los países. TB XDR ha sido reportada por 92 países. Un porcentaje estimado: 9,7% (95% CI: 7,4%-12%) de los casos MDR son TB XDR. [WHO Global tuberculosis report 2015].

Brotos epidémicos de TB MDR/XDR en el mundo

Durante los años 90, la TB MDR surgió como un importante problema global potenciado por la pandemia de VIH/sida. Un notable ejemplo fue el **brote** producido por la cepa W, un clon MDR perteneciente a la familia Beijing de *M. tuberculosis*. Esta cepa se propagó en forma explosiva, causó enfermedad en más de 350 pacientes en Nueva York, y sumó más del 25% de todos los casos TB MDR en los Estados Unidos a principio de esa década. Esta cepa se asoció a infección VIH, rápida progresión de infección a enfermedad, y altas tasas de mortalidad en prisiones y hospitales neoyorkinos [Bifani 1999].

En la misma década, en España se describió un brote de características similares que involucró más de 100 pacientes infectados con VIH en diferentes hospitales del país. Todos los pacientes murieron, a pesar del tratamiento con múltiples drogas anti-TB de primera y segunda línea [Blázquez 1997]. Los estudios de epidemiología molecular revelaron que se trató de la misma cepa de *M. bovis* aislada en Holanda de un paciente con infección VIH que murió de TB MDR. Este paciente previamente había sido hospitalizado en España, adonde ocurrió el brote original. La cepa causante del brote fue identificada con un genotipo idéntico a aquellos hallados en el hospital español [Samper 1997]. Esta cepa de *M. bovis* resultó ser extremadamente resistente, aun cuando su expansión clonal ocurrió 10 años antes de que se acuñara la definición de TB XDR [Samper & Martin 2007].

El fenómeno que dio origen al concepto de TB XDR fue documentado más recientemente en un área rural de Sudáfrica. El mismo reprodujo las características de los brotes descritos más arriba: asociación con infección VIH, diseminación hospitalaria, progresión fulminante a enfermedad, alta mortalidad, resistencia extendida y alta clonalidad [Ghandi 2006]. Se estima que aún hoy, en Sudáfrica, 10% de todos los casos de TB son TB MDR y, a la vez, 10% de los casos de TB MDR son XDR. Hay suficiente evidencia de que en ese país la mayoría de los casos de TB MDR/XDR se producen por transmisión de cepas exitosas, tal como parece suceder en otros países con alta carga de TB MDR/XDR como China y países de la ex Unión Soviética [Müller 2013].

Transmisión epidémica de TB MDR en Argentina

La República Argentina no se sustrajo a la emergencia de TB MDR asociada a sida. En los años 90, nuestro país fue identificado por la OMS como un *hotspot* de TB MDR. A mediados de esa década se documentaron brotes hospitalarios de TB MDR asociados a sida en Buenos Aires, el conurbano bonaerense, La Plata y Rosario. El brote iniciado en el Hospital F. J. Muñoz y extendido a localidades cercanas fue el de mayor magnitud. Con más de 800 casos diagnosticados entre 1992 y 2004, se puede considerar que adquirió proporciones

epidémicas. En los primeros años del nuevo milenio, en ese hospital se documentó el ascenso de la TB MDR en pacientes sin infección por VIH y sin antecedentes de tratamiento para TB [Palmero 2006]. En el Hospital F. J. Muñiz, la TB MDR/sida se mantiene en niveles bajos pero estables a través del tiempo. A partir del brote original, la cepa responsable, denominada **cepa M**, se introdujo en hospitales de los distritos aledaños, provocando transmisión secundaria. En 2002, la cepa M fue aislada de los dos primeros pacientes con TB XDR identificados en el país.

También a comienzos de los años 90, otra cepa multirresistente, denominada Ra, inició su transmisión en el Hospital Carrasco de Rosario. Estas dos cepas M y Ra aún dominan el escenario de la TB MDR en nuestro país. La emergencia de TB MDR marcó la necesidad de implementar un sistema de vigilancia de la transmisión de esta forma grave de TB. En 2003, la red nacional de laboratorios de TB inició un registro sistemático de todos los casos incidentes TB MDR/XDR diagnosticados en el país. El registro incluye una base de datos de los genotipos de todos los casos nuevos de TB MDR/XDR, además de los genotipos analizados desde las etapas iniciales del brote [Ritacco 2012b].

Genotipificación

Los métodos de tipificación molecular de *M. tuberculosis* salieron oportunamente al encuentro de la emergencia de TB MDR en el mundo. Desde principios de los años 90, la genotipificación de *M. tuberculosis* fue aplicada con éxito a investigaciones epidemiológicas, lo que dio lugar a una nueva disciplina, la epidemiología molecular. Este campo ha permitido a los programas de control de la TB identificar aislamientos específicos de TB en la comunidad. El conocimiento logrado tuvo impacto en la salud pública, ya que permitió a los programas determinar niveles de riesgo de transmisión, establecer estrategias de salud pública adecuadas y medir el éxito de las medidas tomadas [Barnes & Cave 2003, Kato-Maeda 2011b].

En principio, la genotipificación de aislamientos de *M. tuberculosis* fue empleada para diferenciar entre transmisión reciente y reactivación de la enfermedad. En los estudios de población, aislamientos que comparten el mismo genotipo son considerados en *cluster* y se asume que están epidemiológicamente relacionados, directa o indirectamente. Por el contrario, aquellos aislamientos con genotipos únicos, son considerados como reactivación de infección latente, posiblemente adquiridos fuera de la población en estudio o en otro período de tiempo. Se asume que la tasa de cambio de los marcadores usados para determinar genotipo es suficientemente rápida como para mostrar variación en una población local, pero también suficientemente lenta como para que sea poco probable que cambie en una misma persona en un corto período de tiempo.

La metodología ideal para determinar polimorfismos genéticos debe ser simple, factible, dar rápidos resultados y reproducible interlaboratorio. En los años noventa la metodología *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) fue exitosamente usada para identificar aislamientos de *M. tuberculosis* en la comunidad. Luego, otros métodos que amplifican regiones hipervariables del cromosoma mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como *spoligotyping* y MIRUs-VNTR (*Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeat*) se sumaron a las herramientas moleculares. Más recientemente, la disponibilidad de tecnologías de alto rendimiento permite la secuenciación rápida de los genomas completos, método disponible en la actualidad para el estudio de transmisión y evolución de *M. tuberculosis*.

La metodología de RFLP ha sido considerada hasta hace pocos años como el método *gold standard* para los estudios de epidemiología molecular. Esta técnica revela la variación en el número de copias de la secuencia de inserción IS6110 y en los tamaños de los fragmentos en los que se ubican las copias de esta IS cuando se somete el ADN a restricción enzimática [van Embden 1993]. La principal ventaja del RFLP IS6110 es su alto poder de discriminación en la mayoría de los aislamientos. Una de sus limitaciones es la baja discriminación en aquellos aislamientos que presentan cinco o menos copias de IS6110. También tiene limitaciones técnicas, como complejidad metodológica y la demanda de grandes cantidades de ADN de alta calidad, el que sólo se puede obtener a partir de cultivos abundantes.

MIRUs-VNTR es considerado por algunos autores como el nuevo *gold standard* para tipificar aislamientos de *M. tuberculosis*, debido a su reproducibilidad y alto poder de discriminación. La tipificación mediante VNTR se basa en la amplificación mediante PCR empleando *primers* específicos que reconocen las regiones flanqueantes de las diferentes regiones de los MIRUs. El polimorfismo consiste en el número variable de copias de cada unidad repetitiva. La metodología original incluía 12 MIRUs. Las recomendaciones actuales son usar 15 MIRUs para estudios epidemiológicos y 24 para estudios filogenéticos [Supply 2006].

El *spoligotyping* ha sido empleado como método de tipificación secundario cuando los aislamientos genotipificados por RFLP IS6110 presentan cinco bandas o menos. Se fundamenta en el análisis de polimorfismos en las regiones de repeticiones directas (DR) denominadas CRISPRs. Las cepas del complejo *M. tuberculosis* contienen una región cromosómica distintiva que consiste de repeticiones directas múltiples de 36 pares de bases (bp) separadas por secuencias espaciadoras únicas (35 a 41 bp). Existen 94 secuencias espaciadoras, sin embargo solo 43 son empleadas en la técnica más difundida de genotipificación por *spoligotyping*. Tiene varias ventajas: es altamente reproducible, requiere

pequeñas cantidades de ADN, y tiene una simple forma de registro de resultados, lo que permitió la creación de una base de datos global con los patrones obtenidos. Su principal limitación es la baja discriminación comparada con RFLP IS6110 y MIRU-VNTR [Kamerbeek 1997]. Actualmente es usado como método de genotipificación en combinación con MIRU-VNTR. Además, continúa siendo útil para la clasificación de aislamientos del Complejo *M. tuberculosis* en familias y clados.

Mecanismos de resistencia a INH

Los rápidos avances en biología molecular junto con la información generada a partir de la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis* incrementaron los conocimientos acerca de los mecanismos empleados por este patógeno para desarrollar resistencia. A diferencia de la mayoría de las bacterias, *M. tuberculosis* no adquiere resistencia a drogas mediante transferencia horizontal de elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones o integrones. En *M. tuberculosis*, la resistencia ocurre principalmente por mutaciones cromosómicas espontáneas y la selección de cepas resistentes se produce mediante terapias inadecuadas, intermitentes o incompletas.

La INH tiene una estructura simple que incluye un anillo de piridina y un grupo hidrazida, ambos componentes esenciales para la actividad contra *M. tuberculosis*. A pesar de su estructura simple, tiene un modo de acción complejo y las primeras cepas resistentes se aislaron poco después de su aplicación. Es una pro-droga que, una vez activada, es capaz de inhibir la biosíntesis de ácidos micólicos, los cuales son componentes esenciales de la pared celular de *M. tuberculosis*.

Varios genes están involucrados en la **resistencia a INH**: *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, *ndh*. El gen *katG* codifica la enzima catalasa-peroxidasa que convierte la pro-droga INH en su forma activa. La resistencia a INH que más frecuentemente ocurre en los aislamientos clínicos está asociada a mutaciones cromosómicas presentes en el codón 315 del gen *katG* y/o en el regulador del operón *inhA*. La mutación S315T anula la capacidad de la enzima de activar la pro-droga, lo que induce altos niveles de resistencia a INH. La proteína InhA (*enoyl acyl carrier protein reductase*) está involucrada en la síntesis de ácidos micólicos. Mutaciones en posición C-15T de la región promotora del gen *inhA* se vinculan a bajos niveles de resistencia a INH en aislamientos clínicos [Gagneux 2006c]. Se ha observado que las mutaciones en el gen *katG* S315T ocurren más frecuentemente en cepas MDR que en monorresistentes a INH y se ha postulado que esta alteración no produce un costo en la aptitud biológica de la bacteria, mientras que la mutación en el promotor del gen *inhA* sí lo haría [Almeida Da Silva & Palomino 2011]. La sustitución S315T comprende la mayoría de las mutaciones asociadas a *katG* y

confiere altos niveles de resistencia a INH (CIM>5 mg/ml), mientras que mutaciones en la región promotora del gen *inhA* confiere bajos niveles de resistencia a INH (CIM<1 mg/ml). Las mutaciones en *katG* e *inhA* están presentes en 50-95% y 15-34%, respectivamente, de los aislamientos clínicos resistentes a INH. Mutaciones en *inhA* causan resistencia no solo a INH sino también a etionamida, una droga de segunda línea estructuralmente relacionada a INH.

En *M. tuberculosis*, el gen *ahpC* codifica para una reductasa hidropoxidasa vinculada a la resistencia a especies reactivas del oxígeno y productos intermediarios del nitrógeno. Se postuló que mutaciones en el promotor *ahpC* podrían ser utilizados como marcadores sustitutos para la detección de resistencia a INH. Sin embargo, estudios posteriores indican que un aumento en la expresión de *ahpC* actuaría en forma compensatoria de la pérdida de la actividad catalasa/peroxidasa [Almeida Da Silva & Palomino 2011].

Detección fenotípica y genotípica de resistencia a INH

La susceptibilidad a drogas de *M. tuberculosis* se determina fenotípicamente, en base a la inhibición del crecimiento de la bacteria en presencia de un antibiótico en comparación, ya sea con el crecimiento de la misma bacteria en ausencia del antibiótico o con el crecimiento de una cepa sensible de referencia. Hasta hace unos años, el método de las proporciones en medio sólido era la técnica de elección para evaluar la sensibilidad a fármacos. Su principal inconveniente es que se necesita entre 4 y 8 semanas desde la obtención de la muestra clínica para alcanzar un resultado. Desde hace algunos años, existen métodos parcialmente automatizados que tienden a acortar el tiempo de diagnóstico. El sistema BACTEC 460, que mide la producción de CO₂ expresado diariamente como un índice de crecimiento, es muy preciso pero cayó en desuso porque utiliza compuestos radioactivos contaminantes del medio ambiente. Actualmente se emplea el sistema MGIT 960, el cual detecta el consumo de O₂ por fluorescencia. La cepa sensible es aquella que en presencia de antibiótico no consume O₂, es decir, no desarrolla. También existen métodos colorimétricos basados en la utilización de indicadores redox que cambian de color cuando pasan del estado oxidado al estado reducido. Este cambio de color es directamente proporcional a la cantidad de bacterias viables en el medio de cultivo, por lo tanto la resistencia se expresa como cambio de color en el medio. El resultado se puede obtener en 1-2 semanas. Estos métodos permiten una rápida determinación de resistencia con bajos costos. Otro método colorimétrico muy empleado es la prueba de nitrato reductasa. Esta técnica se basa en la capacidad que tiene *M. tuberculosis* de reducir el nitrato a nitrito, detectado por un reactivo que se agrega al medio de cultivo. En presencia de antibiótico, la bacteria pierde viabilidad y por lo tanto también la capacidad de reducir el nitrato. Esta reacción puede visualizarse a los 10 días de incubación.

Las técnicas moleculares tienen por objetivo detectar mutaciones que confieran resistencia. Estas pruebas cuentan con la ventaja de la rapidez (obtención de resultados en pocas horas), son altamente sensibles y específicas, pero suelen ser caras, requieren experiencia, y no diferencian entre bacilos viables y bacilos muertos cuando el paciente lleva varios meses de tratamiento. INNO-LiPA RIF-TB (Innogenetics, Belgium), GenoType®MTBDR/MTBDR*plus* and Geno-Type® MTBDR*s*/ (ambos Hain Lifescience, Germany) actualmente se encuentran disponibles comercialmente para la identificación rápida de *M. tuberculosis* y la detección de resistencia a RIF y TB MDR/XDR. Estos ensayos consisten en la amplificación mediante PCR de fragmentos específicos del genoma de *M. tuberculosis*, seguida de hibridación de los productos de PCR sobre una membrana que contiene sondas específicas inmovilizadas. INNO-LiPA RIF-TB, detecta solo resistencia a RIF, GenoType®MTBDR/MTBDR*plus* detecta resistencia a RIF e INH y Geno-Type® MTBDR*s*/ detecta resistencia a fluoroquinolonas, inyectables de segunda línea y etambutol. Xpert® MTB/RIF (Cepheid Inc, USA), es una metodología completamente automatizada basada en PCR de tiempo real para la detección de TB y resistencia a RIF directamente sobre muestras clínicas [Senol 2013]. Diversos diseños moleculares “*in house*”, razonablemente sencillos y económicos, han sido propuestos para detectar las principales mutaciones asociadas a resistencia con razonable precisión.

Debido a que el desarrollo de resistencia a INH suele preceder al de resistencia a RIF, la resistencia a RIF es considerada un marcador de TB MDR. Aproximadamente el 95% de los casos, la resistencia a RIF se asocia a mutaciones en un segmento muy corto del gen *rpoB*. Existen varias técnicas moleculares para identificar resistencia a RIF con adecuada sensibilidad y especificidad [Martin & Portaels 2007]. Sin embargo, datos del proyecto mundial de vigilancia de fármacorresistencia llevado a cabo por la OMS y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias mostraron que la proporción de casos resistentes a RIF con resistencia simultánea a INH varió entre 54% y 98% en los países investigados, y en la mitad de estos países, esta proporción era inferior al 80%. Esto indica que se incurriría en sobre-diagnóstico de TB MDR en muchas regiones del mundo si se lo pretendiera basar exclusivamente en la detección de resistencia a RIF. Por lo tanto, es recomendable la detección simultánea de resistencia a ambas drogas, INH y RIF, para lograr una evaluación precisa de la TB MDR [Chia 2012, Imperiale 2011].

Antecedentes del tema

La evolución de *M. tuberculosis* es modulada principalmente por la aplicación de estrategias de control de la TB, y también por factores socio-económicos, ambientales y

biológicos. En particular, la biología del patógeno recientemente ha demostrado ejercer una notable influencia sobre la diseminación global de la enfermedad. Estudios moleculares revelaron que existe una insospechada diversidad genética intra-especie en *M. tuberculosis* que permitió diferenciar a *M. tuberculosis* en 6 linajes principales, los cuales poseen afinidad por determinadas regiones geográficas y etnias humanas. Estos linajes se definieron como: Indo-Oceánico (linaje 1), Este Asiático (linaje 2, incluye el sublinaje Beijing), Este Africano-Indio (linaje 3), Euro-Americano (linaje 4), Oeste-Africano (linaje 5, *M. africanum* I) y Oeste Africano (linaje 6; *M. africanum* II). Los linajes 1, 5 y 6 son considerados “antiguos” y los linajes 2, 3 y 4 son considerados “modernos” en relación a la presencia o ausencia de la región del genoma TbD1, ausente en los linajes modernos [Hirsh 2004; Gagneux 2006a, Reed 2009]. Figura 9. Un nuevo linaje, referido como linaje VII, fue descrito recientemente en Etiopia y el Cuerno de África [Tessema 2013].

Las cepas de *M. tuberculosis* circulando actualmente en América fueron traídas por los europeos en la colonización, y el linaje Euro-Americano (IV) es el predominante. Dentro del linaje Euro-Americano se distinguen varios sublinajes o familias: Latinoamericana & Mediterránea (LAM), Haarlem (H), familia T, familia X y familia S.

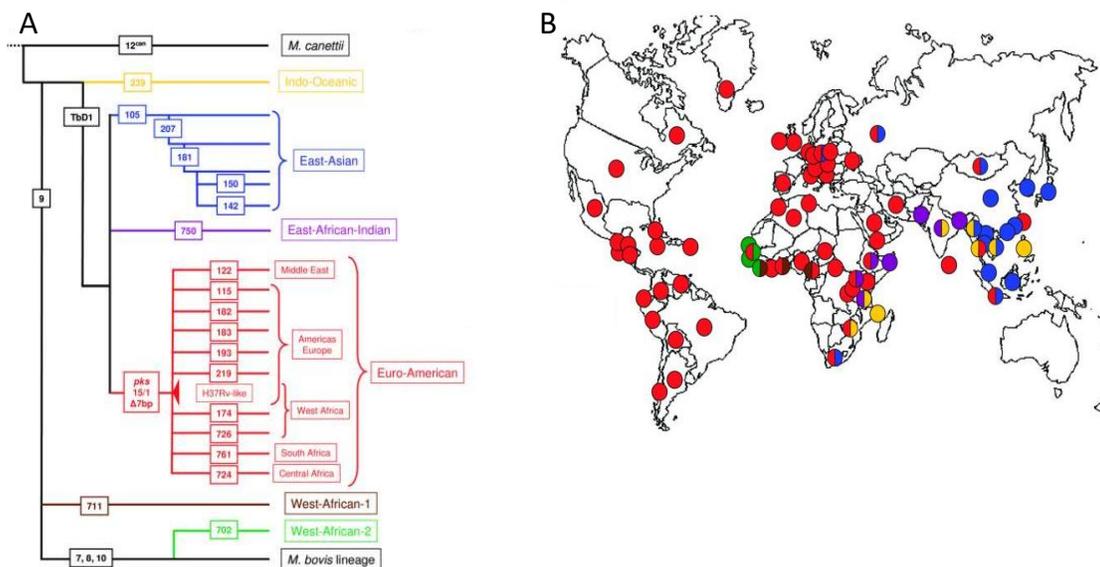


Figura 9. Estructura de población global y distribución geográfica de *M. tuberculosis*. (A) Filogenia global de *M. tuberculosis* en base a LSPs. (B) distribución global de los 6 linajes principales. Los círculos de colores representan cada uno de los seis linajes respecto de la figura 9A. [Gagneux 2006a]

La distribución geográfica global de la TB resistente a drogas es también heterogénea y no se superpone estrictamente a las áreas del mundo con mayor carga de TB sino a las áreas en las que predominan las cepas de la familia denominada Beijing, como China, países de la ex Unión Soviética y Sudáfrica [Parwati 2010]. Estudios previos han demostrado una alta variabilidad en la frecuencia y la distribución geográfica de las mutaciones canónicas que confieren resistencia a INH, *katG* S315T e *inhA* C-15T. Como diferentes linajes de *M. tuberculosis* prevalecen en distintas áreas del mundo, la adquisición de resistencia a drogas puede estar guiada por la carga genética pre-existente de las cepas y la heterogeneidad en el mundo puede explicarse por la variabilidad de estas mutaciones [Trauner 2014, Seifert 2015]. En otras palabras, los perfiles genéticos pre-existentes de ciertas cepas de *M. tuberculosis* podrían asociarse preferencialmente a determinadas mutaciones responsables de resistencia, y el efecto de estas asociaciones podría modular la aptitud biológica de las cepas [Borrel & Gagneux 2011].

Argentina aún está padeciendo las secuelas de la mayor epidemia de TB MDR registrada en América Latina. Dos cepas MDR de *M. tuberculosis*, llamadas cepa “M” y cepa “Ra”, iniciaron su expansión clonal en forma explosiva hace 20 años y se perpetuaron en la población hasta nuestros días. Considerando que, en observaciones preliminares, las cepas sensibles de *M. tuberculosis* circulantes en Argentina son más diversas que las cepas resistentes, nuestro objetivo es determinar la estructura de población de *M. tuberculosis* en Argentina y explorar la posible influencia de la carga genética de las cepas autóctonas de *M. tuberculosis* resistentes a INH sobre su capacidad de acumular resistencia a otras drogas. Este tipo de abordaje combinado del problema no ha sido aún aplicado a los genotipos resistentes de *M. tuberculosis* en nuestro país. La mejor comprensión de esas interacciones contribuirá a diseñar intervenciones racionales que permitan preservar la vida útil de las drogas anti-TB e interrumpir las cadenas de transmisión de la TB MDR en Argentina.

HIPÓTESIS

Dado que en otros países de la región la población general de *M. tuberculosis* presenta amplia diversidad genética, y que en observaciones preliminares de nuestro laboratorio las cepas sensibles de *M. tuberculosis* de Argentina son más heterogéneas que las cepas multirresistentes, entonces las sub-poblaciones resistentes a drogas de nuestro país no reflejan la estructura de población de *M. tuberculosis* y ciertos genotipos son más proclives que otros a desarrollar resistencia y transmitirse como tales.

OBJETIVOS GENERALES

- Caracterizar la estructura de población de *M. tuberculosis* en Argentina en su contexto geográfico
- Determinar si en nuestro medio ciertos genotipos son más proclives que otros a desarrollar resistencia y transmitirse como tales

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la distribución de genotipos de *M. tuberculosis* circulantes en distintas áreas de Argentina entre sí, y con la distribución observada en otros países de nuestra región
- Analizar la frecuencia de genotipos resistentes epidémicos de *M. tuberculosis* en las subpoblaciones de Argentina con distintos perfiles de sensibilidad a drogas y compararla con la frecuencia observada en diferentes regiones del mundo.
- Determinar la relación entre genotipo, mutación responsable de resistencia a INH y *clustering*

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El trabajo se organizó en tres bloques inter-relacionados que corresponden a los tres objetivos específicos enunciados más arriba:

En el **primer bloque** se caracterizó la estructura de población de *M. tuberculosis* en nuestro país en el contexto de la región. A tal fin se analizó la distribución de genotipos de *M. tuberculosis* en dos áreas del conurbano bonaerense, ambas con prevalencia intermedia de TB, y una provincia del noroeste con prevalencia alta de TB. Como parte de este trabajo de tesis, se analizó la estructura de población de una muestra de Bolivia y otra de Perú. Para completar la comparación con genotipos de la región, de la literatura disponible en PubMed, fueron seleccionadas muestras de población de *M. tuberculosis* representativas de otros países de América del Sur.

En el **segundo bloque** se investigó con qué frecuencia están representadas las cepas responsables de los principales brotes epidémicos de TB MDR de Argentina en la población general de *M. tuberculosis* de nuestro país, y en distintas regiones del mundo. Esas cepas MDR de brote son la cepa M perteneciente al clado H2 SIT2 y la cepa Ra perteneciente al clado LAM3 SIT33. Para este análisis se realizó una selección aleatoria de aislamientos resistentes a INH representativa de todo el país, y se la subdividió según el perfil creciente de resistencia en (i) resistentes a INH no MDR; (ii) MDR; y (iii) XDR. Se comparó la frecuencia de los dos clados epidémicos de interés en los aislamientos de los tres subgrupos de aislamientos del grupo resistente a INH con la frecuencia observada en los aislamientos pansensibles de la muestra de Argentina analizada en el primer bloque. A la vez, estas frecuencias fueron comparadas con las frecuencias de estos mismos clados observadas en diversas regiones del mundo según la SITVITWEB database.

El **tercer bloque** consistió en la profundización de mi trabajo de tesis de maestría orientado a investigar la relación entre resistencia a INH y genotipo [Monteserin 2014]. Se investigó la frecuencia en Argentina de las dos principales mutaciones que confieren resistencia a INH, *katG315* y promotor *inhA* -15, en relación con el perfil fenotípico de sensibilidad a drogas, el genotipo y *el clustering*. A tal fin se empleó el grupo de aislamientos resistentes a INH descrito en el segundo bloque, luego de excluir los aislamientos con genotipos M y Ra, los que, al ser ampliamente mayoritarios, causarían un sesgo considerable en el análisis. Además, las mutaciones de resistencia de los aislamientos de ambas cepas han

sido exhaustivamente caracterizadas en estudios previos por secuenciación genómica masiva [Eldholm 2014, Eldholm 2015].

Muestras

En el **primer bloque** del trabajo fueron analizados **740 aislamientos clínicos** de *M. tuberculosis* de Argentina y comparados con **2897 aislamientos de otros países de América del Sur**. En todos los casos se consideró un solo aislamiento por paciente. El detalle de las diferentes poblaciones analizadas en este bloque se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las poblaciones analizadas en la primera etapa

País	Período de Estudio	N° de aislamientos analizados	Referencia
Argentina	2002-2011	740	Este estudio
Bolivia	2010	99	Monteserin 2013
Perú	1999	140	Monteserin 2011
Perú	2009	99	Barletta 2013
Brasil	1996-2005	1991	Gomes 2012
Colombia	1995-2012	741	Realpe 2014
Chile	2008-2013	103	Balcells 2015
Guyana Francesa	2004-2005	90	Millet 2011
Guyana y Suriname	2006-2008	154	Streit 2014
Paraguay	2003	220	Candia 2007
Venezuela	1998-1999	873	Aristimuño 2006

Los aislamientos de Argentina se originaron en dos áreas distantes del país que difieren sensiblemente en cuanto a geografía, demografía y tasas de TB: (i) el Área Metropolitana de Buenos Aires, ubicada en la llanura pampeana, cosmopolita, con tasas intermedias de TB y destinataria de migrantes tanto domésticos como extranjeros procedentes de diferentes áreas con alta endemicidad de TB; (ii) la provincia de Jujuy, relativamente aislada en la región andina del Noroeste, con predominio de población americana autóctona, movilidad bidireccional a través de frontera y altas tasas de TB. Los aislamientos fueron obtenidos de pacientes asistidos en forma consecutiva durante los respectivos períodos de estudio y con diagnóstico de TB confirmado por cultivo en el Hospital Zonal de Agudos "Dr. G Paroissien" de La Matanza, el Hospital Central de San Isidro, y el Hospital San Roque de San Salvador de

Jujuy. La distribución de aislamientos de Argentina según el área de origen y perfil de resistencia se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Aislamientos de tres áreas de Argentina según información disponible sobre perfil de sensibilidad a drogas.

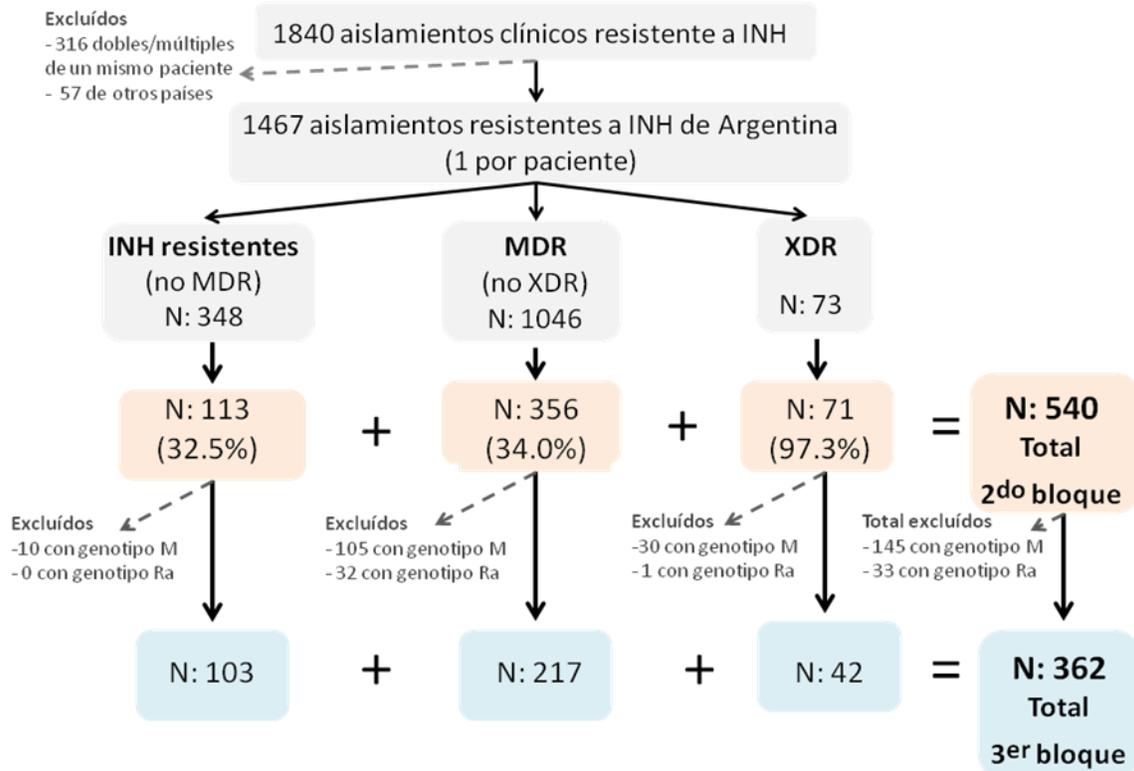
	Sin riesgo de resistencia	Pan-sensible	Mono- o poli-resistente	Multi-resistente	Con resistencia extendida
Área Metropolitana de Buenos Aires (norte)	180	36	7	5	0
Área Metropolitana de Buenos Aires (oeste)	74	238	22	18	2
Jujuy	145	10	1	2	0
Total	399	284	30	25	2

Los 140 aislamientos de Perú y los 99 de Bolivia investigados en esta tesis se originaron en las respectivas muestras de estudios de resistencia a drogas representativas de la ciudad de Lima, en el primer caso, y de todo el territorio en el segundo. Además, las muestras analizadas en el estudio fueron comparadas con poblaciones de *M. tuberculosis* de otros países de América del Sur seleccionadas de la literatura.

En el **segundo bloque**, el grupo de **284 aislamientos pansensibles** de Argentina investigados en el bloque anterior se comparó con una muestra representativa de aislamientos drogorresistentes del país, la que fuera objeto de estudio en mi tesis de maestría [Monteserin 2014]. Esta muestra consistió en **540 aislamientos clínicos resistentes al menos a INH**, los que fueron seleccionados de la siguiente manera. Entre enero de 2003 y diciembre de 2012, 7459 aislamientos de *M. tuberculosis* fueron derivados al Servicio de Micobacterias INEI ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” para confirmación de especie de micobacteria y pruebas de sensibilidad a drogas. Un total de 1840 aislamientos resultaron *M. tuberculosis* con resistencia al menos a INH. De estos 1840, fueron excluidos los aislamientos múltiples de un mismo paciente (n: 316) y aquellos con origen en otros países (n: 57). Los 1467 aislamientos restantes, uno por paciente, fueron clasificados en tres grupos de acuerdo al perfil de resistencia: (i) resistentes a INH con/sin resistencia a otra droga diferente de RIF (no MDR); (ii) MDR, es decir resistentes al menos a INH y RIF (no XDR); y (iii) XDR, es decir MDR con resistencia adicional a una fluoroquinolona y una droga inyectable de segunda línea. Cuando existía más de un aislamiento de un mismo paciente, se seleccionó el que tenía el perfil de resistencia más extenso. Por ejemplo, en el caso hipotético de que un paciente estuviera

representado por tres aislamientos (uno monorresistente a INH, uno MDR y uno XDR) se incluyó sólo el aislamiento XDR. Además, debido a limitaciones de tiempo y presupuesto, no fue posible abordar el análisis de todos los aislamientos de los dos grupos más numerosos: se seleccionó en forma aleatoria 1 de cada 3 aislamientos consecutivos de la lista de aislamientos MDR, y 1 de cada 3 aislamientos consecutivos de la lista de aislamientos resistente a INH (no MDR), según disponibilidad. Por su número pequeño y su relevancia, se decidió incluir todos los aislamientos del grupo XDR disponibles en el momento del estudio. La figura 10 describe el algoritmo de selección de los aislamientos resistentes a INH analizados en el segundo y el tercer bloque del estudio.

Figura 10. Selección y clasificación de aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a INH analizados en este estudio a partir del total de aislamientos clínicos obtenidos en Argentina y derivados a nuestro laboratorio en el período 2003-2012.



La muestra investigada en la **tercera etapa** es la misma descrita en la segunda etapa, pero luego de excluir los aislamientos con genotipo de cepa M y cepa Ra, tal como se muestra en la Figura 10.

Los aislamientos clínicos incluidos en el estudio fueron repicados en medio Löwenstein-Jensen, incubados a 37°C e identificados como *M. tuberculosis* mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Los aislamientos de pacientes con factores de riesgo de resistencia fueron sometidos a pruebas de sensibilidad a drogas. La susceptibilidad a drogas de primera y

segunda línea fue determinada por el método de la proporciones en medio Löwenstein-Jensen y/o MGIT 960 según lo establecido por la OMS [WHO 2009].

Extracción del ADN

Para RFLP IS6110, el ADN se purificó con el método estándar [van Soolingen 1991]. Brevemente, suspensiones de bacilos en Tris-EDTA fueron inactivadas por calor, sometidas a disrupción mecánica, lisis y precipitación de proteínas mediante sucesivos tratamientos con lisozima, dodecil-sulfato de sodio, proteinasa K, cetilmetil-bromuro de sodio; luego de una extracción con cloroformo-alcohol isoamílico, el ADN contenido en el sobrenadante acuoso fue precipitado con isopropanol y resuspendido en 20-50 µl de buffer Tris-EDTA.

Para el resto de las pruebas moleculares de genotipificación (*spoligotyping* y MIRU-VNTR) y detección de resistencia (MAS-PCR), que están basadas en PCR, el ADN fue obtenido mediante hervido simple: tres ansadas de colonias bacterianas crecidas en medio Löwenstein-Jensen fueron suspendidas en 100 µl de agua estéril calidad biología molecular e incubadas 30 minutos a 100°C. Las suspensiones fueron centrifugadas 15 minutos a 12 000 g y el sobrenadante se transfirió a un vial nuevo estéril.

Genotipificación

Todos los aislamientos investigados fueron caracterizados por *spoligotyping*. Como segunda prueba de genotipificación se empleó IS6110 y/o MIRU-VNTR24 según disponibilidad.

Spoligotyping

Se realizó mediante amplificación e hibridación reversa con 43 oligonucleótidos correspondientes a otros tantos espaciadores existentes en el locus DR de *M. tuberculosis* inmovilizados en una membrana de nylon [Kamerbeek 1997]. La mezcla de reacción para un volumen final de 20 µl consistió en: buffer PCR 10X 2 µl; MgCl₂ 50 mM 1,2 µl; dNTPs 10 mM 0,15 µl; primer DRa 5' biotinilado 100 mM (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3'), primer DRb 100 mM (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), Taq Polimerasa (5U/ µl) 0,09 µl, templado de ADN 3 µl, H₂O calidad biología molecular hasta completar 20 µl. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler 384, Eppendorf®, Hamburg, Germany) de acuerdo al siguiente programa: etapa inicial de desnaturalización 96°C 3 min; 30 ciclos consecutivos de 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 30 seg; etapa final de elongación 72°C 10 min. Una vez

completada la reacción, el producto amplificado se diluyó en un vial estéril con 150 µl de solución SSPE 2X (dilución de la solución SSPE 20X: Na₂HPO₄*2H₂O 0,2 M; NaCl 3,6 M; EDTA 20 mM; pH 7,4)/ SDS 0,1%. Esta dilución del producto de PCR fue desnaturalizada por calentamiento extemporáneo a 99°C e inmediatamente colocada en hielo para evitar la re-hibridación de las hebras de ADN.

Previo a su utilización, la membrana de *nylon* con los 43 oligonucleótidos inmovilizados (Ocimum Biosolutions LTD, Hyderabad, India) se incubó en solución SSPE 2X/SDS 0,1% a 60°C durante 5 min. Luego se la colocó en el *miniblotter* 45 (Immunetics, Boston, MA, USA), equipo diseñado para detección de anticuerpos y reacciones de hibridación en línea. Los canales 1 y 45 fueron llenados con buffer, y los productos de amplificación diluidos fueron sembrados en cada uno de los 43 canales restantes del *miniblotter*. La hibridación se desarrolló en horno de hibridación horizontal a 60°C durante 75 minutos. Transcurrido ese tiempo, se aspiró por vacío cada uno de los canales y, una vez desarmado el sistema, la membrana fue retirada y sometida a dos lavados consecutivos con 250 ml de solución SSPE 2X/ SDS 0,5% a 60°C durante 10 minutos. Finalizados los lavados, la membrana se colocó en un tubo *roller* para su hibridación con 3 µl de estreptoavidina-peroxidasa (500 U/ ml) diluida en 15 ml de SSPE 2X/ SDS 0,5%, y se incubó en rotación a 38°C por 45 minutos. Finalizada la hibridación se realizaron dos lavados consecutivos con SSPE 2X/ SDS 0,5% en rotación a 38°C por 10 minutos cada uno, seguido de un último lavado con SSPE 2X a temperatura ambiente.

Para la detección quimioluminiscente se usó el equipo ECL Direct Labeling and Detection System (Amersham GE® International, Buckinghamshire, UK) que emplea luminol como sustrato de la peroxidasa fijada a los oligonucleótidos. El producto de degradación del luminol emite luz azul. Seis mililitros de una mezcla extemporánea de los reactivos 1 y 2 del kit de detección fueron aplicados sobre la membrana en un recipiente limpio durante 1 min procurando que toda su superficie tomara contacto con el líquido. Luego de escurrida, la membrana fue extendida sobre un soporte de acetato. Rápidamente, la membrana junto al soporte fueron envueltos en una película plástica adhesiva evitando la formación de burbujas de aire y la filtración de líquidos. Así preparada, la membrana fue expuesta durante 40 min a una placa fotosensible Hyperfilm (ECL Amersham GE® International, UK) dentro de un cassette sellado a prueba de luz. Transcurrido este tiempo se reveló la placa en cuarto oscuro.

RFLP IS6110

Se empleó el protocolo estándar internacional [van Embden 1993]. Brevemente, 2 µg de ADN cromosomal de alta calidad e integridad fueron sometidos a restricción enzimática con la endonucleasa Pvu II. Los fragmentos obtenidos fueron separados según su longitud por electroforesis en un gel de agarosa 0,8% y transferidos por vacío a una membrana de *nylon* cargada positivamente (Hybond). La presencia de IS6110 en los fragmentos de restricción se reveló mediante hibridación con una sonda dirigida contra un segmento de 425 pb específico de IS6110. La sonda fue producida en nuestro laboratorio mediante amplificación por PCR. El marcado y la detección no radiactiva de la sonda se realizó por quimioluminiscencia, y la emisión de luz fue registrada por autorradiografía mediante el uso de un sistema comercial (ECL™ Amersham GE® International, Buckinghamshire, UK). El ADN cromosomal de la cepa de referencia internacional Mt 14323 del gel fue incluido por triplicado como genotipo estándar en 3 calles equidistantes de cada gel.

MIRU-VNTR 24

En los aislamientos que presentaron genotipos huérfanos o no clasificables por *spoligotyping*, se realizó la genotipificación mediante el método estandarizado basado en 24 *loci* [Supply 2006]. Este método consiste en la determinación del número de VNTRs ubicadas en diferentes regiones del cromosoma bacteriano. Brevemente, se amplificaron los segmentos de interés mediante PCR con 24 pares de *primers* específicos y, siguiendo la modalidad manual del método, se estimó en forma visual el tamaño de los productos amplificados mediante electroforesis submarina en un gel de agarosa ultrapura (NuSieve™) al 3%, en comparación con marcadores comerciales de 50 y 100 pb (Invitrogen™). De acuerdo al tamaño de los amplicones se determinó el número de unidades repetidas en cada uno de los 24 productos para cada aislamiento. La tabla S1 del material suplementario describe las mezclas de reacción utilizadas y los *primers* empleados [Supply 2006]. La tabla S2 del material suplementario muestra del número de copias de cada VNTR de acuerdo al tamaño del producto de amplificación.

Análisis computarizado de genotipos

Una vez reveladas las placas de *spoligotyping* y RFLP IS6110 con los perfiles genéticos de los diferentes aislamientos, las imágenes fueron digitalizadas e ingresadas a nuestra base de datos mediante el software BioNumerics v5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), con el módulo *fingerprinting type*. Los patrones genéticos de los MIRU-VNTR 24

obtenidos fueron ingresados a BioNumerics v5.1 módulo *character type*. En caso de ser necesario el spoligotipo también fue ingresado a la base de datos de *character type*.

Para la asignación de familias, clados y spoligotipos internacionales (SITs) de los genotipos de *M. tuberculosis* obtenidos se respetó la nomenclatura original de la base de datos SITVIT WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/) [Demay 2012] de dominio público en internet. Un SIT es un patrón de spoligotipo representado en SITVIT WEB por dos o más aislamientos. SITVIT WEB contiene spoligotipos de 58187 aislamientos enviados de todo el mundo. De estos, 53830 están clasificados en 2747 SITs (spoligotipos compartidos) y otros 4357 son considerados *orphan* porque están representados en SITVIT WEB por un solo aislamiento. Para evitar ambigüedades en la nomenclatura, se evitó la traducción de las denominaciones originales en idioma inglés. En el caso de genotipos clasificados como *orphan* en la base de datos SITVIT WEB, o ausentes de la misma, se investigó la asignación filogenética en: (i) la base de datos MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU>) [Béguec 2008, Weniger 2010] de acceso libre en internet; y (ii) una versión actualizada de SITVIT denominada SITVIT EXTEND. Esta última base es propiedad del Institut Pasteur Guadeloupe, cuenta con genotipos (spoligotipos, MIRU12, VNTRs) de 120 000 aislamientos, y aún no es de acceso público en la web (gentileza Dr. Nalin Rastogi).

Detección de las mutaciones que confieren resistencia a INH

Para la detección de las dos mutaciones principales que confieren resistencia a INH, se empleó una versión modificada del método MAS-PCR (*multiplex allele specific- PCR*) descrito por Chia *et al* (2012). Los *primers* empleados fueron: (i) **katG5R** (5'-ATACGACCTCGATGCCGCT) y **katG0F** (5'-GCAGATGGGGCTGATCTACG) para amplificar la región del gen *katG* que contiene el codón S315, y (ii) **inhA-15** (5'-CACCCCGACAACCTATCG) e **inhAPF2** (5'-GCGCGGTCAGTTCCACA) para detectar la mutación C-15 en la región promotora del gen *inhA*. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl. La mezcla consistió en: buffer de PCR 10X 2,5 µl; MgCl₂ 50 mM 2 µl; dNTPs 10 mM 0,5 µl; katG5R y katG0F 1 pmol, *inhA-15* e *inhAPF2* (6 pmol); Taq polimerasa (5U/µl) 0,1 µl. La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler 384 Eppendorf®, con el siguiente perfil de ciclado: (i) una etapa inicial de desnaturalización a 96°C 3 min; (ii) 25 ciclos consecutivos de 95°C 50 seg, 68°C 40 seg, 72°C 1 min; y (iv) etapa final de extensión de 72°C 7 min. Los productos de amplificación, fueron separados según su tamaño en geles de agarosa al 2% mediante electroforesis submarina, a 100 voltios durante 90 minutos. Los mismos fueron teñidos con GelRed™ (Biotium Inc, USA) y

documentados en un equipo Fujifilm LAS-3000 (Fujifilm Medical Systems, Stamford, CT, USA).

Si el ADN blanco no está mutado en la posición analizada, el fragmento de ADN es amplificado, dando como producto una banda de 293 pb para el segmento que contiene el codón S315 en el gen *katG*, mientras que para la posición (C-15) del gen *inhA* el producto de amplificación es de 270 pb. La presencia de mutación en los sitios blancos resulta en ausencia de bandas Figura 11.

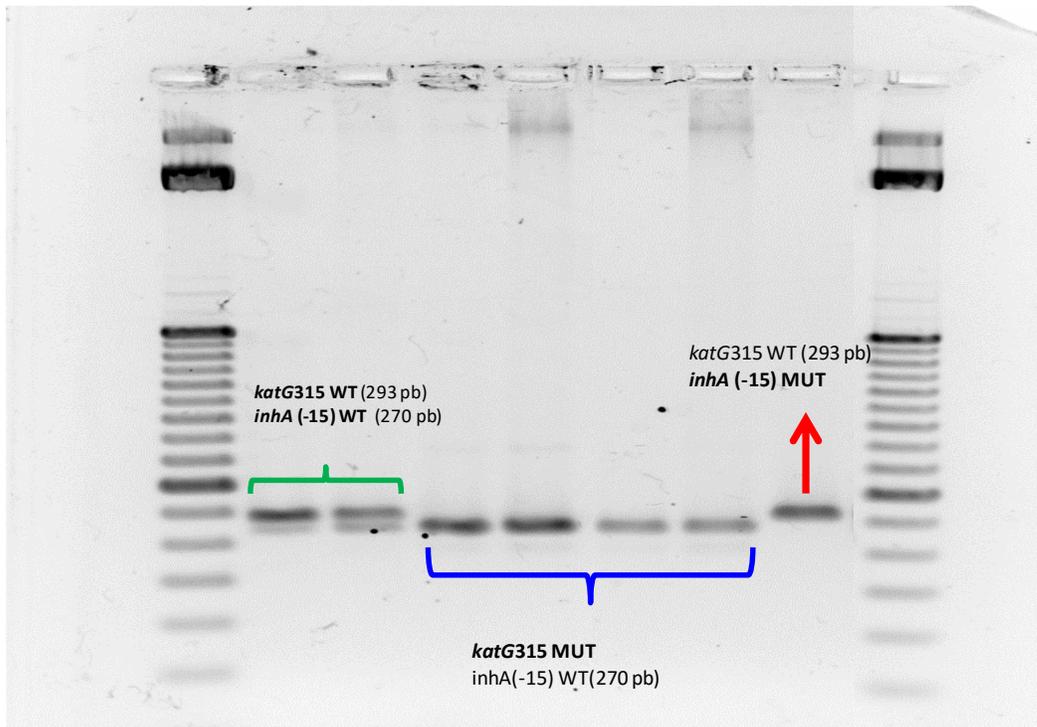


Figura 11. Gel de agarosa con los productos de amplificación de MAS-PCR. Las calles señaladas en verde muestran la presencia de dos bandas, por lo que dichos aislamientos son *wild type* para las dos mutaciones estudiadas. Las calles señaladas con llave azul, poseen el genotipo *katG315* MUT y la calle señalada en rojo presentan la mutación *inhA* (-15).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa MedCalc v9.3.6.0 (Frank Schoonjans, Belgium). Se empleó la prueba de χ^2 de tendencia para investigar la asociación entre polimorfismos *katG315* e *inhA* (-15) y el perfil fenotípico de resistencia a drogas. Con este fin, los aislamientos fueron clasificados en (i) monorresistentes a INH, (ii) polirresistentes definidas como resistentes a INH y otra(s) droga(s) diferentes de RIF, (iii) MDR, y (iv) XDR. Mediante

análisis univariado se investigó la asociación de polimorfismos en *katG315* e *inhA* (-15) con las familias y los clados más conspicuos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ y altamente significativo un valor de $p < 0,001$.

RESULTADOS

Estructura de población de *M. tuberculosis* en Argentina

En este primer bloque se presenta la distribución de genotipos en la población de Argentina, se compara la distribución observada en los distritos de origen entre sí y con la distribución en otros países de la región.

La tabla 3 describe las características demográficas, clínicas y microbiológicas relevantes de la población investigada.

Tabla 3. Características de 740 pacientes con TB de Argentina, 2002-2011.

Variable	n	%
Edad		
<16	27	3,6
16-45	422	57,0
>45	193	26,1
desconocido	98	13,2
Género		
masculino	354	47,8
femenino	310	41,9
desconocido	76	10,3
País de origen		
Argentina	586	79,2
otro	55	7,4
desconocido	99	13,4
VIH		
negativo	528	71,4
positivo	98	13,2
desconocido	114	15,4
Localización		
pulmonar	555	75,0
otra	103	13,9
desconocida	82	11,1
Baciloscopia		
positiva	428	57,8
negativa	210	28,4
desconocida	102	13,8
Perfil de resistencia		
pansusceptible	284	38,4
MDR	25	3,4
XDR	2	0,3
mono- o poli-resistente	30	4,1
sin riesgo de resistencia	399	53,9

Un total de 663 (89,6%) aislamientos de Argentina estuvieron representados por 114 SITs (*shared international types*). Otros 48 (6,5%) aislamientos correspondieron a 35 patrones presentes como *orphan* en SITVIT EXTEND y los 29 (3,9%) restantes correspondieron a 13 patrones que están ausentes tanto en SITVIT EXTEND como en MIRUsplus.

La figura 12 muestra la distribución de las principales familias identificadas en la muestra.

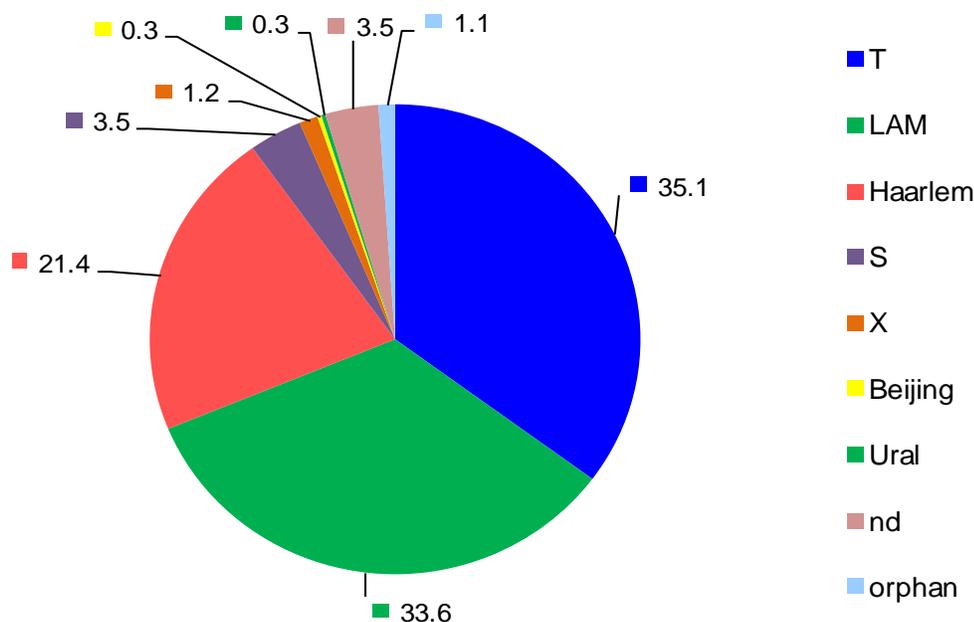


Figura 12. Frecuencia general de familias de *M. tuberculosis* en los 740 aislamientos de Argentina analizados

La tabla 4 muestra los 114 SITs presentes en la muestra en orden decreciente de frecuencia. Juntos, los seis SITs mayoritarios (SITs 50, 33, 53, 42, 159 y 47) representan el 45,3% de la muestra. La tabla 5 muestra los resultados del análisis de los aislamientos huérfanos de SIT en la base SITVIT WEB, los cuales, para precisar su asignación, fueron sometidos a MIRU-VNTR24 y posterior análisis en las bases SITVITEXTEND y MIRUSplus. En ambas tablas, aquellos SITs, spoligotipos y familias coloreadas en rojo se refieren a los spoligotipos que fueron asignados a un clado o SIT en SITVITEXTEND, la nueva versión actualizada de la base de datos de *Institut Pasteur de Guadeloupe*, la que no es aún de acceso público. La tabla 6 muestra la caracterización de 57 aislamientos *orphan* o no determinados según SITVITEXTEND y MIRU-VNTRplus.

Tabla 5. Spoligotipos de los 77 aislamientos clasificados como *orphan* o no determinados

Tabla 6 (continuación). Caracterización de 57 aislamientos *orphan* o no determinados según SITVITEXTEND y MIRU-VNTRplus y presentes en nuestra base de datos.

En la población de *M. tuberculosis* de Argentina se observó un predominio absoluto del linaje 4 Euro-Americano, en particular, las familias T, LAM y Haarlem. Los genotipos LAM3 SIT33 y LAM9 SIT42 acumularon el 52% de los spoligotipos de la familia LAM. Los genotipos predominantes T1 Ghana SIT53 y T1 Tuscany SIT159 sumaron el 45,3% de los aislamientos de la familia T. El 64,6% de los genotipos Haarlem correspondieron a los clados H3 SIT50 y H1 SIT47. El clado H2 SIT2 representó el 9,5% del total de aislamientos de la familia Haarlem.

Área Metropolitana de Buenos Aires

De los 354 aislamientos del **distrito oeste** del área metropolitana, 317 (89,5%) se agruparon en 76 SITs, 20 (5,6%) resultaron representados por 14 patrones *orphan* en SITVITEXTEND WEB, mientras que los 17 (4,5%) aislamientos restantes representaron 15 spoligotipos nuevos, ausentes en dicha base de datos. Tabla S3 del material suplementario. En este distrito, la frecuencia de familias en orden decreciente fue: T 37,6%; LAM 28,8%; Haarlem 20,1%; S 3,4%, X 2,0%; Ural 0,6%; no determinada 6,8% y *orphan* 0,8%. Los SITs predominantes fueron T1 Ghana SIT53, T1 Tuscany SIT159, LAM9 SIT42 y LAM3 SIT33, los que juntos sumaron el 33,3% de los spoligotipos presentes en esta población.

De los 228 aislamientos recolectados en el **distrito norte** del Área Metropolitana, 207 (90,8%) se agruparon en 58 SITs, 11 aislamientos (4,8%) correspondieron a spoligotipos presentes en SITVITEXTEND como *orphan* y 10 (4,4%) aislamientos presentaron spoligotipos ausentes en SITVITEXTEND WEB. Tabla S4 del material suplementario. En este distrito, la frecuencia de familias en orden decreciente fue: LAM 37,3%; T 36,0%; Haarlem 16,7%; S 4,4%; X 0,9%; Beijing 0,9%; no determinado 3,1%, y *orphan* 0,9%. Los tres SITs más frecuentes fueron LAM3 SIT33, T1Ghana SIT53 y H3 SIT50.

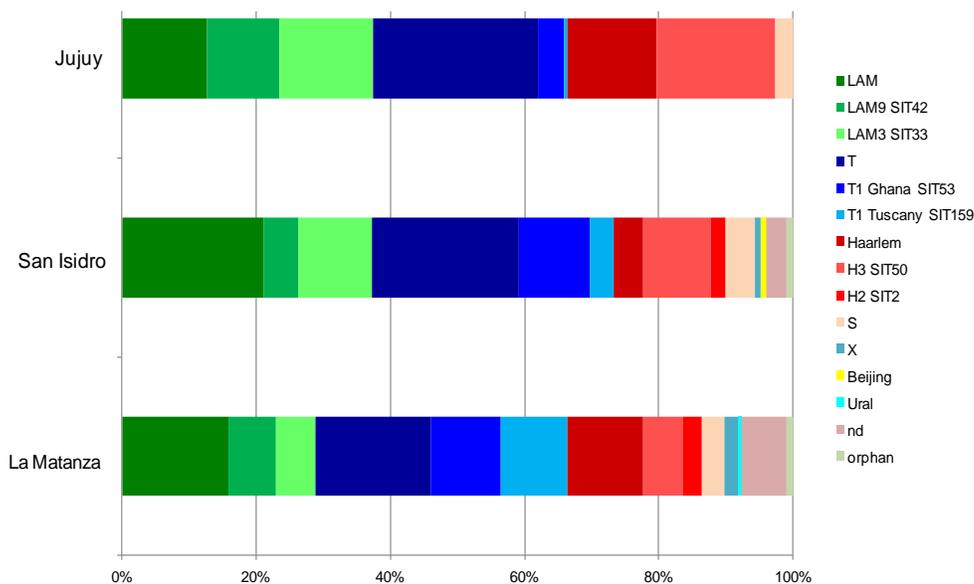
Se observaron algunas diferencias en la distribución de genotipos de los dos distritos. En la población del distrito norte predominó la familia LAM, con amplia representación de LAM3 SIT33. La proporción de aislamientos de familia T fue similar en ambos distritos, con mayor representación de T1 Tuscany SIT159 en el oeste. Los dos únicos aislamientos con genotipos de la familia Beijing fueron identificados en el distrito norte del Área Metropolitana.

Jujuy

De los 158 aislamientos de la provincia de Jujuy, 139 (88,0%) se agruparon en 32 SITs. De los 19 aislamientos restantes, 16 tenían genotipos registrados como *orphan* en SITIVITEXTEND WEB y solo 3 aislamientos con genotipos idénticos entre sí no coincidieron con ninguno de los presentes en las bases de datos consultadas (Tabla S5 del material suplementario). La frecuencia de familias en orden decreciente fue: LAM 37,3%; H 31,0%; T 29,1% y S 2,5%. Juntos, los SIT50 H3, SIT33 LAM3, SIT42 LAM9 y SIT47 H1 sumaron el 51,3% de los genotipos de Jujuy. El SIT50 H3 fue el más frecuente entre los aislamientos de Jujuy, casi duplicando y triplicando la frecuencia del mismo genotipo en San Isidro y La Matanza, respectivamente. El SIT2541 T1 fue el predominante dentro de la familia T. Este SIT estuvo escasamente representado en La Matanza y ausente en San Isidro. En esta población el SIT159 T1 Tuscany fue muy infrecuente y no estuvieron representadas la subfamilia H2, la familia Beijing ni la X.

La Figura 13 muestra las frecuencias de las familias y genotipos en los tres distritos de Argentina.

Figura 13. Frecuencia de familias y principales subfamilias en los dos distritos del Área Metropolitana de Buenos Aires y la provincia de Jujuy

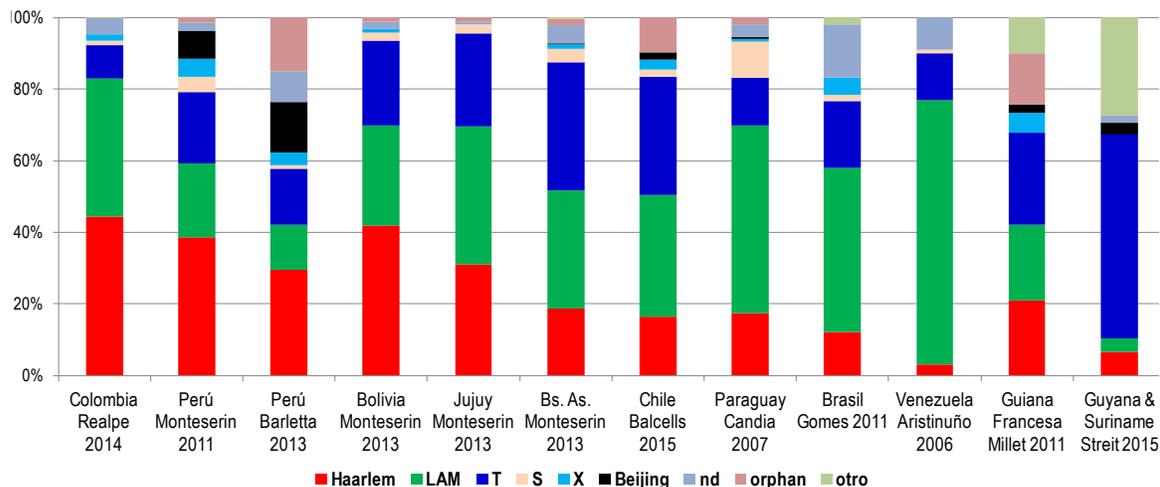


Argentina en el contexto de la región

La figura 14 muestra la distribución de las familias de *M. tuberculosis* en Argentina en el contexto de los países de América del Sur. La estructura de población de *M. tuberculosis* en la región está gobernada por el linaje 4 Euro-Americano y las tres familias predominantes son LAM, Haarlem y T, con algunas variaciones.

La familia Haarlem presenta alta frecuencia en los países de la costa del Pacífico, excepto Chile. Haarlem también es muy frecuente en Bolivia, país mediterráneo, próximo al Pacífico. En cambio, la familia LAM predomina sobre la familia Haarlem en los países con costa al Atlántico y en Paraguay. La distribución en nuestra provincia de Jujuy se asemeja a la de Bolivia, con alta frecuencia de genotipos Haarlem, y es menor en Buenos Aires. La estructura de población de Chile es similar a la de Buenos Aires. Perú es el país de América del Sur con mayor frecuencia de genotipos Beijing. La estructura de población de Suriname y Guyana es marcadamente diferente de la del resto de los países de América del Sur. La familia T es la predominante y se observan frecuencias relativamente altas de linajes diferentes del Euro-Americano. También Guyana Francesa, aunque en menor grado, presenta una estructura de población atípica para la región.

Figura 14. Distribución de las principales familias de *M. tuberculosis* en Sud América



Frecuencia de clados de brote MDR según perfil de resistencia

En este **segundo bloque** se observó que el genotipo H2 SIT2 al que pertenece la cepa M resultó estar virtualmente ausente en el grupo pansensible de Argentina y su frecuencia fue progresivamente mayor en los grupos con perfiles crecientes de resistencia, reflejando la presencia de la cepa M, que es la más prevalente en los grupos MDR y XDR de Argentina, pero no ha sido detectada hasta el presente como pansensible (Figura 15). En cambio, el genotipo LAM3 SIT33 al que pertenece la cepa Ra presentó frecuencia similar en el grupo pansensible y el grupo resistente a INH, aun cuando la cepa Ra no estaba representada en esos grupos. LAM3 SIT33 resultó sobrerrepresentado en el grupo MDR a causa de la presencia de la cepa Ra, y subrepresentado en el grupo XDR pues esta cepa rara vez progresa al *status* XDR.

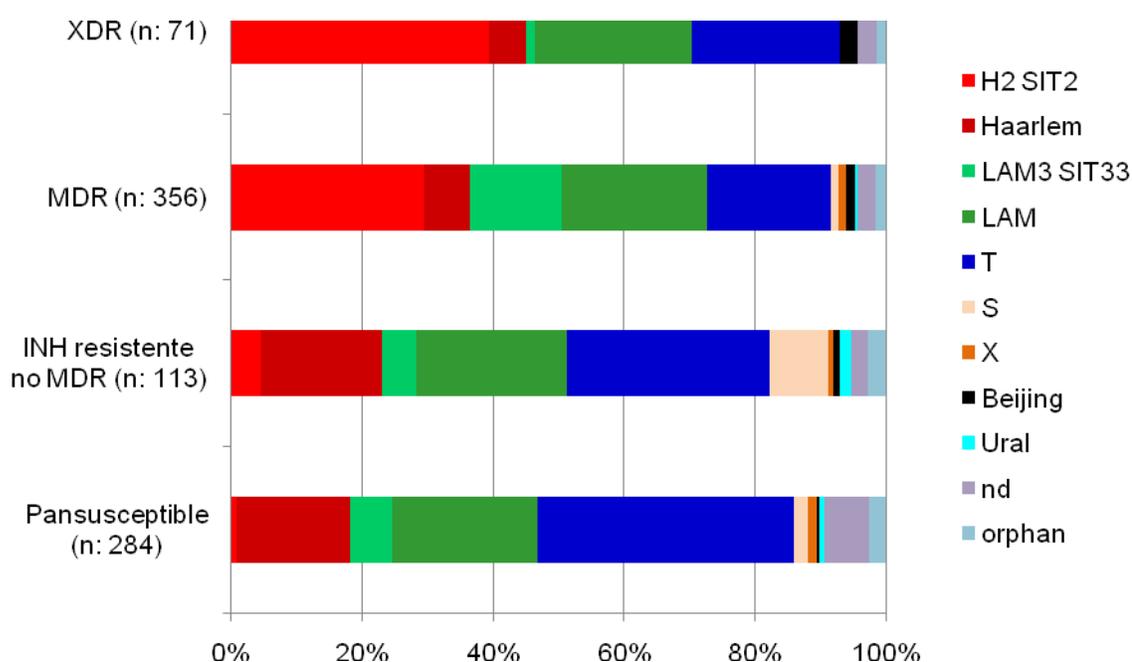


Figura 15. Frecuencia de los dos genotipos mayoritarios de brote de TB MDR y del resto de las familias en grupos de aislamientos de Argentina con distintos perfiles de sensibilidad a drogas.

En la Tabla 7 se muestra la frecuencia de SIT2 H2 en la población de Argentina según este estudio comparada con la de las diferentes regiones del mundo según SITVIT WEB.

Tabla 7. Frecuencia del genotipo SIT2 H2 en la población de *M. tuberculosis* de Argentina según este estudio y en las regiones del mundo según SITVIT WEB

País/Región	Número de cepas	Frecuencia (%)
Argentina (este estudio)	15	2,0
América del Sur*	68	1,3
América Central	9	2,3
Caribe	75	6,7
América del Norte	-	<1,0
Europa del Este	17	1,37
Resto de Europa	-	<1,0
África	-	<1,0
Asia	-	<1,0
Oceanía	-	<1,0
Europa-Norte	-	<1,0
Europa-Sur	-	<1,0
Europa-Occidental	-	<1,0

* Argentina contribuye con 35 del total de 68 aislamientos con SIT2 de América del Sur

Resistencia a INH y mutaciones *katG315* e *inhA* (-15)

Se observó una relación inversa entre la presencia de las dos mutaciones investigadas en este **tercer bloque**. De los 362 aislamientos resistentes a INH analizados, 192 (53,0%) presentaron la mutación *katG315* (*mutated*, MUT) en ausencia de mutación (*wild type*, WT) en la región promotora (-15) del gen *inhA*. A la inversa, 99 (27,4%) aislamientos presentaron la mutación en *inhA* (-15) en presencia del codón S315 WT. Las dos mutaciones estuvieron simultáneamente ausente en 70 aislamientos (19,3%) y simultáneamente presente en un solo aislamiento (0,3%).

Relación de mutaciones *katG315* e *inhA* (-15) con perfil de resistencia

La combinación *katG315* MUT con *inhA* (-15) WT, estuvo presente en 34 (33%) aislamientos del grupo resistente a INH no MDR, 128 (59,0%) del grupo MDR (no XDR) y 30 (71,4%) del grupo XDR. Se observó una tendencia al aumento en la frecuencia de dicha combinación entre estos tres grandes grupos de aislamientos discriminados por perfil de resistencia (χ^2 de tendencia 22,6 $p < 0,0001$). La tendencia se acentuó cuando el grupo (I) se subdividió en monorresistente a INH y polirresistente (Figura 16).

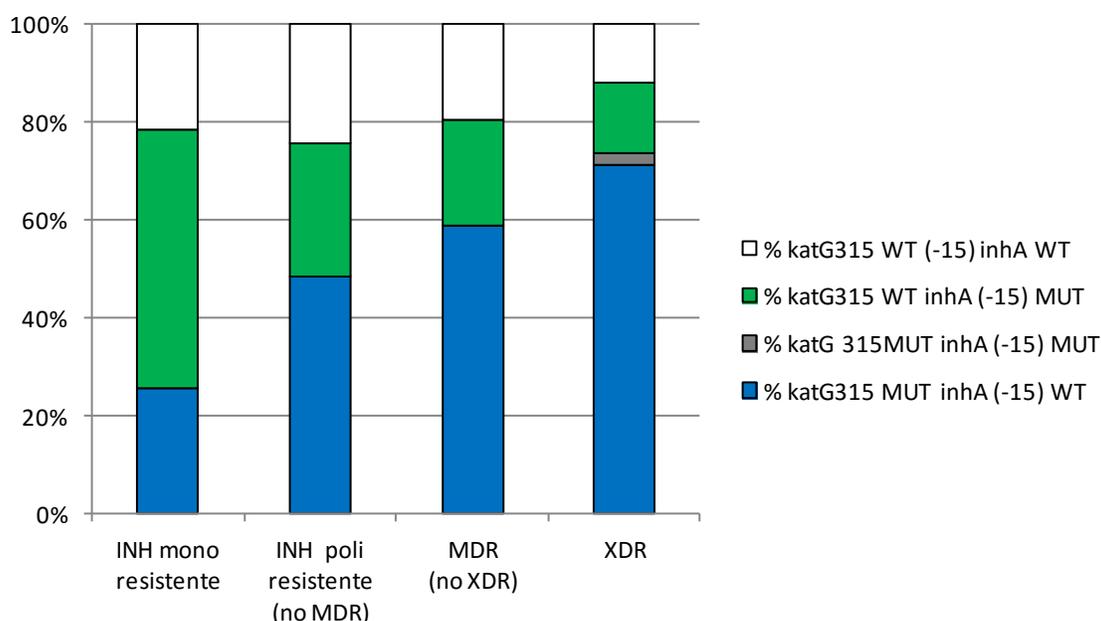


Figura 16. Distribución de polimorfismos *katG315* e *inhA* (-15) en cuatro grupos de aislamientos resistentes a INH según su perfil de resistencia a drogas. (χ^2 de tendencia: 29.4; $P < 0.0001$)

Relación de mutación de resistencia a INH con genotipo

La frecuencia de los genotipos de *M. tuberculosis* entre los 362 aislamientos resistentes a INH fue: T 33,7% (122/362), LAM 30,4% (110/362), Haarlem 16,3% (39/362), no determinado 6,4% (23/362), S 4,4% (16/362), Beijing 2,8% (10/362), X 1,9% (7/362) y *orphan* 4,1% (15/362).

Las mutaciones *katG315* e *inhA* (-15) no se distribuyeron homogéneamente entre los distintos genotipos (Tabla 8). La familia LAM se asoció a *katG315* MUT, mientras que las familias S y T se asociaron a *inhA* (-15) MUT. El clado T1 Ghana SIT53 fue el más

frecuentemente asociado con la ausencia de las dos mutaciones (OR 3,0; 95% CI 1,5-5,9; $P=0,0012$). T1 Tuscany SIT159 se asoció al genotipo *inhA* (-15) MUT (OR 6,4; 95% CI 2,5-18,8; $P<0,0001$) y a *katG315* WT (OR 0,1; 95% CI 0,02-0,3; $P=0,0004$). Tabla S7 y S8 del material suplementario.

Tabla 8. Asociación entre las mutaciones *katG315* e *inhA* (-15) y familias de *M. tuberculosis* en 362 aislamientos clínicos resistentes a INH

Familias	N	<i>katG315</i> MUT		Odds ratio (95% IC)	<i>P</i>	<i>inhA</i> P-15		Odds ratio (95% IC)	<i>P</i>
		n	%			n	%		
Haarlem	59	27	45,8	0,7 (0,4-1,2)	0,2052	20	33,9	1,4 (0,8-2,6)	0,2404
LAM	110	86	78,2	4,9 (2,9-8,1)	<0,0001	11	10,0	0,2 (0,1-0,4)	<0,0001
T	122	45	36,9	0,4 (0,2-0,6)	<0,0001	47	38,5	2,2 (1,4-3,6)	0,0011
U	23	13	56,5	1,2 (0,5-2,7)	0,75	2	8,7	0,2 (0,1-1,0)	0,0528
S	16	4	25,0	0,3 (0,1-0,9)	0,0288	11	68,8	6,4 (2,2-18,8)	0,0008
Beijing	10	8	80,0	3,6 (0,8-17,2)	0,1075	1	10,0	0,3 (0,04-2,2)	0,2353
X	7	4	57,1	1,2 (0,3-5,3)	0,8377	1	14,3	0,4 (0,1-3,6)	0,44
Orphan	15	6	40,0	0,6 (0,2-1,6)	0,2967	7	46,7	2,4 (0,8-6,8)	0,1012

Relación de mutación de resistencia a INH con *clustering*

El análisis de *clustering* se realizó con los 302 aislamientos del grupo resistente a INH disponibles para RFLP IS6110. De estos, 203 (67,2%) resultaron en *cluster*. El *clustering* se asoció con mutación en el sitio *katG315* pero no con mutación en posición -15 del promotor *inhA*. La ausencia simultánea de ambas mutaciones se asoció negativamente con *clustering* (Tabla 9).

Tabla 9. Relación de los polimorfismos *katG315* e *inhA* (-15) con *clustering*

Polimorfismo	N	en <i>cluster</i>		OR (IC 95%)	<i>P</i>
		n	%		
<i>katG315</i> MUT	178	132	74,2	2,1 (1,3-3,4)	0,0035
<i>inhA</i> promoter -15 MUT	70	50	71,4	1,3 (0,7-2,3)	0,4296
<i>katG315</i> WT <i>inhA</i> (-15) WT	55	22	40	0,2 (0,1-0,4)	<0,0001
<i>katG315</i> MUT <i>inhA</i> (-15) MUT	1	-	-	-	-

DISCUSIÓN

La vasta mayoría de cepas de *M. tuberculosis* que circulan actualmente en las Américas, y en particular en América del Sur, pertenecen al linaje 4 Euro-Americano. Entre las diversas familias que integran este linaje, LAM es la más frecuente en la región, seguida por las familias T y Haarlem [Reynaud 2015]. En el presente estudio se demuestra que, en líneas generales, la estructura de población de *M. tuberculosis* en Argentina es similar a la del resto de América del Sur, con predominio de las familia T y LAM, las que presentan frecuencia similar, seguidas por la familia Haarlem.

La familia T se caracteriza por ser ubicua, heterogénea, y, en buena parte de los casos, brindar información filogenética escasa o ambigua. Sin embargo, dentro de esta familia se destacan ciertos genotipos con clara identidad. El más conspicuo es SIT53 T1 Ghana, que contiene todos los espaciadores de la región DR del linaje 4 Euro-Americano identificados por *spoligo*typing estándar y está ampliamente distribuido en el mundo. Este genotipo podría ser considerado el prototipo, y probablemente el precursor, del linaje Euro-Americano. En concordancia con el resto del mundo, SIT53 T1 Ghana fue el genotipo mayoritario de la familia T en la población de Argentina en nuestro estudio. Otro genotipo T con identidad propia es SIT159 T1 Tuscany, que, en contraste con T1 Ghana, se caracteriza por su afinidad geográfica restringida y su ambigüedad filogenética, *borderline* entre la familia T y la familia LAM [Abadia 2010, Reyes, 2012, Allix-Béguec 2008]. Argentina es uno de los pocos países, con Italia y Paraguay, que presentan frecuencia de T1 Tuscany mayor al 6% [SITVET WEB]. En el resto del mundo, este genotipo ocurre apenas en forma esporádica. En particular, en nuestro estudio, T1 Tuscany demostró estar ausente en las poblaciones de Bolivia, Chile, Perú, Colombia, Guyana, Suriname, Guiana Francesa y Venezuela, y estuvo representado por apenas uno de los 1991 aislamientos de la muestra de Brasil. Aún en la muestra de población de Argentina se observaron diferencias geográficas: T1 Tuscany estuvo restringido a Buenos Aires con excepción de un solo aislamiento de Jujuy. T1 Tuscany estuvo también representado en la selección de aislamientos resistentes de Argentina analizada en nuestro estudio, en este grupo también se mostró restringido geográficamente a la pampa húmeda. Esto último tiene relación con la afinidad geográfica de la cepa MDR autóctona denominada Rb, la tercera en frecuencia en nuestro país, observada con anterioridad por nuestro grupo de trabajo [Aíta 1996, Palmero 2000, Ritacco 2012].

A diferencia de la familia T, la familia LAM se concentra en América Latina y la región del Mediterráneo, como indica su nombre. Se asume que la alta frecuencia de esta familia en América Latina es consecuencia de la colonización de la región por España y Portugal y las

más recientes ondas migratorias procedente de países del sur de Europa. En nuestro estudio, el 22% de los genotipos LAM de Argentina correspondieron al clado LAM9, prototipo y probable ancestro de esta familia. Un estudio reciente reveló la estructura genética del clado LAM9, que puede ser dividida en dos subpoblaciones, LAMC1 y LAMC2. La subpoblación LAMC1 se encuentra principalmente en la región del Pacífico, es evolutivamente la más reciente y la de menor diversidad genética. La subpoblación LAMC2 predomina en la región del Atlántico y evolutivamente es más ancestral y diversa. Una proporción significativa de los aislamientos LAMC2 presenta la delección característica LAM-RD^{RIO} ancestral, caracterizada por el MIRU-VNTR12 (224226153321) [Reynaud 2015]. Las cepas con esta delección son las principales causantes de TB en Río de Janeiro, Brasil [Gomes 2011]. En este trabajo se confirmó la presencia del genotipo LAM-RD^{RIO} en Argentina con el hallazgo de un aislamiento *orphan* que presentó el MIRU-VNTR12 específico y otros 4 que presentaron un solo alelo diferente. Sin embargo, el SIT predominante de la familia LAM en la población de Argentina resultó ser SIT33 LAM3, presente en todo el país de manera más o menos homogénea. Este genotipo descende de la subpoblación LAMC2 pero carece de la delección LAM-RD^{RIO} y paradójicamente, según nuestros resultados y SITVIT WEB, predomina en países del Pacífico.

La familia Haarlem, tercera en frecuencia en nuestro país, tiene su origen en Europa y representa el 25% de los aislamientos de dicho continente, América Central y el Caribe. Nuestros resultados demostraron que, en líneas generales, la frecuencia de esta familia decrece desde la costa del Pacífico hacia la costa del Atlántico, excepto Chile, que presenta frecuencias menores de la familia Haarlem, similares a las de Buenos Aires, quizás debido a una composición étnica más diversa, con mayor componente migratorio del Mediterráneo. La alta frecuencia de la familia Haarlem en nuestra provincia de Jujuy, similar a la de Bolivia y Perú, es una muestra de la afinidad geográfica de los linajes de *M. tuberculosis*. Por otra parte, Jujuy presenta mucha menor diversidad genética que los otros distritos, en términos de familias, subfamilias y clados y también tiene menor proporción de genotipos huérfanos y no determinados, lo que indica una evolución más pausada de *M. tuberculosis*, además de una restringida movilidad de la población estable [Monteserin 2013].

Dentro de la familia Haarlem, el SIT2 H2 merece particular atención porque es el genotipo de nuestra cepa M de brote MDR. La reconstrucción de su evolución a través de cuatro décadas mostró que el clon progenitor del brote ya era MDR en 1973, y adquirió el *status* pre XDR hacia 1979, mucho antes de que los conceptos de TB MDR y TB XDR fueran acuñados [Eldholm 2015]. Sin embargo, a nivel global su distribución es muy restringida. Se la encontró con cierta frecuencia en el este de Europa, el Caribe, y Centroamérica (Tabla 7). En nuestro estudio, este SIT estuvo ausente o representado en forma esporádica (<0,5%) en los países de América del Sur analizados. Bolivia y Paraguay registraron situaciones similares. En

cada uno de ellos se detectaron dos aislamientos SIT2 H2, uno autóctono y pansensible con MIRU-VNTR diferente del de la cepa M, y el otro MDR con MIRU-VNTR 100% idéntico al de la cepa M. El paciente paraguayo con TB MDR por cepa M contrajo la infección en el hospital Muñiz y el boliviano viajaba con frecuencia a Argentina [Monteserin 2013; Candia 2007]. En esta tesis se confirmó la especificidad geográfica del genotipo H2 SIT2 tanto en América del Sur como en nuestro país. Asimismo, se comprobó que este genotipo está casi exclusivamente vinculado a la cepa M. En efecto, los resultados de nuestro estudio indican que su representación entre los aislamientos resistentes a INH es escasa y en los pansensibles es casi nula. En contraste, esta cepa tiene máxima representación en el grupo XDR. Además, el patrón RFLP IS6110 de la cepa M no coincide con ningún perfil en las bases de datos de genotipos MDR de España, Holanda y América Latina, lo que reconfirma su naturaleza autóctona [Ritacco 2012a, Ritacco 2012b].

La expansión de nuestra cepa M no es un fenómeno aislado en el mundo. Existen varios ejemplos de cepas similarmente exitosas, arraigadas en áreas geográficas restringidas, que muestran particular propensión a desarrollar resistencia a gran número de drogas y continúan transmitiéndose activamente en la comunidad, lo que las vuelve particularmente peligrosas para esa comunidad. Los ejemplos más conspicuos son la cepa de la familia LAM causante del mayor brote de TB-XDR en el mundo en Tugela Ferry de Sudáfrica, la cepa XDR Beijing atípica transmitida en Cabo del Este, también en Sudáfrica, y la cepa ECDC0002 de la familia Beijing en Europa, [Cohen 2015, Streicher 2015, de Beer 2015].

En nuestro trabajo, las familias S y X representan menos del 5% de los aislamientos investigados de América del Sur, a excepción de Paraguay que presentó una frecuencia llamativamente alta de genotipos S, originalmente descrito en Sicilia [Bonura 2014]. En concordancia con estudios previos, la familia Beijing, de tenue presencia en América del Sur, resultó mayormente representada en Perú probablemente como consecuencia de masiva inmigración de la comunidad china hacia fines del siglo XIX [Ritacco 2008, Monteserin 2011, Iwamoto 2012, Taype 2012, Barletta 2013]. Si bien en nuestro estudio la familia Beijing no estuvo representada, en Colombia, su presencia ha sido documentada en un nicho particular de ese país, el puerto de Buenaventura situado en la costa del Pacífico [Puerta 2015]. La presencia en Guyana y Surinam de linajes exóticos de origen asiático estaría relacionada con las relaciones históricas y comerciales de esos países con el lejano oriente [Streit 2014].

Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró por secuenciación genómica masiva que las dos cepas de *M. tuberculosis* MDR predominantes en Argentina presentan mutación *katGS315T* en virtual ausencia de mutación *inhA* [Eldholm 2014, Eldholm 2015]. En el presente trabajo demostramos que la mutación en *katG315* también predomina entre las cepas MDR y XDR menos exitosas que circulan en el país. También ponemos en evidencia

aquí que la co-ocurrencia de las dos mutaciones canónicas, *katG315* e *inhA* (-15) es altamente infrecuente. Un trabajo precursor destacó la asociación negativa entre *katG315* e *inhA* (-15) antes de que se dilucidara por completo el rol del promotor *inhA* en el mecanismo de resistencia a INH [Musser 1996]. Recientemente, otros estudios también han postulado de manera explícita esta asociación [Schaaf 2009, Hazbón 2006]. Hazbón et al. postularon que las mutaciones en *katG315* tienen bajo o nulo costo biológico y por lo tanto las cepas MDR con que las portan conservan intacta su habilidad para transmitirse. La ulterior adquisición de mutación en el promotor *inhA* ejercería un efecto de atenuación de la virulencia por lo que las cepas con doble mutación serían seleccionadas en contra en el proceso evolutivo. El hecho de que un solo aislamiento en nuestro estudio presente doble mutación avala esta hipótesis. Esta cepa con doble mutación presenta un patrón de RFLP IS6110 único en nuestra base de datos y en nuestro conocimiento no produjo casos secundarios.

Algunos estudios encontraron asociación de *katG315* MUT con resistencia a estreptomicina y etambutol o ambas [van Doorn 2006, Hazbón 2006, Huyen 2013]. Con una única excepción en el Reino Unido [Baker 2005], la mutación *katG315* se encontró asociada a TB MDR [van Soolingen 2000, Hazbón 2006, Huyen 2013, Fenner 2012]. En nuestro estudio, el incremento en la frecuencia de mutación *katG315* se correlacionó fuertemente con el incremento en el perfil de resistencia a drogas. Esto indica que los aislamientos que poseen la mutación *katG315* son más propensos a acumular mutaciones a otras drogas y a evolucionar hacia un perfil MDR/XDR más fácilmente que aquellos que permanecen con *katG315* WT. Contrariamente, debido a la asociación negativa entre ambas mutaciones, podemos concluir que las cepas que presentan la mutación en el promotor del gen *inhA* son menos propensas a acumular resistencia a drogas.

Datos clínicos y empíricos indican que cepas con diferente carga genética difieren en su habilidad para adquirir resistencia a drogas y causar enfermedad [Ford 2013]. En nuestro estudio, la mutación *katG315* se asoció fuertemente a la familia LAM, una observación que no es congruente con resultados de otros autores para América del Sur, probablemente por diferencias en la composición de las muestras [Dalla Costa 2009, de Freitas 2014]. En nuestro conocimiento, no hay reportes previos que describan la asociación del genotipo T1 Ghana con la ausencia de ambas mutaciones y del genotipo T1 Tuscany con la mutación *inhA* (-15). Nuestros resultados refuerzan la idea de que ciertos genotipos son más propensos que otros a desarrollar determinadas mutaciones de resistencia.

La mutación *katG315* se encontró asociada fuertemente a transmisión, hallazgo coherente con trabajos previos de Europa y Estados Unidos [van Doorn 2006, Gagneux 2006a, Fenner 2012]. Algunos autores sostienen que no solo las cepas con mutación en *katG315* son capaces de transmitirse en la comunidad, sino también aquellas que llevan la

mutación en el promotor *inhA* (-15) [Gagneux 2006a, Fenner 2012]. Nuestros resultados avalan en cierto modo esta idea. Las cepas con genotipo T1 Tuscany T1 Ghana que presentan mutación en el promotor del gen *inhA* forman parte de clusters conspicuos en nuestra población [Ritacco 2012]. En otras palabras, aunque no son altamente frecuentes, aún son capaces de diseminarse y acumular mutaciones de resistencia a drogas.

Este estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, la muestra no es totalmente representativa de nuestro país. Las provincias del sur y el oeste argentino no representan una pérdida grave porque su población local tiene niveles muy bajos de TB y en ella la enfermedad suelen ocurrir en migrantes del noroeste argentino o extranjeros. Lamentablemente, debido a obstáculos operativos, no pudimos analizar muestras de las provincias del noreste argentino, por lo que seguramente hemos perdido acceso a parte de diversidad genética de *M. tuberculosis* de Argentina. Sin embargo, consideramos que el Área Metropolitana de Buenos Aires refleja de un modo razonablemente fiel la composición de la población de *M. tuberculosis* de todo el territorio del país debido a las frecuentes y amplias migraciones internas. En segundo lugar, por razones de tiempo y recursos, no fue posible analizar todos los aislamientos resistentes a INH del período. Como cubrimos alrededor de un tercio del total de pacientes, y la selección fue aleatoria, consideramos que los resultados de nuestro análisis son válidos. En tercer lugar, no tuvimos oportunidad de emplear otros marcadores de diversidad genética más específicos, como SNPs y LSPs.

La clasificación filogenética en base al *spoligotyping* ha sido ampliamente objetada porque este marcador es vulnerable a homoplasia: es decir, distintas rutas evolutivas pueden converger en un mismo patrón [Comas 2009]. En algunos casos, el *spoligotyping* no resuelve la filiación, o lo hace incorrectamente. Aún así, la clasificación originada en este robusto marcador se mantiene hasta el presente con mínimas modificaciones, así como las connotaciones geográficas atribuidas originalmente a varios de los clados [Brudey 2006, Dos Vultos 2008, Abadia 2012, Reyes 2012, Bonura 2014]. Es más, recientemente se ha reconocido que, en la mayoría de los casos, el patrón de *spoligotyping* es concordante con los resultados de marcadores filogenéticos más precisos [Kato-Maeda 2011a]. Es cierto que, hoy en día, la amplia disponibilidad de secuenciación genómica masiva ha permitido definir un buen número de SNPs específicos de clados disponibles para la genotipia. En futuros estudios tendremos en cuenta estos nuevos marcadores que prometen revolucionar la clasificación filogenética de *M. tuberculosis* [Casali 2014, Coll 2014, Lanzas 2013]. Sin embargo, estas nuevas metodologías aún están en etapa de evaluación y, como todo procedimiento que implica amplificación de ADN, no están exentas de error por contaminación cruzada [Lusk 2014].

En síntesis, en Argentina, un aislamiento con el genotipo *katG315* MUT, además de ser portador de resistencia a INH, tiene mayor probabilidad de ser resistente a otras drogas y de ser transmitido de un paciente a otros que un aislamiento con el genotipo *katG315* WT. La mayor comprensión de la evolución de las cepas resistentes de *M. tuberculosis*, que son específicas de cada ámbito geográfico, es de enorme interés para la salud pública.

CONCLUSIONES

La vasta mayoría de los genotipos de cepas de *M. tuberculosis* circulando en Argentina pertenecen al linaje Euro-Americano.

Las principales familias que componen la estructura de población de nuestro país son T, LAM y Haarlem.

La frecuencia de clados y SITs es variable de acuerdo al área geográfica y al perfil de resistencia a drogas.

Los genotipos T1 Tuscany y H2 asociados a resistencia a drogas en nuestro país están representados en áreas muy restringidas en el resto del mundo.

El genotipo SIT2 H2 está sobrerrepresentado en los grupos MDR y/o XDR de nuestro país.

En Argentina ciertos genotipos son más proclives que otros a desarrollar resistencia y transmitirse como tales.

La presencia de mutación en *katG315* y la de mutación en *inhA* (-15) son mutuamente excluyentes.

Las cepas que presentan mutación *katG315* tienen mayor probabilidad de acumular ulterior resistencia que aquellas que presentan mutación en *inhA* (-15).

Las cepas que presentan mutación *katG315* tienen mayor probabilidad de estar en cluster que aquellas que presentan mutación en *inhA* (-15).

REFERENCIAS

- Abadia E, Zhang J, Dos Vultos T, Ritacco V, Kremer K, Akta E, Matsumoto T, Refregier G, van Soolingen D, Gicquel B, Sola C. Resolving lineage assignment on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput mlst 3R SNPs-based method. *Infect. Genet. Evol.* 2010; 10:1066-74.
- Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008; 62:53-70.
- Aita J, Barrera L, Reniero A, López B, Biglione J, Weisburd G, Rajmil J.C, Largacha C, Ritacco V. Hospital transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rosario, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 56: 48-50, 1996.
- Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46(8):2692-2699.
- Almeida Da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66:1417-30.
- Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(4):260-71.
- Aristimuño L, Armengol R, Cebollada A, España M, Guilarte A, Lafoz C, Lezcano MA, Revillo MJ, Martín C, Ramírez C, Rastogi N, Rojas J, de Salas AV, Sola C, Samper S. Molecular characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. *BMC Microbiol.* 2006 Oct 10; 6:90.
- Barletta F, Otero L, Collantes J, Asto B, de Jong BC, Seas C, Rigouts L. Genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-Eastern part of Lima, Peru. *BMC Infect. Dis.* 2013 Aug 28;13:397.
- Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349:1149-56.
- Barrera L. The basics of clinical bacteriology. *Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care.* Ed: Palomino JC, Ritacco V & Leao SC. Disponible en: <http://www.pneumo-iasi.ro/student/tuberculosis2007.pdf> (consultado septiembre 2014).
- Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD, Drobniewski FA. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from

- England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC* -46A polymorphism. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2005 Apr;49(4):1455-64.
- Berg S, Kaur D, Jackson M, Brennan PJ. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology.* 2007; 17:35-56R.
 - Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh SL, Shopsis B, Tempalski B, Driscoll J, Frothingham R, Musser JM, Alcibes P, Kreiswirth BN. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *J. Am. Med. Assoc.* 1999; 282:2321-7.
 - Blázquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, Martín C, Guerrero A, Cobo J, van Embden J, Baquer F, Gómez-Mampaso E. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:1390-3.
 - Bonura C, Mammina C, Refregier G, Sola C. The reconstruction of the *Mycobacterium tuberculosis* "S" family history using Sicily as a start point. What did we learn from 20 years of spoligotyping VNTR and SNP typing? *35th Congress of the European Society of Mycobacteriology 2014*, 29 Jun - 2 Jul 2014, P222. <http://f1000.com/posters/browse/summary/1096313>.(consulta octubre 2014).
 - Borrell S, Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:815-20.
 - Böttger EC, Springer B, Pletschette M, Sander P. Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. *Nat. Med.* 1998; 4:1343-4.
 - Brudey K, Driscoll J, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SAM, Allix C, Aristimuno L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival, GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ly HM, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim MZ, Rasolofoa-Razanamparany V, Rasolonalona T, Rossetti ML, Rüsche-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce R, Van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren R, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, Population Genetics, and Epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006; 6:23.

- Candia N, Lopez B, Zozio T, Carrivale M, Diaz C, Russomando G, de Romero NJ, Jara JC, Barrera L, Rastogi N, Ritacco V. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. BMC. Microbiol. 2007 Aug 8;7:75
- Cardoso-Leão S & Portaels F. History. Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care. Ed: Palomino JC, Ritacco V & Leao SC. Disponible en: <http://www.pneumologia.ro/student/tuberculosis> 2007.pdf (consulta septiembre 2014)
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drugresistant tuberculosis in a Russian population. Nat Genet 2014;46:279–86.
- Chia BS, Lanzas F, Rifat D, Herrera A, Kim EY, Sailer C, Torres-Chavolla E, Narayanaswamy P, Einarsson V, Bravo J, Ioerger TR, Sacchettini JC, Karakousis PC. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. PloS One. 2012; 7(7):e40456.
- Coll F, McNERNEY R, Guerra-Assunção JA, Glynn JR, Perdigão J, Viveiros M, Portugal I, Pain A, Martin N, Clark TG. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Nat. Commun. 2014; 5:4812.
- Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, Walker BJ, Bantubani N, Almeida DV, Alvarado L, Chapman SB, Mvelase NR, Duffy EY, Fitzgerald MG, Govender P, Gujja S, Hamilton S, Howarth C, Larimer JD, Maharaj K, Pearson MD, Priest ME, Zeng Q, Padayatchi N, Grosset J, Young SK, Wortman J, Mlisana KP, O'Donnell MR, Birren BW, Bishai WR, Pym AS, Earl AM. Evolution of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis over Four Decades: Whole Genome Sequencing and Dating Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from KwaZulu-Natal. PLoS Med. 2015 Sep 29;12(9):e1001880
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PLoS One. 2009 12;4(11):e7815.
- Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PE, Fonseca Lde S, Ho JL, Kritski AL, Rossetti ML. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. BMC. Microbiol. 2009 Feb 19;9:39.
- Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for

- studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infect. Genet. Evol. 2012;12(4):755-66.
- de Beer JL, Bergval I, Schuitema A, Anthony R, Fauville-Dufaux M, Ferro B, Ritacco V, van Ingen J, Zomer A, van Soolingen D. A unique mutation in the rpoC-gene exclusively detected in *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the largest cluster of multidrug resistant cases of the Beijing genotype in Europe. Infect. Genet. Evol. (enviado diciembre 2015).
 - de Freitas FA, Bernardo V, Gomgnimbou MK, Sola C, Siqueira HR, Pereira MA, Fandinho FC, Gomes H5, Araújo ME, Suffys PN, Marques EA, Albano RM. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective katG and rpoB mutation profile analysis in isolates from a reference center in Brazil. PLoS One. 2014 Aug 5;9(8):e104100.
 - de Souza MVN, Ferreira M de L, Pinheiro AC, Saraiva MF, de Almeida MV, Valle MS. Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*. Scientific World Journal. 2008; 8:720-51.
 - Dos Vultos T, Mestre O, Rauzier J, Golec M, Rastogi N, Rasolofo V, Tonjum T, Sola C, Matic I, Gicquel B. Evolution and Diversity of Clonal Bacteria: The Paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE 2008. 3:e1538.
 - Eldholm V, Monteserin J, Rieux A, Lopez B, Sobkowiak B, Caugant D, Ritacco V, Balloux F. Strain responsible for major ongoing tuberculosis outbreak in Argentina was resistant to six drugs by 1979. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark, 25-28 April 2015. <http://f1000research.com/posters/1097739> (Consultado noviembre 2015)
 - Eldholm V, Monteserin J, Rieux A, Lopez B, Sobkowiak B, Ritacco V, Balloux F. Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. Nat Commun. 2015 11;6:7119
 - Fenner L, Egger M, Bodmer T, Altpeter E, Zwahlen M, Jatton K, Pfyffer GE, Borrell S, Dubuis O, Bruderer T, Siegrist HH, Furrer H, Calmy A, Fehr J, Stalder JM, Ninet B, Böttger EC, Gagneux S; Swiss HIV Cohort Study and the Swiss Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study Group. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents. Chemother. 2012; 56:3047-53.
 - Fenton MJ & Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. Infect. Immun. 1996; 64:683-90.
 - Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, Johnston JC, Gardy J, Lipsitch M, Fortune SM. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from

- different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat. Genet.* 2013; 45:784-90.
- Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006a; 103:2869-73.
 - Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannon BJ. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2006b; 312:1944-6.
 - Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Encisco A, Muñoz S, Hopewell PC, Small PM, Pym AS. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2006c; 2: e61.
 - Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet.* 2006; 4;368(9547):1575-80.
 - Gomes HM, Elias AR, Oelemann MA, Pereira MA, Montes FF, Marsico AG, Kritski AL, Filho Ldos A, Caldas PC, Possuelo LG, Cafrune P, Rossetti ML, Lucena N, Saad MH, Cavalcanti HR, Leite CQ, de Brito RC, Lopes ML, Lima K, Souza M, Trindade Rde C, Zozio T, Sola C, Rastogi N, Suffys PN. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 2012 Jun;12(4):649-56
 - Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, García-García L, León CI, Bose M, Chaves F, Murray M, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J, Cave MD, Ponce de León A, Alland D. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2006 Aug;50(8):2640-9.
 - Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 6;101(14):4871-4876.
 - Huyen MN, Cobelens FG, Buu TN, Lan NT, Dung NH, Kremer K, Tiemersma EW, van Soolingen D. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Aug;57(8):3620-7.

- Imperiale BR, Cataldi AA, Morcillo NS. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(4):496-501.
- Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore DA, Gilman RH. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *PLoS One.* 2012;7(11):e49651. doi: 10.1371/journal.pone.0049651. Epub 2012 Nov 21
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:907-14.
- Kato-Maeda M, Gagneux S, Flores LL, Kim EY, Small PM, Desmond EP, Hopewell PC. Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis*: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2011a; 15(1):131-3.
- Kato-Maeda M, Metcalfe JZ, Flores L. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. *Future Microbiol.* 2011b; 6: 203-16.
- Kaur D, Guerin ME, Skovierová H, Brennan PJ, Jackson M. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 2009; 69: 23-78.
- Lanzas F, Karakousis PC, Sacchettini JC, Ioerger TR. Multidrug-resistant tuberculosis in Panama is driven by clonal expansion of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain related to the KZN extensively drug-resistant *M. tuberculosis* strain from South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51:3277-85.
- Lusk RW. Diverse and widespread contamination evident in the unmapped depths of high throughput sequencing data. *PLOS One.* 2014; 9: e110808.
- Martin A & Portaels F. Drug resistance and drug resistance detection. *Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care.* Ed: Palomino JC, Ritacco V & Leao SC. Disponible en: <http://www.pneumo-iasi.ro/student/tuberculosis2007.pdf> (consulta septiembre 2014).
- Monteserin J, Etchart A, Reniero A, López B, Ritacco V. Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in two geographically distant areas of Argentina. 34th Annual Congress European Society of Mycobacteriology. Florence, Italy, 30 jun-3 jul 2013. <http://f1000.com/posters/browse/summary/1094113>, <http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/florence.pdf> (consulta noviembre 2015).

- Monteserin J, Charchaffie A, Gravina E, Vasquez L, Ritacco V. GENETIC DIVERSITY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN LIMA, PERU. Lübeck, Germany julio 2011. <http://f1000research.com/posters/1098362> (Consultado noviembre 2015).
- Monteserin J, Camacho M, Barrera L, Palomino JC, Ritacco V, Martin A. Genotypes of Mycobacterium tuberculosis in patients at risk of drug resistance in Bolivia. Infect. Genet. Evol. 2013 Jul;17:195-201.
- Monteserin J. Polimorfismos *katG315* de *Mycobacterium tuberculosis*. Asociación con resistencia a múltiples drogas, carga genética preexistente, y transmisión de la enfermedad en Argentina. Tesis de maestría, diciembre 2014.
- Morandi M, Sali M, Manganelli R, Delogu G. Exploiting the mycobacterial cell wall to design improved vaccines against tuberculosis. J. Infect. Dev. Ctries. 2013; 7:169-81.
- Müller B, Chihota VN, Pillay M, Klopper M, Streicher EM, Coetzee G, Trollip A, Hayes C, Bosman ME, Gey van Pittius NC, Victor TC, Gagneux S, van Helden PD, Warren RM. Programmatically selected multidrug-resistant strains drive the emergence of extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa. PLoS One. 2013; 23;8 (8):e70919.
- Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JD. 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. J Infect Dis. 1996 Jan;173(1):196-202.
- Palmero D, Ritacco V, Ambroggi M, Poggi S, Güemes Gurtubay J, Alberti F, Waisman J. Multidrug-resistant tuberculosis in AIDS patients at the beginning of the millennium. Medicina (Buenos Aires) 2006; 66:399–404.
- Palmero D, Ritacco V, Ruano S, Ambroggi M, Cusmano L, Romano M, Bucci Z, Waisman J. Multidrug-resistant tuberculosis outbreak among transvestite sex workers, Buenos Aires, Argentina. Int J Tuberc Lung Dis. 2005 Oct;9(10):1168-70
- Palmero DJ, Simboli N, Alberti FA, Francos JL, Güemes Gurtubay JL, Ochoa EJ, Cardozo L, Waisman JL. Coxitis due to multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a HIV negative patient. Medicina (B Aires). 2000;60(3):357-60. Review. Spanish.
- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. Lancet Infect. Dis. 2010; 10(2):103-111.
- Puerto G, Erazo L, Wintaco M, Castro C, Ribón W, Guerrero MI. *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes Determined by Spoligotyping to Be Circulating in Colombia

- between 1999 and 2012 and Their Possible Associations with Transmission and Susceptibility to First-Line Drugs. PLoS One. 2015 Jun 11;10(6):e0124308
- Reed MB, Pichler VK, McIntosh F, Mattia A, Fallow A, Masala S, Domenech P, Zwerling A, Thibert L, Menzies D, Schwartzman K, Behr MA. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. J. Clin. Microbiol. 2009. 47:1119-28.
 - Reyes A, Sandoval A, Cubillos-Ruiz A, Varley KE, Hernández-Neuta I, Samper S, Martín C, García MJ, Ritacco V, López L, Robledo J, Zambrano MM, Mitra RD, Del Portillo P. IS-seq: a novel high throughput survey of in vivo IS6110 transposition in multiple *Mycobacterium tuberculosis* genomes. BMC Genomics. 2012; 13:249.
 - Reynaud Y, Millet J, Rastogi N. Genetic Structuration, Demography and Evolutionary History of *Mycobacterium tuberculosis* LAM9 Sublineage in the Americas as Two Distinct Subpopulations Revealed by Bayesian Analyses. PLoS One. 2015 Oct 30;10(10):e0140911
 - Ritacco V, Iglesias MJ, Ferrazoli L, Monteserin J, Dalla Costa ER, Cebollada A, Morcillo N, Robledo J, de Waard JH, Araya P, Aristimuño L, Díaz R, Gavin P, Imperiale B, Simonsen V, Zapata EM, Jiménez MS, Rossetti ML, Martin C, Barrera L, Samper S. Conspicuous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. Infect. Genet. Evol. 2012a;12(4):711-7.
 - Ritacco V, López B, Ambroggi M, Palmero D, Salvadores B, Gravina E, Mazzeo E, National TB Laboratory Network, Imaz S, Barrera L. HIV infection and geographically bound transmission of drug-resistant tuberculosis, Argentina. Emerg. Infect. Dis. 2012b; 18: 1802-10.
 - Ritacco V & Kantor I. LA TUBERCULOSIS A 110 AÑOS DEL PREMIO NOBEL DE KOCH. Rev. MEDICINA (Buenos Aires) 2015; 75: 00-00
 - Ritacco V, López B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N, Vásquez L, Realpe T, Fernández J, Lima KV, Zurita J, Robledo J, Rossetti ML, Kritski AL, Telles MA, Palomino JC, Heersma H, van Soolingen D, Kremer K, Barrera L. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008 Aug;103(5):489-92
 - Samper S, Martín C. Spread of extensively drug-resistant tuberculosis. Emerg. Infect. Dis. 2007; 13(4): 647-48.
 - Samper S, Martín C, Pinedo A, Rivero A, Blázquez J, Baquero F, van Soolingen D, van Embden J. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. AIDS Lond. Engl. 1997; 11:1237-42.

- Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. PLoS One. 2015 Mar 23;10(3):e0119628
- Schaaf HS, Moll AP, Dheda K. Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis in Africa and South America: epidemiology, diagnosis and management in adults and children. Clin. Chest. Med. 2009 Dec;30(4):667-83, vii-viii.
- Senol G. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis-Latest Diagnostic Tools. Tuberculosis-Current Issues in Diagnosis and Management. Ed Mahboub B. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/tuberculosis-current-issues-in-diagnosis-and-management/laboratory-diagnosis-of-tuberculosis-latest-diagnostic-tools> (consulta septiembre 2014).
- Streicher EM, Sampson SL, Dheda K, Dolby T, Simpson JA, Victor TC, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM. Molecular Epidemiological Interpretation of the Epidemic of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in South Africa. J. Clin. Microbiol. 2015 Nov;53(11):3650-3.
- Streit E, Baboolal S, Akpaka PE, Millet J, Rastogi N. Finer characterization of *Mycobacterium tuberculosis* using spoligotyping and 15-loci MIRU-VNTRs reveals phylogeographical specificities of isolates circulating in Guyana and Suriname. Infect. Genet. Evol. 2015 Mar;30:114-9.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4498-510.
- Taype CA, Agapito JC, Accinelli RA, Espinoza JR, Godreuil S, Goodman SJ, Bañuls AL, Shaw MA. Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. Infect. Genet. Evol. 2012 Apr;12(3):577-85.
- Tessema B, Beer J, Merker M, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC, Niemann S. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. BMC. Infect. Dis. 2013 Mar 11;13:131.
- Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S. Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. Drugs. 2014; 74:1063-72.
- van Doorn HR, de Haas PE, Kremer K, Vandenbroucke-Grauls CM, Borgdorff MW, van Soolingen D. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

- strains with a mutation at amino-acid position 315 of katG: a decade of experience in The Netherlands. Clin. Microbiol. Infect. 2006; 12: 769-775.
- van Doorn HR, Kuijpe, EJ, van der Ende A, Welten AG, van Soolingen D, de Haas PE, Dankert J. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg->Leu mutation at codon 463 of katG are not associated. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 1591-94.
 - van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 406-9.
 - van Soolingen D, Hermans PW, de Haas P, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29; 11 2578-86.
 - van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. J. Infect. Dis. 2000; 182(6): 1788-90.
 - Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen, D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic. Acids. Res. 2010, 38 Suppl:W326-331.
 - World Health Organization. 2009. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis—4th ed. WHO/HTM/TB/2009.422.
 - World Health Organization 2015. WHO Global Tuberculosis Report 2015.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1a. Mezclas de reacción utilizadas para amplificar los 15 VNTRs principales

MIRUs-VNTRs principales	µl	locus	Alias	Tamaño en pares de bases	Primers (5'-3')
Mezcla de reacción 1					
H ₂ O	9,12				
Buffer 10X	2				
Solución Q 5X	4	580	MIRU 4; ETR D	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC
MgCl ₂ 25 mM	1,2				GCGCAGCAGAAACGCCAGC
dNTPs 5mM	0,8	2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC
Primers 20 pmol/µl (c/u)	0,4				CATAGGCGACCAGGCGAATAG
HotStartTaq polimerasa	0,08	802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT
ADN (2 ng)	2				GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
Mezcla de reacción 2					
H ₂ O	9,92				
Buffer 10X	2	960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC
Solución Q 5X	4				GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MgCl ₂ 25 mM	0,4	1644	MIRU 16	53	TCCGGTATCGGGTCCAGTCCAAGTA
dNTPs 5mM	0,8				CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
Primers 20 pmol/µl (c/u)	0,4	3192	MIRU 31; ETR E	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA
HotStartTaq polimerasa	0,08				GTGCCGACGTGGTCTTGAT
ADN (2 ng)	2				
Mezcla de reacción 3					
H ₂ O	10,32				
Buffer 10X	2	424	Mtub04	51	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT
Solución Q 5X	4				GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
MgCl ₂ 25 mM	0	577	ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT
dNTPs 5mM	0,8				AATGACTTGAACGCGCAAAATTGTGA
Primers 20 pmol/µl (c/u)	0,4	2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT
HotStartTaq polimerasa	0,08				CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT
ADN (2 ng)	2				
Mezcla de reacción 4					
H ₂ O	9,12				
Buffer 10X	2	2401	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT
Solución Q 5X	4				ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
MgCl ₂ 25 mM	1,2	3690	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC
dNTPs 5mM	0,8				TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
Primers 20 pmol/µl (c/u)	0,4	4156	QUB-4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT
HotStartTaq polimerasa	0,08				GCCGGCGTCCATGTT
ADN (2 ng)	2				
Mezcla de reacción 5					
H ₂ O	10,32				
Buffer 10X	2	2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG
Solución Q 5X	4				CGAAGTGAATGGTGGCAT
MgCl ₂ 25 mM	0	1955	Mtub21	57	AGATCCCAGTTGTGTCGTC
dNTPs 5mM	0,8				CAACATCGCCTGGTTCTGTA
Primers 20 pmol/µl(c/u)	0,4	4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT
HotStartTaq polimerasa	0,08				CGGCCGTGCCGGCCAGGTCTTCCCC
ADN (2 ng)	2				

Tabla S1b. Mezclas de reacción utilizada para amplificar los 9 VNTRs auxiliares

MIRUs-VNTRs auxiliares	μ l	locus	Alias	Tamaño en pares	Primers (5'-3')
Mezcla de reacción 6					
H ₂ O	9,52				
Buffer 10X	2	154	MIRU 26	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT
Solución Q 5X	4				TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
MgCl ₂ 25 mM	0,8	2531	MIRU 23	53	CTGTTCGATGGCCGCAACAAAACG
dNTPs 5mM	0,8				AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC
Primers 20 pmol/ μ l (c/u)	0,4	4348	MIRU 39	53	AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC
HotStartTaq polimerasa	0,08				CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC
ADN (2 ng)	2				
Mezcla de reacción 7					
H ₂ O	10,32				
Buffer 10X	2	2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG
Solución Q 5X	4				GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MgCl ₂ 25 mM	0	2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT
dNTPs 5mM	0,8				GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
Primers 20 pmol/ μ l (c/u)	0,4	3007	MIRU 27; QUB-5	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA
HotStartTaq polimerasa	0,08				GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
ADN (2 ng)	2				
Mezcla de reacción 8					
H ₂ O	9,92				
Buffer 10X	2	2347	Mtub29	57	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT
Solución Q 5X	4				AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
MgCl ₂ 25 mM	0,4	2461	ETR B	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT
dNTPs 5mM	0,8				CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
Primers 20 pmol/ μ l (c/u)	0,4	3171	Mtub34	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA
HotStartTaq polimerasa	0,08				GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC
ADN (2 ng)	2				

Tabla S2. Número de copias de cada VNTR de acuerdo al tamaño del producto de amplificación

Locus	154	424	577	580	802	960	1644	1955	2059	2163	2165	2347	2401	2461	2531	2687	2996	3007	3171	3192	3690	4052	4156	4348	
Allele																									
0	402	537	171	175	354	482	565	116	437	67	195	335	252	347	150	395	285	498	326	492	272	153	563	540	
1	455	588	208	252	408	537	618	149	514	136	270	392	305	404	200	447	336	551	380	545	330	264	622	593	
2	508	639	266	329	462	590	671	206	591	205	345	449	363	461	253	501	387	604	434	598	388	375	681	646	
3	561	690	324	406	516	643	724	263	668	274	420	506	421	518	306	555	438	657	488	651	446	486	740	699	
4	614	741	382	483	570	696	777	320	745	343	495	563	479	575	359	609	489	710	542	704	504	597	799	752	
5	667	792	440	560	624	749	830	377	822	412	570	620	537	632	412	663	540	763	596	757	562	708	858	805	
6	720	843	498	637	678	802	883	434	899	481	645	677	595	689	465	717	591	816	650	810	620	819	917	858	
7	773	894	556	714	732	855	936	491	976	550	720	734	653	746	518	771	642	869	704	863	678	930	976	911	
8	826	945	614	791	786	908	989	548	1053	619	795	791	711	803	571	825	693	922	758	916	736	1041	1035	964	
9	879	996	672	868	840	961	1042	605	1130	688	870	848	769	860	624	879	744	975	812	969	794	1152	1094	1017	
10	932	1047	730	945	894	1014	1095	662	1207	757	945	905	827	917	677	933	795	1028	866	1022	852	1263	1153	1070	
11	985	1098	788	1022	948	1067	1148	719	1284	826	1020	962	885	974	730	987	846	1081	920	1075	910	1374	1212	1123	
12	1038	1149	846	1099	1002	1120	1201	776	1361	895	1095	1019	943	1031	783	1041	897	1134	974	1128	968	1485	1271	1176	
13	1091	1200	904	1176	1056	1173	1254	833	1438	964	1170	1076	1001	1088	836	1095	948	1187	1028	1181	1026	1596	1330	1229	
14	1144	1251	962	1253	1110	1226	1307	890	1515	1033	1245	1133	1059	1145	889	1149	999	1240	1082	1234	1084	1707	1389	1282	
15	1197	1302	1020	1330	1164	1279	1360	947	1592	1102	1320	1190	1117	1202	942	1203	1050	1293	1136	1287	1142	1818	1448	1335	

alelos variables en el *locus* 580 (cepas H37Rv, H37Ra, BCG y menos del 1% de los aislamientos clínicos)

Allele	alias	580
0'	0s	122
1'	1s	199
2'	2s	276
3'	3s	353
4'	4s	430
5'	5s	507
6'	6s	584
7'	7s	661
8'	8s	738
9'	9s	815

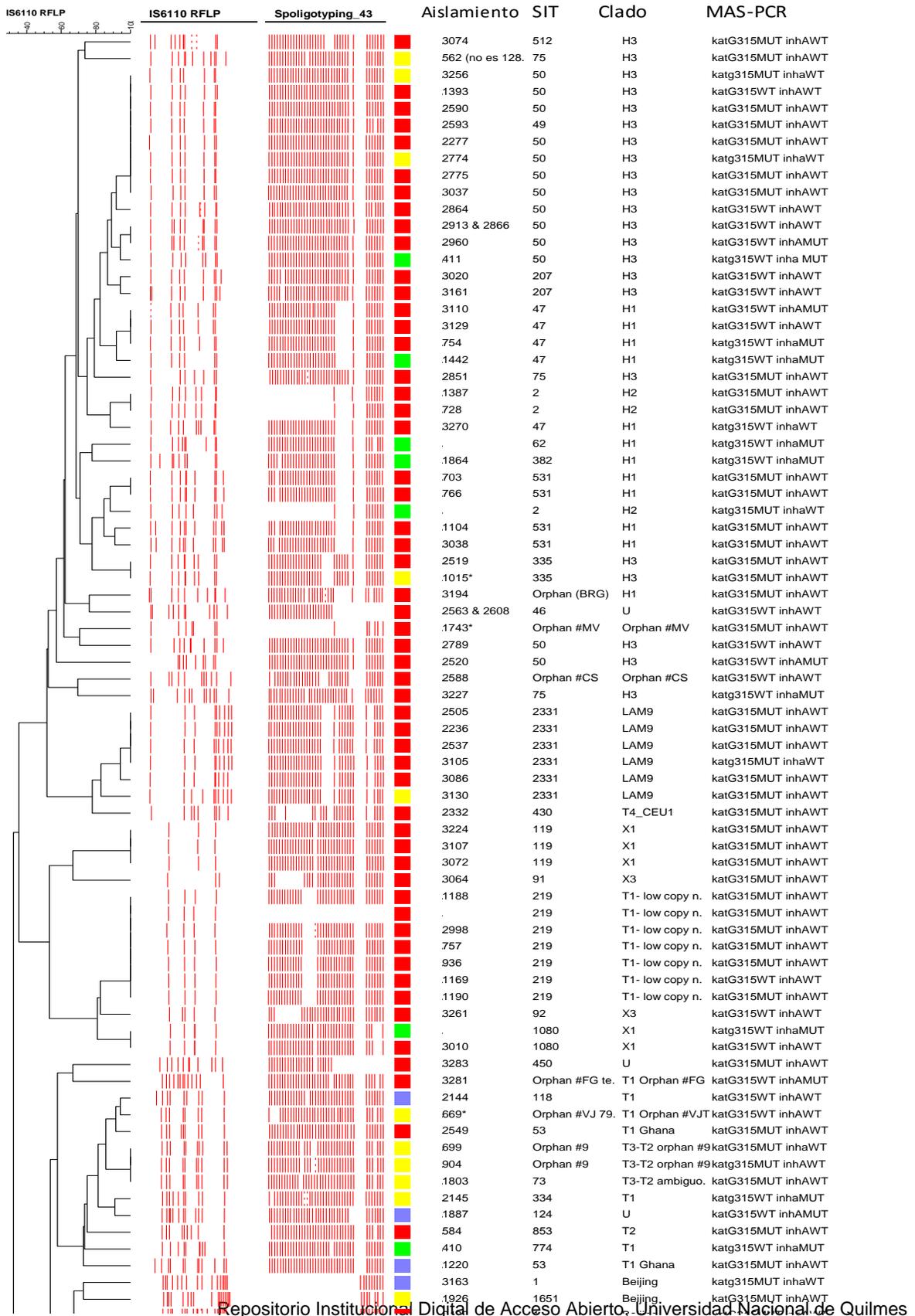
Tabla S7. Relación de los polimorfismos de resistencia a INH y clados

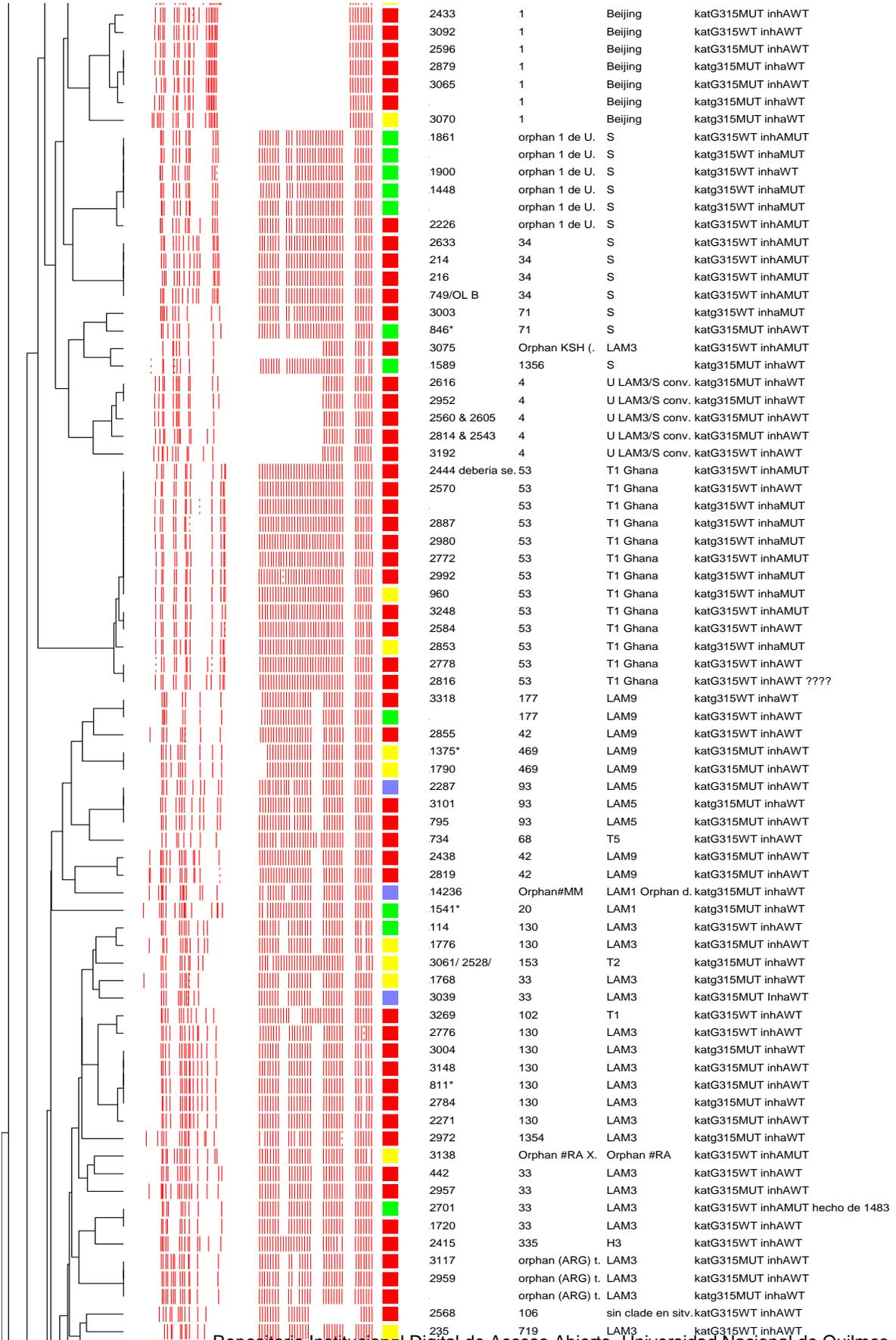
Clado	N° of	<i>katG</i> 315 MUT		OR IC 95%	<i>P</i>	<i>inhA</i> (-15) MUT		OR IC 95%	<i>P</i>
		n	%			n	%		
T1 Tuscany	24	2	8.3	0,1 (0,02-0,3)	0.0004	19	79.2	11,9 (4.3-32.8)	<0.0001

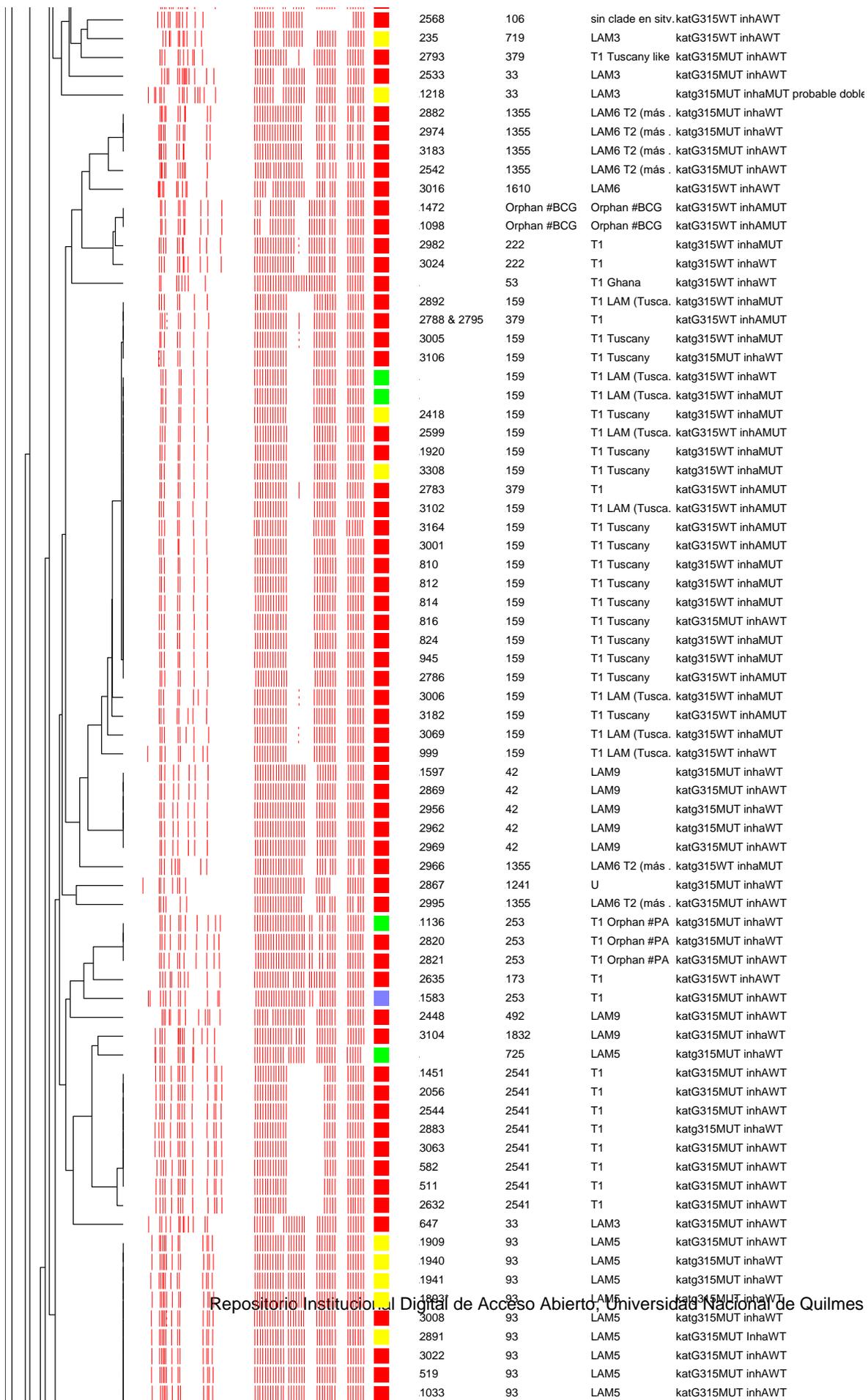
Tabla S8. Relación de los polimorfismos de resistencia a INH y clados

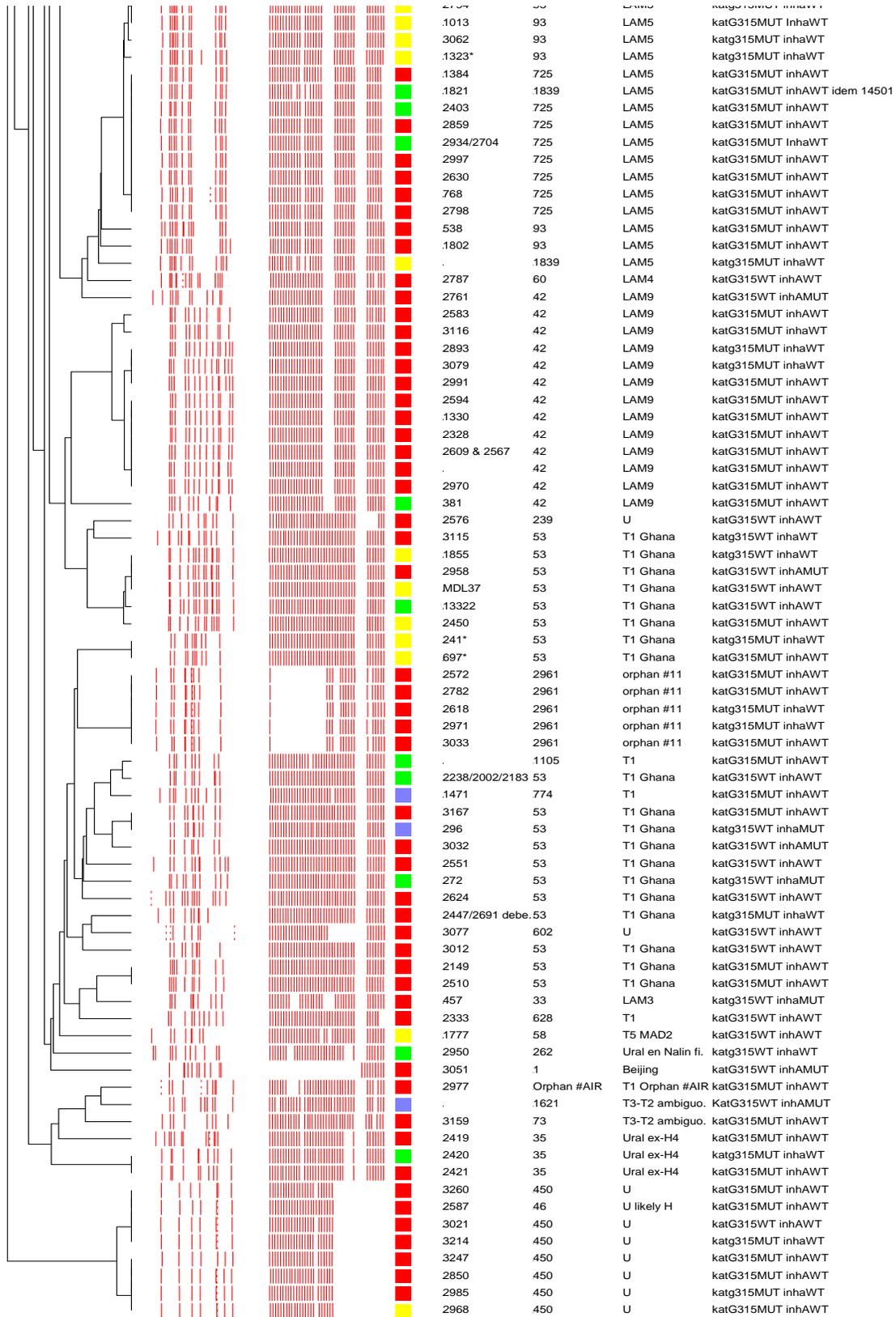
Clado	N° of	<i>katG</i> 315 WT		OR IC 95%	<i>P</i>
		n	%		
T1 Ghana	45	17	37.8	3,0 (1,5-5,89)	0.0012

Figura S1. Dendrograma obtenido con el software BioNumerics v 5.1 según RFLP 6110 y spoligotipo de 302 aislamientos resistentes a INH









■ INH resistente
 ■ MDR
 ■ XDR