

Maestría en Microbiología Molecular
ANLIS / Universidad Nacional de San Martín
(8va. cohorte 2012)

Tesis de Maestría

Polimorfismos *katG315* de *Mycobacterium tuberculosis*.
Asociación con resistencia a múltiples drogas,
carga genética preexistente,
y transmisión de la enfermedad en Argentina

Alumna: Licenciada en Biotecnología Johana Monteserin

Directora: Dra. Viviana Ritacco

2014

Agradecimientos

Quiero darle las gracias de todo corazón a Viviana, por educarme en el pensamiento científico, por compartir todo su conocimiento conmigo y por su invaluable dedicación hacia mí. Gracias Viv, por brindarme tu confianza, por trasmitirme esta pasión que me llena de entusiasmo.

A mis compañeros de TBC, quiero agradecerles el día a día, los buenos momentos compartidos. Por estar siempre dispuestos a ayudarme y colaborar desinteresadamente. Especialmente quiero decir gracias a Bety y Roxana, por brindarme su tiempo, la asistencia y su infinita paciencia. A “los Masciotra” por su generosidad. A Eli Gravina, por las alegres tardes de trabajo y por dejarme aprender de su experiencia. A Belén por regalarme su amistad y apoyo constante.

Agradezco a Anandi y Juan Carlos, por cederme el valioso tiempo belga para que pueda cumplir este objetivo.

A mis compañeros de BC, gracias por hacerme sentir una más, por su buena onda. Gracias Clau por permitirme flexibilidad horaria que también posibilitó terminar este trabajo.

A mis queridas amigas Lai, Anto, Gise y Ana. A mis amigos de Santa Fe y del running por bancarme siempre y hacer mi vida más divertida.

Infinitas gracias a mis padres y a mi hermana, porque son mi sostén incondicional, sobre todo en este año tan lindo y exigido. Gracias por darme la libertad de elegir mi camino y alentarme a mirar siempre para adelante.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Historia de la tuberculosis	9
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
La situación de la TB en el mundo	15
TB en Argentina	16
El problema de la TB multirresistente (TB MDR) en el mundo	16
Brotos epidémicos de TB MDR/XDR en el mundo	18
Transmisión epidémica de TB MDR en Argentina	19
Genotipificación	19
Mecanismos de resistencia a INH	21
Detección fenotípica y genotípica de resistencia a INH	23
Antecedentes del tema	24
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Diseño del estudio	29
Muestras	29
Extracción del ADN	31

Detección de mutación <i>katG</i> 315 mediante REA-315	31
Genotipificación de los aislamientos	33
<i>Spoligotyping</i>	33
RFLP IS6110	34
Análisis computarizado de genotipos	34
Análisis estadístico	35
RESULTADOS	37
Validación de REA-315	38
Desempeño en cepas secuenciadas	38
Desempeño en aislamientos clínicos sensibles a INH	38
Polimorfismos <i>katG</i>315 en aislamientos clínicos resistentes a INH	39
Relación de genotipos <i>katG</i> con perfiles de resistencia a drogas	39
Relación de genotipos <i>katG</i> con familias y clados de <i>M. tuberculosis</i>	40
Relación de genotipos <i>katG</i> con transmisión de TB resistente	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	5353
MATERIAL SUPLEMENTARIO	60

ABREVIATURAS

- AC:** Antes de Cristo
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- BCG:** Bacilo Calmette Guérin
- pb:** pares de bases
- CIM:** concentración inhibitoria mínima
- CMTB:** complejo *M. tuberculosis*
- CRISPRs:** *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- DC:** después de Cristo
- DR:** (*direct repeat*) repetición directa
- EMB:** etambutol
- INH:** isoniacida
- inhA*:** gen que codifica la proteína InhA (enoil ACP reductasa)
- IS:** (*insertion sequence*) secuencia de inserción
- LPSs:** (*large sequence polymorphisms*) polimorfismos de secuencia larga
- MIRUs:** (*mycobacterial interspersed repetitive units*) unidades micobacterianas repetidas intercaladas
- MUT:** (*mutated type*) genotipo mutado
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PGRSs:** (*polymorphic GC-rich repetitive sequences*) secuencias polimórficas ricas en G+C
- PPD:** derivado proteico purificado
- PZA:** pirazinamida
- REA:** (*restriction enzyme analysis*) análisis de restricción enzimática
- RFLP:** restriction fragment length polymorphism
- RIF:** rifampicina
- SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- SM:** estreptomicina
- SNPs:** (*single nucleotide polymorphisms*) polimorfismos de un solo nucleótido
- TB:** tuberculosis
- TB MDR:** tuberculosis multirresistente (resistente al menos a isoniacida 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 tandem de número variable
- WT:** (*wild type*) genotipo salvaje

RESUMEN

La mutación en posición 315 del gen *katG* de *Mycobacterium tuberculosis* confiere resistencia a isoniacida (INH), la cual define tuberculosis multirresistente (TB MDR) cuando se asocia a resistencia a rifampicina (RIF). En países del hemisferio norte, el genotipo *katG315* MUT se asocia a TB MDR y a transmisión de la TB. No hay información al respecto procedente de Argentina, país en el que la TB MDR se ha transmitido en forma epidémica durante casi dos décadas. En este trabajo se aplicó análisis de restricción enzimática (REA: *restriction enzyme analysis*) a la investigación de polimorfismos *katG315* en 540 aislamientos *M. tuberculosis* resistentes a INH obtenidos de igual número de pacientes en Argentina, 2003-2012. Los aislamientos eran representativos de tres perfiles fenotípicos de resistencia a drogas: resistentes a INH no MDR, MDR y con resistencia extendida (XDR). Un aislamiento MDR fue clasificado como XDR cuando presentaba resistencia adicional al menos a una fluoroquinolona y a una droga inyectable de segunda línea. Se investigó la relación del genotipo *katG315* MUT con: (i) el perfil fenotípico de resistencia a drogas, (ii) la carga genética preexistente medida según *spoligotipo* asignado en SITVIT WEB http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/, y (iii) la transmisión de la TB drogorresistente medida como *clustering* por RFLP IS6110. La mutación *katG315* resultó presente en 371 (68,7%) del total de aislamientos resistentes a INH. La frecuencia de *katG315* MUT aumentó en relación a los perfiles crecientes de drogorresistencia (χ^2 de tendencia 52,124 $p < 0,0001$). La asociación entre *katG315* MUT y carga genética preexistente se analizó en presencia y en ausencia de las cepas autóctonas M y Ra, las dos cepas MDR predominantes en nuestro país. Se observó una fuerte asociación del genotipo *katG315* MUT con H2 y LAM3, los clados filogenéticos que contienen a esas dos cepas epidémicas de Argentina ($< 0,0001$). En presencia y ausencia de las cepas M y Ra, *katG315* MUT se asoció positivamente con los clados LAM5 y LAM9 y negativamente con los clados T1 Ghana, T1 Tuscany y S. Como era de esperar, el *clustering* resultó fuertemente asociado a los clados H2 y LAM3 en presencia de las cepas M y Ra. Tanto en presencia como en ausencia de dichas cepas, el *clustering* resultó asociado con el genotipo *katG315* MUT, y con los clados LAM5, LAM9, T1 Ghana, T1 Tuscany y S. Se concluye que en Argentina: (i) las principales cepas epidémicas presentan mutación *katG315*, (ii) los polimorfismos *katG315* están relacionados con los genotipos de base; (iii) el genotipo *katG315* MUT predice, además de resistencia a INH, resistencia a otras drogas y riesgo de transmisión de la enfermedad.

ABSTRACT

Mutation at position 315 of the *Mycobacterium tuberculosis katG* gene confers resistance to isoniazid (INH), which defines multidrug resistant tuberculosis (MDR TB) when associated with resistance to rifampicin. In countries of the Northern Hemisphere, the presence of this mutation was found to be associated with resistance to multiple drugs and disease transmission. There is no information on this topic from Argentina, a country where MDR TB has been transmitted epidemically for two decades. In the present work, we used restriction enzyme analysis to explore *katG315* polymorphisms in 540 INH-resistant *M. tuberculosis* isolates obtained from equal number of patients in Argentina, 2003-2012. The isolates were representative of three phenotypic drug resistance profiles: INH-resistant not MDR, MDR, and extensively resistant (XDR). A MDR isolate was classified as XDR when showing additional resistance to at least one fluoroquinolone and one second line injectable drug. We investigated the association of the genotype *katG315* MUT with: (i) phenotypic drug resistance profile, (ii) isolate genetic background measured as spoligotype according to SITVIT WEB database (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/), and (iii) disease transmission measured as IS6110 RFLP clustering. The genotype *katG315* MUT was present in 371 (68,7%) of the isolates. Increasing frequencies of *katG315* MUT correlated with increasingly comprehensive drug resistance profiles (χ^2 for trend: 52,124 $p < 0,0001$). The association between *katG315* MUT and genetic background of the isolate was analyzed in the presence and the absence of the indigenous strains M and Ra, the two largely predominant epidemic strains in Argentina. The *katG315* MUT genotype was strongly associated with H2 and LAM3, the spoligo clades accommodating these two predominant MDR *M. tuberculosis* strains ($<0,0001$). In presence and absence of M and Ra strains, the *katG315* MUT genotype resulted positively associated with clades LAM5 and LAM9, and negatively associated with clades T1 Ghana, T1 Tuscany, and S. As expected, clustering was found strongly associated with clades H2 and LAM3 in the presence of strains M and Ra. In presence and absence of these two strains, *clustering* resulted associated with the *katG315* MUT genotype and also with clades LAM5, LAM9, T1 Ghana, T1 Tuscany, and S. It is concluded that in Argentina: (i) the main epidemic MDR *M. tuberculosis* strains carry mutation at *katG315*, (ii) polymorphisms in *katG315* are related to *M. tuberculosis* genetic background, (iii) the *katG315* MUT genotype predicts not only INH resistance but also resistance to additional drugs and disease transmission.

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 años. Un temprano progenitor de *M. tuberculosis* fue probablemente contemporáneo de, y ha co-evolucionado 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 europeas y de 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 precolombina, 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, un derivado proteico purificado estándar del bacilo (denominado PPD) que se creía útil como agente inmunizante.

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>



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>

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. 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.

En 1944, en plena Guerra Mundial, Albert Schatz y Selman Waksman descubrieron, a partir de un pequeño hongo, la estreptomycin (SM), substancia 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 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 3. Estampilla de los años 1959-1960 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, *solo* 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 85% de los casos [WHO TB Report 2013].

Mycobacterium tuberculosis

Las bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* son bacilos inmóviles y no esporulados. Pertenecen 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].

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 procariotas. Está constituida por una capa interna de peptidoglicano, 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 peptidoglicano 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 peptidoglicano. 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 lipoarabinomano. 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 paracrina 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, las 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 pueden crecer en el medio ambiente, son hospedador dependientes como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, y los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Este complejo incluye *M. tuberculosis*, junto con otras 7 especies estrechamente relacionadas: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium canetti* y *Mycobacterium mungii*.

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* (LPSs) y *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) son filogenéticamente informativos y útiles para los estudios de población.

Además, el cromosoma posee otras regiones 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 2012 se produjeron 8,6 millones de casos nuevos y 1,3 millones de personas murieron por esta enfermedad (940 000 muertes ocurrieron en personas VIH negativos y 320 000 entre personas portadoras del virus).

La mayoría de los casos nuevos estimados en 2012 ocurrieron en Asia (58%) y en África (27%), menores proporciones en la región del este mediterráneo (8%), en la región europea (4%) y en la región de América (3%). India, China, Sudáfrica, Indonesia y Pakistán cuentan con las mayores tasas de incidencia mundial. Las tasas más bajas se encuentran predominantemente en los países con mayores ingresos, como los de Europa occidental, Canadá, Estados Unidos, Japón, Australia y Nueva Zelanda. En estos países las tasas de incidencia son menores a 10 casos por 100 000 habitantes [WHO TB Report 2013].

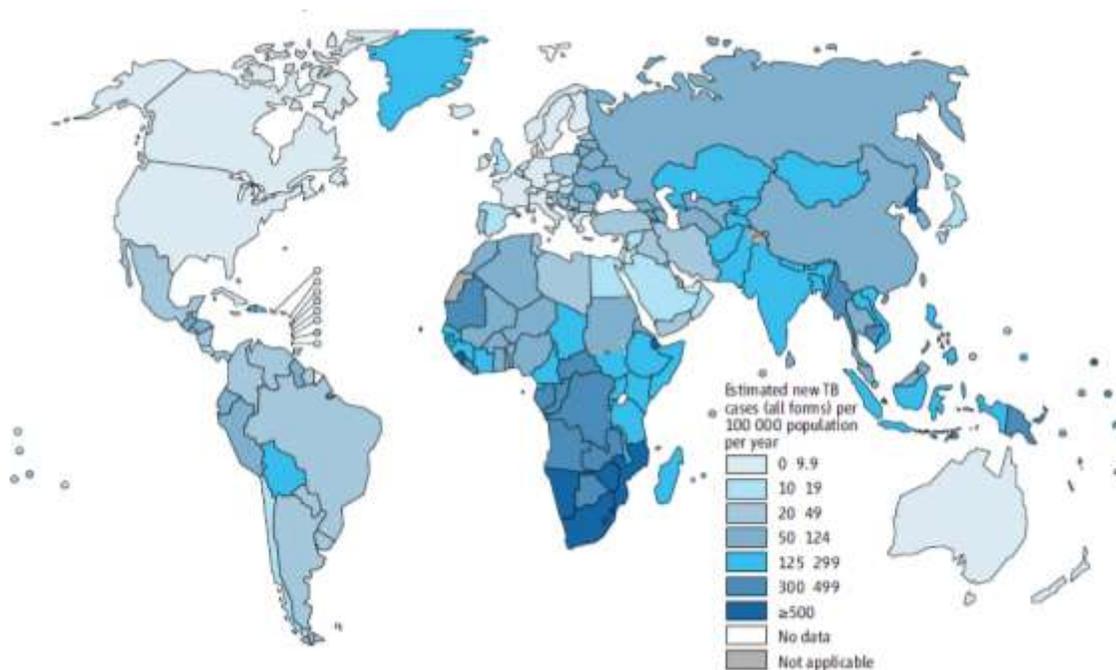


Figura 4. Tasas estimadas de incidencia de TB en 2012. [WHO Global tuberculosis report 2013].

TB en Argentina

En 2012, en Argentina se notificaron 9070 casos de TB. La tasa de notificación para ese año fue 22 casos por cada 100 000 habitantes, esto es 3,6% menor que la de 2011. 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 2012, la tasa de notificación más alta correspondió a la provincia de Jujuy con 348 casos (48,5 cada 100.000 habitantes). El valor más bajo se observó en La Rioja, con 27 casos (7,3 cada 100 000 habitantes). La tasa de la provincia de Jujuy fue 6,6 veces más alta que la tasa de La Rioja y 2,2 veces mayor que la general del país. Además de Jujuy, Salta, Santa Cruz, la Ciudad de Buenos Aires, Formosa y Chaco completan el grupo de las 6 provincias con mayores tasas de notificación en el país. Además de La Rioja, otras 6 provincias tienen tasas menores a 10 casos por 100 000 habitantes. Estas son: Catamarca, Córdoba, San Juan, San Luis, Neuquén y Río Negro [INER-CONI 2013].

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 a menudo suele fallar por varias razones: mala calidad de las drogas, pobre adherencia al tratamiento, tratamiento incompleto, intermitente o inadecuado, recaída, 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 y el tratamiento correcto de la TB es una importante estrategia para prevenir la emergencia de TB MDR. Existen, además, cepas de *M. tuberculosis* con **resistencia extendida (TB XDR)**, definidas como aquellas cepas 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 3,6% de los casos nuevos y 20,2% de los casos con tratamiento previo tienen TB MDR. En 2012, el 37% de muertes por TB ocurrieron por TB MDR. Los mayores niveles de TB asociada a fármacorresistencia se encuentran en el este de Europa y Asia central. En el año 2012 se estimaron 450 mil casos nuevos de TB MDR en el mundo, más de la mitad de los casos fueron en India, China y la Federación Rusa. Menores niveles de multirresistencia entre los casos nuevos (<3%), se registraron en otras partes del mundo, incluyendo la mayoría de los países de la Región de las Américas, la mayoría de los países de África, Europa Occidental, la mayor parte del este asiático, y el Pacífico [WHO TB Report 2013].

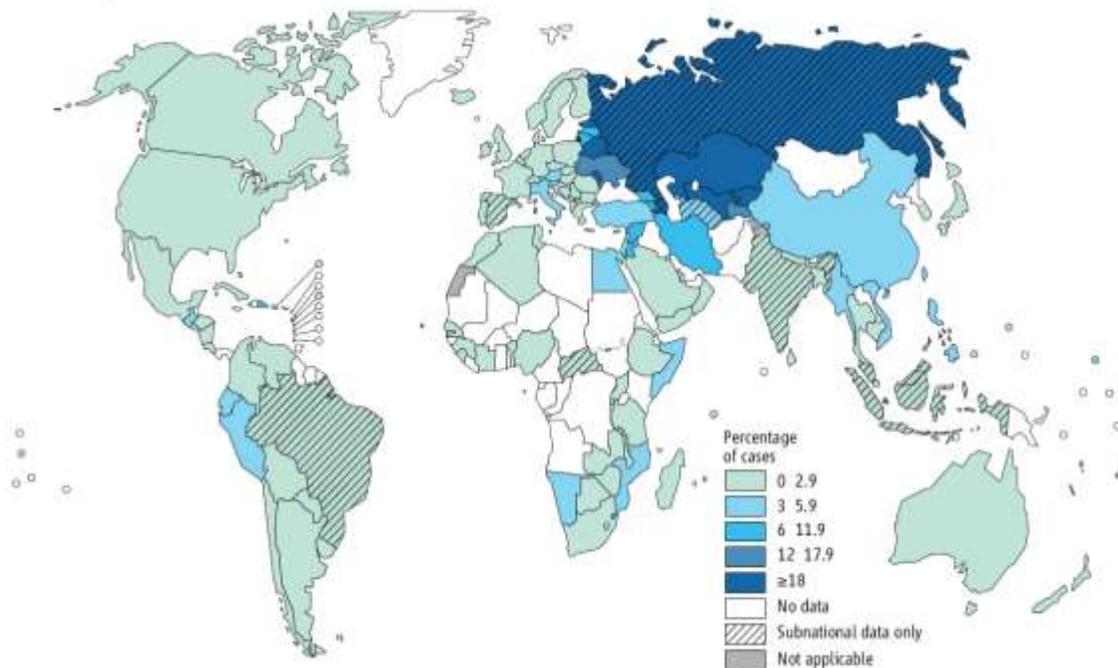


Figura 3. Porcentajes de casos nuevos de TB MDR en 2012. La figura está basada en los años más recientes de los que se dispone información, la cuál varía entre los países. XDR TB ha sido reportada por 92 países. Un porcentaje estimado: 9,6% (95% CI: 8,1%-11%) de los casos MDR son XDR TB. [WHO Global tuberculosis report 2013].

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 multirresistente 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. Muñiz 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.

A comienzos de los años 90, otra cepa multirresistente, denominada **Ra**, también inició su transmisión en el Hospital Carrasco de Rosario. Estas dos cepas 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 debido a su gran poder de discriminación. Esta técnica revela la variación en el número de copias de la secuencia de inserción (IS) 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 principales 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.

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 discriminatorio. La tipificación mediante VNTR se basa en una PCR empleando *primers* específicos flanqueantes de las diferentes regiones de los MIRUs, el polimorfismo se encuentra 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 (*pb*) separadas por secuencias espaciadoras únicas (35 a 41 *pb*). 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*, *ahpC*, *inhA*, *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, induciendo 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 -15T de la región promotora del gen *inhA* (c-15t) se vinculan a bajos niveles de resistencia a INH en aislamientos clínicos [Gagneux 2006c]. Ha sido demostrado que las mutaciones en posición 315 del gen *katG* 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 gran 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. La resistencia a etionamida suele estar presente en cepas resistentes a INH no MDR.

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 demostraron que un aumento en la expresión de *ahpC* actuaría

como una mutación compensatoria por 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 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® MTBDRs/ (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 están basados 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® MTBDRs/ detecta resistencia a fluoroquinolonas, inyectables de segunda línea y *EMB*. 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].

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*. Diferentes linajes demostraron poseer una definida afinidad geográfica y asociarse a determinadas etnias humanas [Hirsh 2004; Reed 2009].

Evidencias recientes indican que factores bacterianos contribuyen a la emergencia y diseminación de la TB drogorresistente. En primer lugar, la distribución geográfica global de la TB MDR es heterogénea y no se superpone estrictamente a las áreas del mundo con mayor carga de TB sino a la áreas en las que predomina las cepas de la familia denominada Beijing, como China, países de la ex URSS y Sudáfrica [Parwati 2010]. En segundo lugar, aún en comunidades y países adonde la familia Beijing no es prevalente y se aplican programas rigurosos de control de la TB y vigilancia sistemática de su transmisión, a la par de cepas drogorresistentes que no producen casos secundarios y se extinguen, aparecen cepas drogorresistentes que son capaces de transmitirse, generar brotes y perpetuarse [van Doorn 2006; Gagneux 2006c]. En tercer lugar, cepas de *M. tuberculosis* que albergan diferentes mutaciones asociadas a resistencia a drogas presentan diferentes niveles de aptitud biológica [Bottger 1998; Gagneux 2006b].

Se ha postulado que interacciones epistáticas, es decir aquellas en las que el efecto de un gen es modificado por otro(s) gen(es), podrían influir sobre el fenotipo de las diferentes cepas de *M. tuberculosis*. 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]. A su vez, la evolución compensadora podría atenuar el efecto negativo de las mutaciones responsables de resistencia sobre la aptitud biológica de las cepas drogorresistentes [Handel 2006; Andersson & Hughes 2010].

Argentina aún está padeciendo las secuelas de la mayor epidemia de TB MDR registrada en América Latina. Unas pocas cepas MDR de *M. tuberculosis* iniciaron su expansión clonal en forma explosiva hace 20 años y se perpetuaron en la población hasta nuestros días. Nuestro objetivo es 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 y transmitirse. Este tipo de abordaje combinado del problema no ha sido aún aplicado a los genotipos resistentes de *M.*

tuberculosis circulantes 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 otras áreas del mundo la mutación *katG315* se asocia a multirresistencia y a transmisión, y que en Argentina han sido identificadas cepas de *M. tuberculosis* MDR/XDR transmitidas en forma epidémica, se postula que estas cepas epidémicas de Argentina presentan dicha mutación mientras que otras cepas resistentes a INH que en nuestro país son de ocurrencia esporádica no la presentan.

OBJETIVOS

En aislamientos de casos de TB resistente a INH de Argentina, explorar la asociación de polimorfismos *katG315* con:

- Perfiles de resistencia a otras drogas
- Perfil filogenético preexistente
- Transmisión de la TB drogorresistente

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El estudio se realizó en dos etapas. En la **primera etapa** se exploró la precisión, en nuestras condiciones de trabajo, de un método “*in house*” diseñado por van Doorn *et.al.* [van Doorn 2001] para detectar polimorfismos *katG315* mediante análisis de restricción enzimática (REA: *restriction enzyme analysis*). A tal fin, se compararon resultados de este método con los de secuenciación del gen *katG* o con los resultados de pruebas de sensibilidad a drogas en cepas y aislamientos previamente caracterizados. En la **segunda etapa**, el método, que a partir de ahora llamaremos **REA-315**, se aplicó a la detección de mutación *katG315* en aislamientos clínicos de Argentina resistentes a INH y con diversos perfiles de resistencia a otras drogas. Se investigó si, en Argentina, la mutación en *katG315* se asocia a determinado perfil fenotípico de resistencia a drogas, a determinado perfil genético preexistente, y/o a transmisión de la TB.

Muestras

Para la primera **etapa de validación** se emplearon **86 cepas de *M. tuberculosis*** con resultados conocidos de secuenciación de la región de interés del gen *katG* y **62 aislamientos clínicos sensibles a INH**. Las cepas secuenciadas fueron analizadas en el Instituto de Medicina Tropical de Amberes (Tabla S1, en Material Suplementario). De las 86 cepas, 40 fueron enviadas a nuestro laboratorio para controles anuales de calidad de pruebas de sensibilidad. Las demás fueron objeto de dos proyectos en los que nuestro laboratorio colaboró con el mismo instituto, uno de resistencia a fluoroquinolonas conducido por Andrea von Groll (n: 26) en 2011 y el otro de aptitud biológica de *M. tuberculosis* conducido por Beatriz López en 2010 (n: 20). Los aislamientos sensibles a INH se describirán más abajo con el resto de los aislamientos clínicos.

La precisión del método para revelar presencia/ausencia de mutación *katG315* se calculó como la proporción simple de resultados concordantes con los resultados de secuenciación en un grupo y con pruebas de sensibilidad en el otro. Para validar el método aspiramos a obtener una concordancia $\geq 98\%$. A partir de ahora, por razones de espacio y claridad, en texto y tablas emplearemos la nomenclatura WT (por *wild type*) y MUT (por *mutated*) para referirnos al estado “salvaje” y “mutado”, respectivamente, de un sitio genómico.

Asimismo, fueron investigados **602 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*** obtenidos en Argentina de igual número de pacientes con TB con factores de riesgo de resistencia a drogas. Los aislamientos primarios fueron obtenidos entre el 01-01-2003 y el 31-12-2012 en los laboratorios de la red nacional de TB. En ese período fueron derivados a nuestro servicio 7287 aislamientos clínicos para identificación de especie y pruebas de sensibilidad a drogas. Como se expresó más arriba, una muestra de conveniencia que comprendió **62 aislamientos sensibles a INH** del período de estudio se utilizó para la ulterior evaluación del desempeño REA-315.

La selección **de los 540 aislamientos resistentes a INH** se realizó a partir de los 1751 aislamientos del período que resultaron resistentes al menos a INH (Figura 4). Si 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 3 aislamientos (1 monorresistente a INH, 1 MDR y 1 XDR) se incluyó *solo* 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.

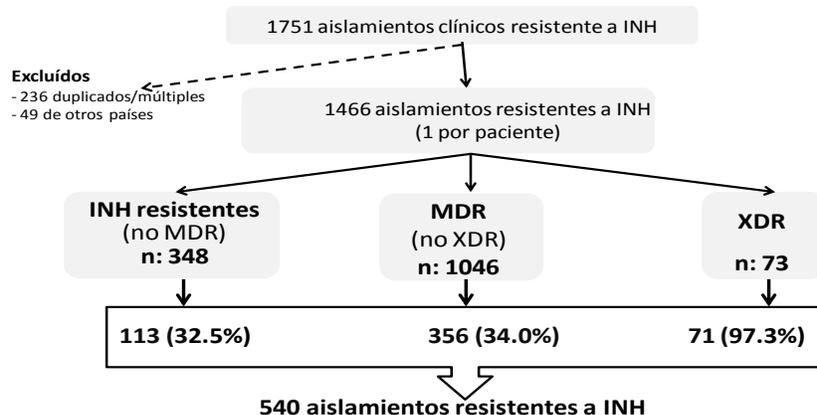


Figura 4. Selección y clasificación de aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a INH analizados en este estudio a partir del total de aislamientos clínicos obtenidos en Argentina y derivados a nuestro laboratorio en el período 2003-2012.

Las cepas y los aislamientos clínicos fueron repicados en medio Löwenstein-Jensen, incubados a 37°C e identificados como *M. tuberculosis* mediante pruebas bioquímicas y moleculares. La susceptibilidad a drogas de primera y segunda línea fue determinada por el método de las proporciones en medio Löwenstein-Jensen y/o MGIT 960 según lo establecido por la OMS [WHO 2009].

Extracción del ADN

El ADN para las reacciones REA-315 y *spoligotyping* fue obtenido mediante hervido simple: tres ansadas de colonias bacterianas crecidas en medio Löwenstein-Jensen fueron suspendidas en 1 ml 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 transvasó a un vial nuevo estéril. El ADN para RFLP IS6110 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.

Detección de mutación *katG* 315 mediante REA-315

La mutación *katG*315 se exploró mediante un sencillo método *in house* que consiste en: (i) amplificación por PCR de un segmento de 643 pb del gen *katG*, (ii) digestión con la endonucleasa de restricción MspA1I, (iii) electroforesis submarina en gel de agarosa, y (iv) análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción. En el resto de este documento, este método será identificado con la REA-315 (por *restriction enzyme analysis*), denominación empleada en su descripción original [van Doorn 2001].

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl. La mezcla consistió en: buffer de PCR 10X 2 µl; MgCl₂ 50 mM 1,2 µl; dNTPs 100 mM 0,025 µl; katF 100 mM; katR 100 mM; templado de ADN 3 µl, Taq polimerasa (5U/µl) 0,4 µl. Los *primers*

fueron los siguientes: *katF* (*forward*): 5'-CTGCTCC GCTGGAGCAGATG-3' y *katR* (*reverse*) 5'- CCGACTTGGGCTGCAGGCG -3'.

La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler 384 Eppendorf®, con el siguiente perfil de ciclado: (i) una etapa inicial de desnaturalización a 95°C 5 min; (ii) 8 ciclos consecutivos de 95°C 1 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min; (iii) 32 ciclos consecutivos de 95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min; y (iv) etapa final de extensión de 72°C 10 min.

El producto de amplificación, de 643 pb de longitud, fue sometido a digestión con *MspA1I*. La restricción se realizó a 37°C durante 2 horas en un volumen final de 20 µl de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: albúmina sérica bovina 0,2 µl; *MspA1I* (10U/µl) 0,4 µl; producto amplificado 5 µl; *buffer* 2 µl, agua milliQ 12,4 µl. Esta enzima corta al amplicón salvaje (WT) en tres sitios y al amplicón mutado (MUT) en dos.

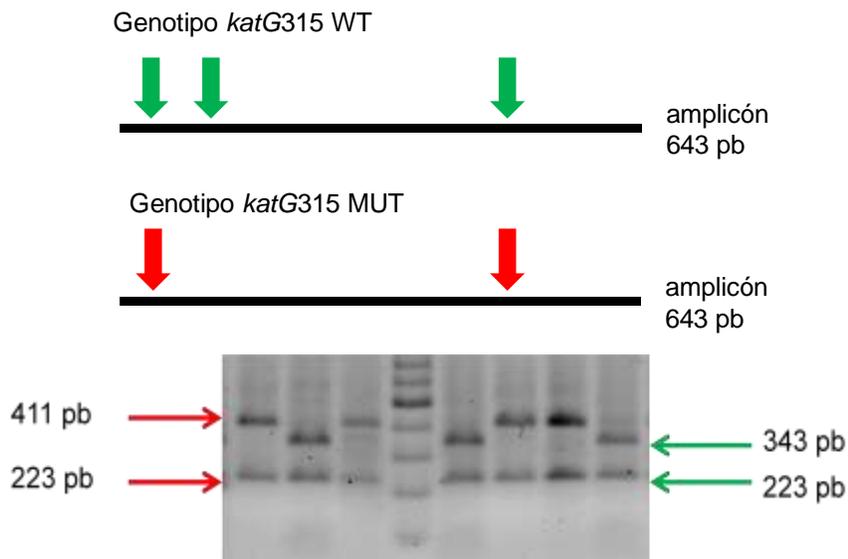


Figura 5. La mutación en el codón 315 del gen *katG* fue detectada por análisis de restricción con la endonucleasa *MspA1I* del amplicón de 643 pb. La enzima corta el segmento WT en tres sitios y el segmento MUT en dos sitios. La diferencia se hace visible en la longitud del fragmento mayor (343 pb vs 411 pb), ambos digestos comparten un fragmento de 223 pb, y los fragmentos de tamaño menor a 70 pb son imperceptibles en estas condiciones de electroforesis.

Los fragmentos de restricción 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).

Genotipificación de los aislamientos

Spoligotyping

Se realizó mediante amplificación e hibridación reversa en membrana con 43 oligonucleótidos correspondientes a otros tantos espaciadores existentes en el locus DR de *M. tuberculosis* [Kamerbeek 1997]. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 20 μ l: buffer PCR 10X 5 μ l; MgCl₂ 50 mM 1,2 μ l; dNTPs 10 mM 0,15 μ l; primer DRa 5' biotinilado 100 mM (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3'), primer DRb 100 mM (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), Taq Polimerasa (5U/ μ l) 0,09 μ l, templado de ADN 3 μ l, H₂O calidad biología molecular hasta completar 20 μ l. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler 384, Eppendorf®, Hamburg, Germany) de acuerdo al siguiente perfil: 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 realizada la reacción de PCR, todo producto amplificado se diluyó en un vial estéril con 150 μ l de solución SSPE 2X (preparada por dilución de la solución SSPE 20X: Na₂HPO₄*2H₂O 0,2 M; ClNa 3,6 M; EDTA 20 mM; pH 7,4)/ SDS 0,1%. Esta dilución del producto de PCR fue desnaturalizada por calentamiento a 99°C y colocada luego 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 usado 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 μ l de estreptoavidina-peroxidasa (500 U/ ml) diluida en 15 ml de SSPE 2X/ SDS 0,5%, posterior incubación a 38°C por 45 minutos. Finalizada la hibridación se realizaron dos lavados consecutivos con SSPE 2X/ SDS 0,5% a 38°C durante 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, Buckinghamshire, 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 cromosómico de la cepa de referencia internacional Mt 14323 fue incluido por triplicado como genotipo estándar en 3 calles equidistantes de cada gel.

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). Para la normalización intra- e inter-experimento

del RFLP IS6110 se utilizó como control externo la cepa de referencia internacional Mt 14323 en tres calles equidistantes del gel. Los porcentajes de similitud se calcularon mediante el coeficiente Dice, con una tolerancia de 1% en la posición de las bandas y una optimización del 1% entre los patrones. Para el análisis de *clustering* se aplicó el método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*). Se exigió 100% de similitud en los perfiles de ambos, RFLP IS6110 y *spoligotyping*, para agrupar en un *cluster* a dos o más aislamientos, excepto en dos casos: (i) un aislamiento cuyo perfil RFLP tenía diferencia en la presencia o posición de 1 sola banda con respecto a los miembros de un *cluster* fue incluido en el mismo si el aislamiento compartía idéntico spoligotipo, (ii) un aislamiento fue incluido en un cluster si tenía idéntico RFLP IS6110 y diferencia en un solo espaciador en el spoligotipo [Heersma 1998]. En algunos casos en los que el RFLP no estaba disponible, se clasificó como “único” (no en *cluster*) aquel spoligotipo que estaba ausente entre aislamientos resistentes a drogas en nuestra base de datos, que incluye más de 6000 genotipos de Argentina, otros países de América Latina y España.

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/) 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 algunos casos se confirmó la asignación filogenética en la base de datos MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU>).

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 polimorfismo *katG315* y el perfil fenotípico de resistencia a drogas. A este fin, los aislamientos fueron clasificados en monorresistentes a INH, polirresistentes, MDR, XDR. Mediante análisis univariado se investigó la asociación de polimorfismos *katG315*

con las familias y los clados más conspicuos. Se definió como clado prevalente aquel que incluyó 10 o más aislamientos en el presente estudio. Mediante análisis univariado se investigó la asociación de *clustering* con el genotipo *katG315* MUT. Se aplicó análisis de regresión logística para determinar la asociación de *clustering* con los diversos clados de *M. tuberculosis* según SITVIT WEB. Se consideró estadísticamente significativo un valor de **p<0,05** y altamente significativo un valor de **p<0,001**.

RESULTADOS

Validación de REA-315

Desempeño en cepas secuenciadas

El grupo de 86 cepas empleadas en esta etapa incluyó 58 (67,4%) cepas MDR, 5 (5,81%) cepas resistentes a INH (no MDR), y 23 (27,38%) cepas susceptibles a INH. La concordancia entre REA-315 y los resultados de secuenciación fue **98,8% (85/86)**. Solo la cepa 4574, perteneciente a la familia Beijing, fue incorrectamente clasificada como WT por REA-315, incluso en experimentos repetidos (**Tabla S1, material suplementario**).

Desempeño en aislamientos clínicos sensibles a INH

Este grupo incluyó 33 aislamientos sensibles a todas las drogas investigadas y 29 aislamientos con diferentes perfiles de resistencia (**Tabla 2**).

Tabla 2: Perfil de resistencia a drogas y resultados de REA-315 en 62 aislamientos clínicos sensibles a INH de Argentina, 2003-2012.

Perfil de resistencia a drogas	n	<i>katG315</i>	
		MUT	WT
Totalmente susceptible	33	1	32
SM	5		5
RIF	23		23
PZA+EMB+RIF	1		1
Total	62	1	61

Los genotipos y clados de los aislamientos sensibles están descritos en la **Figura S1**. En este grupo, la concordancia de REA-315 con las pruebas de sensibilidad fenotípicas fue **98,4% (61/62)**. El aislamiento cuyo resultado de REA-315 resultó discrepante con el resultado de la prueba de sensibilidad pertenecía al clado H3 (**Figura S1**). El ADN de este aislamiento no estuvo disponible para ulteriores análisis.

Polimorfismos *katG315* en aislamientos clínicos resistentes a INH

Relación de genotipos *katG* con perfiles de resistencia a drogas

La mutación *katG315* fue encontrada en 371 (68,7%) del total de 540 aislamientos resistentes a INH. La distribución de genotipos *katG315* MUT y WT en los tres grandes grupos clasificados según perfil de resistencia se presenta en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Distribución de genotipos MUT y WT en cada grupo de aislamientos resistentes a INH.

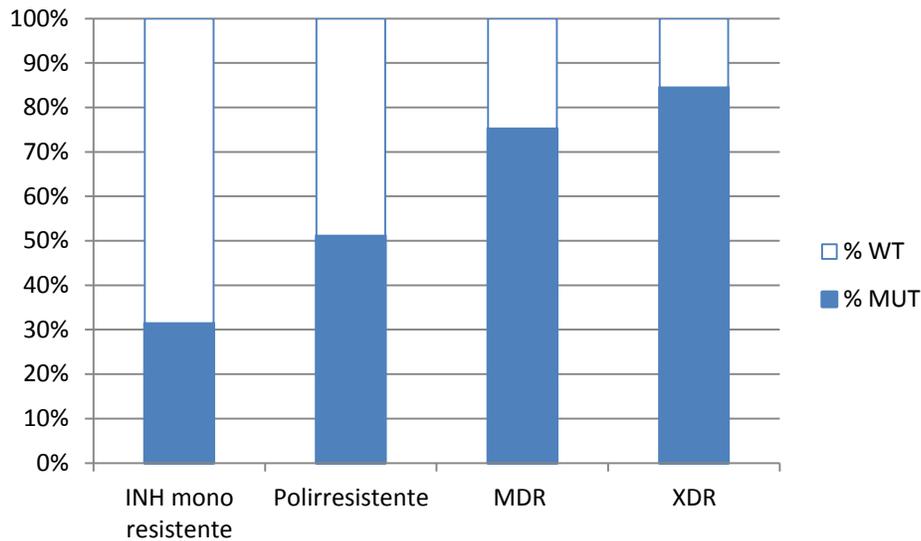
Grupo	<i>katG315</i>			
	MUT n	%	WT n	%
INH resistente (no MDR)	44	38,9	69	61,1
MDR	267	75,0	89	25,0
XDR	60	84,5	11	15,5
Total	371	68,7	169	31,3

Se observó una tendencia al aumento en la frecuencia de *katG315* MUT entre los tres grandes grupos (χ^2 de tendencia 52,124 $p < 0,0001$). Esta tendencia se hizo más acentuada cuando el grupo resistente a INH (no MDR) presentado en **Tabla 4** se dividió en un subgrupo monorresistente a INH y otro polirresistente (χ^2 de tendencia 63,7 $p < 0,0001$) (**Figura 6**). A la vez, dentro del grupo resistente a INH (no MDR), el genotipo MUT se asoció a la resistencia adicional a SM (OR 2.79, 95% CI 1.25-6.25, $p=0.0125$).

Tabla 4. Perfil de resistencia a drogas en 113 aislamientos resistentes a INH (no MDR).

Resistente a	n	<i>katG315</i>			
		MUT	%	WT	%
INH	70	22	31,4	48	68,6
INH+EMB	1	0	0,0	1	100,0
INH+PZA	4	1	25,0	3	75,0
INH+SM	31	18	58,1	13	41,9
INH+SM+EMB	5	2	40,0	3	60,0
INH+SM+PZA	2	1	50,0	1	50,0
Total	113	44	38,9	69	61,1

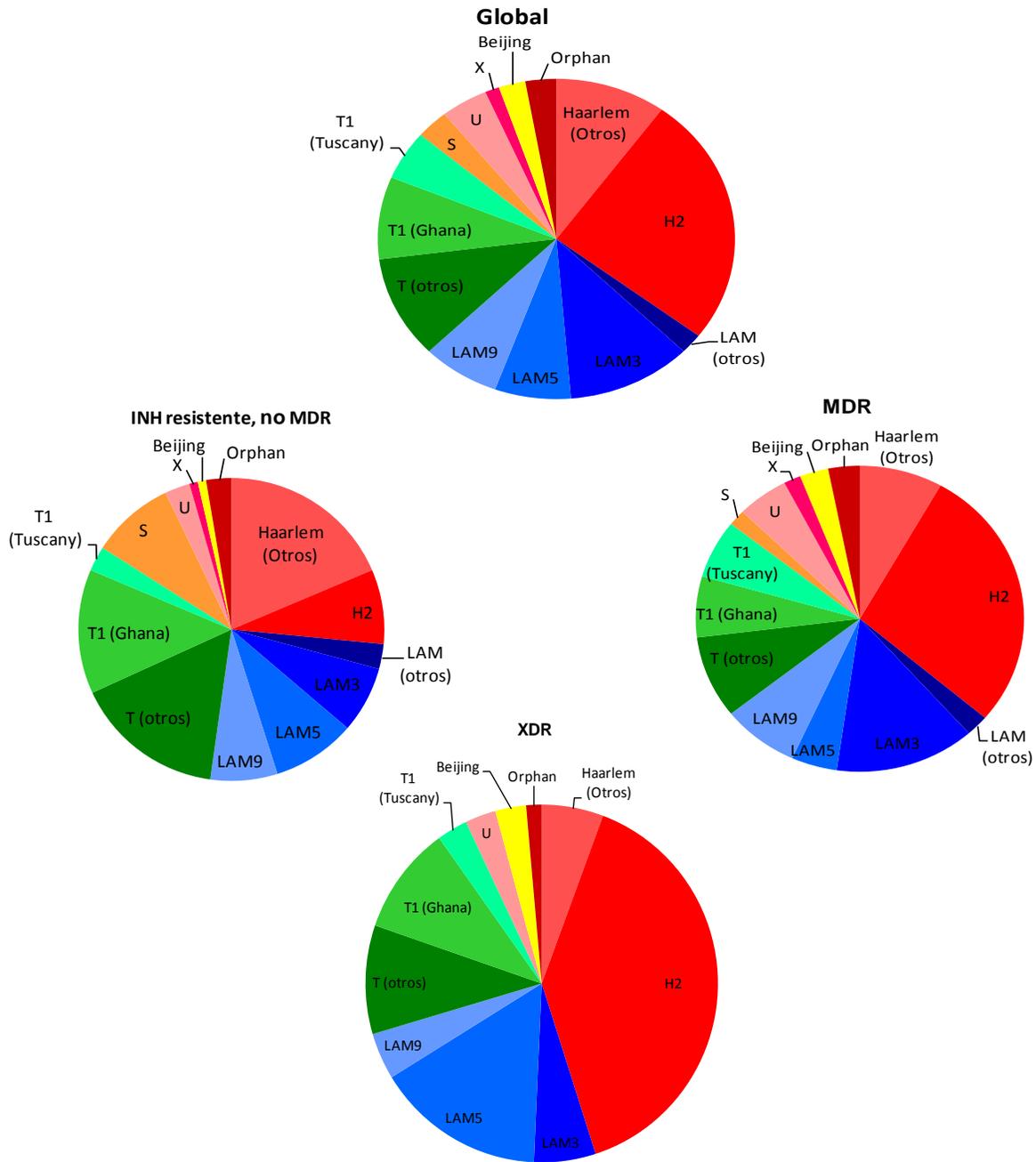
Figura 6. Distribución de polimorfismos *katG315* en cuatro grupos de aislamientos resistentes a INH definidos según su perfil de resistencia a drogas.



Relación de genotipos *katG* con familias y clados de *M. tuberculosis*

En las **Tablas S1, S2 y S3 del material suplementario** están descritos los SITs presentes en cada uno de los tres grandes grupos en orden decreciente de frecuencia, discriminados por REA-315 en MUT y WT. En la **Figura 7** se muestra la distribución de clados entre los 540 aislamientos estudiados y en cada uno de los tres grandes grupos, respectivamente. En dichas tablas se observa que dos genotipos particulares (SIT2 clado H2 y SIT33 clado LAM3) están sobrerrepresentados en el grupo MDR y esto se refleja en el predominio de los clados H2 y LAM3 en la **figura 7**. El clado H2 también está sobrerrepresentado en el grupo XDR. El SIT2 del clado H2 y el SIT33 del clado LAM3 corresponden a los *clusters* de dos cepas de *M. tuberculosis* autóctonas, las cepas MDR denominadas M y Ra, que han tenido transmisión ininterrumpida desde principios de los años 90 y aún que predominan en Argentina [Ritacco 2012a, Eldholm 2014a, Eldholm 2014b]. Esta situación epidemiológica peculiar de nuestro país afecta los resultados de nuestro análisis de asociación de polimorfismos *katG315*, tanto con la carga genética preexistente como con *clustering*. Por ese motivo, los análisis univariados descritos más abajo mostrarán los resultados globales, incluidas estas dos cepas que dominan el escenario epidemiológico de nuestro país, y también las estadísticas de nuestro estudio y, a continuación, los resultados luego de excluir estas dos cepas.

Figura 7. Proporción de diferentes clados en el total de aislamientos resistentes a INH (n: 540, arriba), resistentes a INH no MDR (n: 113), MDR (n: 356) y XDR (n: 71), Argentina 2003-2012.



En las **Tablas 5 y 6** se presenta el análisis univariado de la asociación entre el genotipo **katG315 MUT** y **familias** según SITVIT, antes (n: 540) y después (n: 374) de excluir las cepas M y Ra.

Tabla 5. Asociación entre genotipo katG315 MUT y familia de *M. tuberculosis* en 540 aislamientos clínicos resistentes a INH, Argentina 2003-2012.

Familias	N	MUT		Odds ratio (95% IC)	P
		n	%		
Haarlem	191	160	83,8	3,38	<0,0001
No Haarlem	349	211	60,5	(2,17-5,24)	
LAM	147	126	85,7	3,6	<0,0001
No LAM	393	245	62,3	(2,2-6,0)	
T	128	48	37,5	0,2	<0,0001
No T	412	323	78,4	(0,1-0,3)	
U	23	13	56,5	0,58	0,2
No U	517	358	69,2	(0,25-1,34)	
S	16	4	25,0	0,1	0,0009
No S	524	367	70,0	(0,04-0,4)	
Beijing	13	10	76,9	1,5	0,76
No Beijing	527	361	68,5	(0,4-5,6)	
X	7	4	57,1	0,6	0,68
No X	533	367	68,9	(0,1-2,7)	
Orphan (sin clado)	15	6	40,0	0,15	0,02
No orphan (sin clado)	525	365	69,5	(0,05-0,46)	

En el análisis global (**Tabla 5**) se destaca una fuerte asociación del genotipo **katG315 MUT** con las familias Haarlem y LAM y, a la inversa, una fuerte asociación del genotipo WT con las familias T y S. Cuando se repitió el análisis, esta vez excluyendo las cepas epidémicas M (clado H2) y Ra (clado LAM3) (**Tabla 6**), el genotipo **katG315 MUT** perdió asociación con la familia Haarlem pero la familia LAM mantuvo asociación significativa con el genotipo MUT y las familias T y S también conservaron su asociación con el genotipo WT.

Tabla 6. Asociación entre genotipo *katG315* MUT y familia de *M. tuberculosis* en 374 aislamientos clínicos resistentes a INH (luego de excluir las cepas M y Ra), Argentina 2003-2012.

Familias	N	MUT n	%	Odds ratio (95% IC)	P
Haarlem	57	27	47,4	0,7	0,2
No Haarlem	317	179	56,5	(0,4-1,2)	-
LAM	115	94	81,7	5,9	<0,0001
No LAM	259	112	43,2	(3,4-10,0)	-
T	128	48	37,5	0,3	<0,0001
No T	246	158	64,2	(0,2-0,5)	-
U	23	13	56,5	1,1	0,9
No U	351	193	55,0	(0,5-2,5)	-
S	16	4	25,0	0,3	0,0208
No S	358	202	56,4	(0,1-0,8)	-
Beijing	13	10	76,9	2,8	0,1
No Beijing	361	196	54,3	(0,8-10,4)	-
X	7	4	57,1	1,1	1
No X	367	202	55,0	(0,2-4,9)	-
Orphan (sin clado)	15	6	40,0	0,5	0,2
No orphan (sin clado)	359	200	55,7	(0,2-1,5)	-

En la **Tabla 7** se presenta la asociación, calculada según análisis univariado entre el genotipo *katG315* MUT y los **clados** más prevalentes en la muestra de nuestro estudio, antes y después de excluir las cepas M (del clado H2) y Ra (del clado LAM3). Se comprueba que estas cepas son la principal causa de la fuerte asociación estadística observada entre sus clados de origen y el genotipo *katG315* MUT. Luego de excluir estas dos cepas, algunos clados perdieron asociación estadística con el genotipo *katG315* (H1, H2, H3), otros redujeron el nivel de significación (LAM3, S), uno aumentó el nivel de significación (LAM5) y otro que no presentaba asociación en el grupo total se asoció significativamente a un genotipo *katG315* (LAM9). En líneas generales, los clados LAM se asocian con *katG315* MUT y los clados T1 Tuscany, T1 Ghana y S se asocian con *katG315* WT.

Tabla 7. Asociación entre genotipo *katG315* MUT y clado de *M. tuberculosis* según análisis univariado en aislamientos resistentes a INH, incluidas (n: 540) y excluidas (n: 374) las dos cepas predominantes M y Ra, Argentina 2003-2012.

Clado	Muestra total (n: 540)					Excluidas cepas M & Ra (n: 374)				
	No. de aislamientos	% MUT	Odds ratio	IC 95%	p	No. de aislamientos	% MUT	Odds ratio	IC 95%	p
H1	15	40,0	0,29	0,10 -0,83	0,02	15	40,0	0,53	0,18-1,52	0,24
No H1	525	69,5	1			359	55,7	1		
H2	137	99,3	97,23	13,46-702,16	<0,0001	3	100,0	5,80	0,30-113,01	0,25
No H2	403	58,3	1			371	54,7	1		
H3	39	46,2	0,35	0,19-0,69	0,002	39	46,2	0,67	0,34-1,30	0,24
No H3	501	70,5	1			335	56,1	1		
LAM3	61	88,5	3,94	1,75-8,86	0,0009	29	75,9	2,75	1,14-6,61	0,02
No LAM3	479	66,1	1			345	53,3	1		
LAM5	37	91,9	5,58	1,69-18,44	0,0048	37	91,9	10,87	3,27-36,08	0,0001
No LAM5	503	67,0	1			337	51,04	1		
LAM9	38	76,3	1,76	0,79-3,93	0,17	38	76,3	2,89	1,33-6,30	0,0074
No LAM9	502	68,0	1			336	52,7	1		
T1 Ghana	45	22,2	0,11	0,05-0,22	<0,0001	45	22,2	0,19	0,09-0,40	<0001
No T1 Ghana	495	72,9	1			329	59,6	1		
T1 Tuscany	26	7,7	0,03	0,01-0,14	<0,0001	26	7,7	0,06	0,01-0,25	0,0001
No T1 Tuscany	514	71,8	1			348	58,6	1		
T1 low copy number	8	100	7,93	0,45-138,15	0,16	8	100	14,43	0,83-251,888	0,07
No T1 low copy number	532	67,2	1			366	54,1	1		
S	16	25,0	0,14	0,05 - 0,45	0,0009	16	25,0	0,26	0,08-0,81	0,02
No S	524	70,0	1			358	56,4	1		
U	23	56,5	0,58	0,25 - 1,36	0,20	23	56,5	1,06	0,45-2,49	0,89
No U	517	69,2	1			351	54,9	1		
X	7	57,1	0,60	0,13 - 2,72	0,51	7	57,1	1,09	0,24-4,94	0,91
No X	533	68,9	1			367	55,0	1		
Beijing	13	76,9	1,5	0,42 - 5,64	0,52	13	76,9	2,81	0,76-10,37	0,12
No Beijing	527	68,5	1			361	54,3	1		

Relación de genotipos *katG* con transmisión de TB resistente

Del total de 540 aislamientos, 485 fueron incluidos en el análisis de *clustering*. De estos, 377 tenían disponible el patrón RFLP; 7 aislamientos carecían del mismo pero sus respectivos spoligotipos eran los únicos resistentes en nuestra base de datos, y estaban representados por 0-10 aislamiento sensible de Argentina. Asumimos que esos aislamientos tenían genotipos únicos. Los restantes 55 aislamientos, todos pertenecientes al grupo INH resistente (no MDR), fueron excluidos del análisis de *clustering* porque carecían de patrón RFLP IS6110 y sus spoligotipos no eran únicos en nuestra base de datos.

La **Tabla 8** muestra que en el análisis univariado el genotipo ***katG315 MUT*** se asoció fuertemente al ***clustering*** en el total de aislamientos con genotipos disponibles para el análisis y en el grupo de aislamientos con genotipo distinto de M y Ra.

Tabla 8. Asociación entre genotipo *katG315 MUT* y *clustering* en 485 aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a INH, Argentina 2003-2012.

	Muestra total (n: 485)					Excluidas cepas M & Ra (n: 319)				
	N	MUT	%	Odds ratio		n	MUT	%	Odds ratio	
				(IC 95%)	p				(IC 95%)	p
En cluster	378	308	81,5	5,62 (3,54 - 8,91)	<u>≤ 0,0001</u>	213	144	67,6	2,66 (1,654 - 4,30)	<u>≤ 0,0001</u>
Único	107	47	43,9			107	47	43,9		

La **Tabla 9** muestra los resultados del análisis de regresión logística entre ***clustering*** y **clados** de *M. tuberculosis*. En esta tabla se observa que el ***clustering*** se asocia positivamente con los clados H2 y LAM3 *solo* en presencia de las cepas M y Ra. Los clados LAM5, LAM9, T1 Ghana, T1 Tuscany y S se asocian con ***clustering*** independientemente de la presencia de estas cepas epidémicas.

Tabla 9. Asociación entre *clustering* y clados de *M. tuberculosis* según análisis de regresión logística en aislamientos resistentes a INH, incluidas (n: 485) y excluidas (n: 319) las dos cepas predominantes M y Ra, Argentina 2003-2012.

Clado	Muestra total (n: 485)			Excluidas cepas M y Ra (n: 319)		
	Odds ratio	IC 95%	<i>p</i>	Odds ratio	IC 95%	<i>p</i>
H1	1,68	0,48 - 5,84	0,41	1,72	0,50 - 5,98	0,39
No H1	1			1		
H2	163,2	21,52 - 1237,64	<0,0001	2,46	0,21 - 28,48	0,47
No H2	1			1		
H3	1,11	0,45 - 2,73	0,81	1,14	0,47 - 2,80	0,77
No H3	1			1		
LAM3	5,52	2,39 - 12,76	0,0001	1,72	0,67 - 4,43	0,26
No LAM3	1			1		
LAM5	6,72	2,31 - 19,55	0,0005	6,89	2,37 - 20,02	0,0004
No LAM5	1					
LAM9	4,46	1,70 - 11,70	0,0024	4,57	1,74 - 11,98	0,002
No LAM9	1			1		
T1 Ghana	2,51	1,05 - 5,97	0,0375	2,57	1,08 - 6,11	0,0322
No T1 Ghana	1			1		
T1 Tuscany	28,8	3,68 - 225,57	0,0014	29,54	3,77 - 231,20	0,0013
No T1 Tuscany	1			1		
T1 low copy number	8,4	0,98 to 72,16	0,0524	8,62	1,00 - 73,96	0,0496
No T1 low copy number	1			1		
S	4	1,01 - 15,87	0,0487	4,1	1,04 - 16,26	0,0445
No S	1			1		
U	1,6	0,59 - 4,31	0,35	1,78	0,68 - 4,67	0,24
No U	1			1		
X	3	0,54 - 16,59	0,21	2,65	0,48 - 14,55	0,26
No X	1			1		
Beijing	1,92	0,57 - 6,49	0,29	1,97	0,58 - 6,65	0,29
No Beijing	1			1		

DISCUSIÓN

RAE-315 se desempeñó razonablemente bien con las cepas secuenciadas disponibles para su validación. Dado que este grupo incluía solo 23 cepas sensibles a INH, se consideró oportuno evaluar el desempeño del método respecto de las pruebas fenotípicas de sensibilidad en aislamientos clínicos sensibles a INH del período de estudio. Si bien esta última muestra fue pequeña (en relación al total de aislamientos sensibles del país), de conveniencia, y no contaba con resultados de secuenciación, en la misma estaba representado el espectro de clados de *M. tuberculosis* circulantes en Argentina, según los resultados de investigaciones preliminares de nuestro grupo de trabajo (**Figura S1**) [Monteserin 2013]. REA-315 también presentó aceptable concordancia con las pruebas de sensibilidad a drogas en este grupo de aislamientos sensibles a INH. Los resultados de ambos experimentos de validación demostraron la confiabilidad de la prueba y nos habilitaron a proceder con nuestras investigaciones en la muestra de aislamientos que fue el objeto de nuestro estudio.

También la muestra de aislamientos resistentes a INH reflejó la diversidad genética de la población de *M. tuberculosis* autóctona. Con excepción de una pequeña proporción de cepas de la familia Beijing, también presentes en la muestra sensible a INH y en nuestra población general, los aislamientos resistentes a INH pertenecían a las familias comprendidas en el linaje Euro-Americano. Este linaje es el prevalente en la población general de Argentina, en general en las Américas y también en Europa [Monteserin 2013]. Las tres familias de este linaje predominantes entre aislamientos resistentes a INH de nuestro estudio fueron las denominadas Latin American & Mediterranean, Haarlem y T.

Los resultados de nuestro estudio confirman, en aislamientos autóctonos, observaciones previas de países del hemisferio norte sobre la asociación del genotipo *katG315* MUT con resistencia adicional a SM y con multirresistencia [van Doorn 2006, Gagneux 2006a]. En nuestra muestra se destaca la nítida tendencia al aumento de la frecuencia del genotipo *katG315* MUT en los grupos con perfil fenotípico de resistencia a un creciente número de drogas. Esto indica que los aislamientos resistentes a INH con genotipo inicial *katG* WT tendrían menor tendencia a acumular resistencia a otras drogas que aquellos que debutan como INH resistentes con el genotipo *katG315* MUT.

En Argentina, la fuerte asociación del genotipo *katG315* MUT con las familias Haarlem y LAM en los aislamientos resistentes a INH refleja, en gran medida, la alta prevalencia de las dos principales cepas de brote que han dominado el escenario epidemiológico de la TB MDR en nuestro país durante los últimos 20 años. Esta son la

cepa M del clado H2 y la cepa Ra del clado LAM3. El sesgo introducido por estos brotes epidémicos nos instó a realizar los análisis antes y después de excluir esas dos cepas. A partir de los resultados de nuestro estudio no es posible discernir si la fuerte asociación observada entre el genotipo *katG315* MUT y el clado H2 se extiende a todos los miembros de este clado o es específica de la cepa autóctona M. En nuestra muestra, apenas tres aislamientos H2 SIT2 fueron clasificados por RFLP IS6110 como diferentes de los miembros del *cluster* M. La cepa M fue representada por aislamientos en los tres grupos (INH resistente, MDR y XDR), pero nunca fue aislada en nuestro laboratorio con fenotipo pansensible. Su patrón de RFLP IS6110 tampoco coincide con ningún perfil en las bases de datos de genotipos MDR de España, Holanda y América Latina [Ritacco 2012a, Ritacco 2012b]. Además, el clado H2 al que pertenece esta cepa es infrecuente en aislamientos pansensibles de Argentina y los países vecinos [SITVIT WEB database, http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/].

En cambio, el genotipo LAM3 SIT33, al que pertenece la cepa Ra, es bastante frecuente en Europa y las Américas. Está presente también en aislamientos de nuestro estudio con patrones RFLP IS6110 diferentes del patrón de la cepa Ra. La asociación del genotipo *katG315* MUT con la familia LAM en general, y en particular con los clados LAM3, LAM5 y LAM9, es consistente y trasciende a través de las diferentes aproximaciones estadísticas. También la asociación de los clados T1 Tuscany, T1 Ghana y S con el genotipo *katG315* WT fue consistente a través de las diferentes aproximaciones estadísticas. En cuanto al resto de los clados, o bien tenían una mezcla equilibrada de genotipos *katG315* MUT y WT, o bien eran muy pocos en número para alcanzar y sostener una asociación estadística a través de los distintos análisis.

Nuestros resultados de asociación del genotipo *katG315* MUT con *clustering* confirman observaciones de otros autores [van Doorn 2006, Gagneux 2011a]. Tal como sucede en países del hemisferio norte, en Argentina, las cepas resistentes a INH que presentan *katG315* MUT se transmiten más que las que no presentan esa mutación. Esto se pone en evidencia en el clado H2 y en los clados de la familia LAM. En nuestra muestra, sin embargo, hemos detectado clados individuales con adecuada aptitud biológica para transmitirse a pesar de presentar el genotipo *katG315* WT, tales como T1 Tuscany, T1 Ghana y S. Esto sería congruente con resultados de otros autores que encuentran asociación de *clustering* no solo con mutación *katG315* sino también con mutación *inhA-15*, la segunda en frecuencia entre aislamientos INH

resistentes, después de la mutación *katG315*. También debe ser tenido en cuenta que múltiples factores genéticos no contemplados en el presente análisis modulan la aptitud biológica de *M. tuberculosis*, entre ellos, la asociación epistática entre mutaciones de resistencia a diferentes drogas entre sí, y a mutaciones compensatorias de drogorresistencia [Trauner 2014]. La asociación de clustering con determinados clados circulantes en nuestro país, tanto *katG315* MUT como *katG315* WT, no es fortuita. En todos los clados que resultaron asociados a *clustering* en nuestro estudio están representadas, además de las cepas M y Ra, conspicuas cepas transmitidas en nichos geográficos circunscriptos de Argentina (**Figura suplementaria S2**) [Ritacco 2012a].

Este estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, por razones de tiempo y de 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. Esto es particularmente válido para los análisis de asociación de polimorfismos *katG315* con perfiles de resistencia a drogas y con clados. El análisis de *clustering* no incluyó comparación con perfiles de resistencia a drogas porque las observaciones faltantes de *clustering*, si bien no superaban el 10% de la muestra, no estaban distribuidas en forma aleatoria: todas ellas correspondían a aislamientos no MDR. Esto representa la mayor debilidad de nuestro estudio. Esta limitación se debió a que el estudio fue en buena parte retrospectivo con respecto a genotipificación por RFLP IS6110. La población MDR/XDR está mejor cubierta porque nuestro laboratorio está realizando vigilancia de transmisión de TB MDR/XDR desde 2003. Por dificultades de infraestructura, técnicas y de importación de insumos, el RFLP IS6110 cayó en desuso en nuestro laboratorio durante la ejecución de este estudio. Actualmente el laboratorio está implementando MIRU-VNTR 15-24 y aún no contamos con un sistema fehaciente de traducción de resultados de RFLP IS6110 a resultados de MIRU-VNTR. Otra limitación consiste en que REA-315, el método aplicado para determinar polimorfismos *katG315*, no informa sobre mutación en *inhA*. El conocimiento sobre distribución de los polimorfismos *inhA* en nuestra muestra habría sido útil para la interpretación de los resultados, en particular, en los casos en los que los aislamientos resultaron con genotipo *katG315* WT.

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 de *spoligotyping* [Comas 2009]. En algunos casos el *spoligotyping* no resuelve la filiación, o lo hace incorrectamente. Aún así, se debe admitir que la irrupción del RFLP IS6110 y el *spoligotyping* en los años noventa abrió el camino de la filogeografía de *M. tuberculosis* y la clasificación originada en esta robusta combinación de marcadores 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]. Los principales detractores del *spoligotyping* como marcador filogenético debieron admitir 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 total (WGS) 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, debe tenerse en cuenta que estas noveles 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].

Se ha demostrado que la transmisión de cepas específicas de *M. tuberculosis* resistentes a INH depende, además de factores del huésped y del ambiente, del tipo de mutación que causa dicha resistencia y que cepas resistentes a INH de diferentes partes del mundo se asocian con diferentes mutaciones de resistencia a INH [Gagneux 2006c, Fenner 2012, Ford 2013]. 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 rápida identificación y eliminación de cepas resistentes de *M. tuberculosis*, que son específicas de cada ámbito geográfico, es de enorme interés para la salud pública.

CONCLUSIONES

Las cepas autóctonas de *M. tuberculosis* resistentes a INH que presentan el genotipo *katG315* MUT son las más prevalentes en Argentina y tienen mayor propensión a adquirir resistencia a otras drogas que aquellas que presentan el genotipo *katG315* WT.

Los polimorfismos *katG315* están relacionados con la carga genética preexistente de los aislamientos.

El genotipo *katG315* MUT se asocia nítidamente a transmisión de TB resistente a INH. Sin embargo, los aislamientos resistentes a INH pertenecientes a determinados clados tienen una clara habilidad para transmitirse a pesar de que presentan el genotipo *katG315* WT.

En Argentina, el genotipo *katG315* MUT predice, además de resistencia a INH, resistencia adicional a otras drogas y riesgo de transmisión de la enfermedad.

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.
- 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.
- 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.pneumologia.ro/student/tuberculosis2007.pdf> (consultado septiembre 2014).
- 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, Shopsin B, Tempalski B, Driscoll J, Frothingham R, Musser JM, Alcabes 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, Narvskaia O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim MZ, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rüsç-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.

- 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.pneumozasi.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.

- 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.

- 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, Sobkowiak B, López B, Balloux F, Ritacco V. Microevolution of a MDR outbreak strain of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) in the light of whole genome sequencing (WGS). 35th Annual Congress European Society of Mycobacteriology. Vienna, Austria, 29 jun-2 jul 2014.

- 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. (enviado).

- Fenner L, Egger M, Bodmer T, Altpeter E, Zwahlen M, Jaton 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.

- Handel A, Regoes RR, Antia R. The role of compensatory mutations in the emergence of drug resistance. *PLoS Comput Biol.* 2006; 2(10):e 137.

- Heersma HF, Kremer K, van Embden J. Computer analysis of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 1998; 101: 395-422.

- 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.

- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Dr. Emilio Coni". Departamento Programas de Salud. NOTIFICACIÓN DE CASOS DE TUBERCULOSIS EN LA REPUBLICA ARGENTINA PERÍODO 1980 – 2012. Disponible en: http://www.anlis.gov.ar/iner/wp-content/uploads/2014/03/Notificaci%C3%B3nTB_2012_web.pdf (consultado septiembre 2014).

- 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*. 2011; 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, Sacchetti 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 septiembre 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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, Martín 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.

- 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.

- 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)

- 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.

- 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, Martín 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.
- World Health Organization. 2009. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis—4th ed. WHO/HTM/TB/2009.422.
- World Health Organization. 2013. WHO Global Tuberculosis Report 2013.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Cepas de *M. tuberculosis* empleadas para la validación del método REA-315. La flecha señala la única cepa incorrectamente clasificada por REA-315.

Cepa	Año	País de origen	Resistencia a drogas				Secuenciación		SIT	Clado	Profesional responsable
			EMB	SM	RIF	INH	<i>katG</i>	<i>inhA</i>			
4408	2011*	Bangladesh	R	R	R	R	S315T	prom -15	1	Beijing	A. van Deun
4574	2011*	Bangladesh	S	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
6025	2011*	Abkhazia	S	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
7132	2011*	Korea	R	S	S	R	S315T	WT	orphan	Beijing	A. van Deun
7458	2011*	R. D. Congo	R	S	S	R	S315T	WT	orphan	Beijing	A. van Deun
9305	2011*	Georgia	R	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
9891	2011*	Georgia	R	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
2161	2012*	Bangladesh	R	S	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
2174	2012*	Abkhazia	S	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
2510	2012*	Bangladesh	R	S	R	R	S315T	WT	255	Beijing	A. van Deun
3290	2012*	Bangladesh	S	R	S	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
493	2012*	Bangladesh	R	R	S	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
657	2012*	Bangladesh	S	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
8004	2012*	Georgia	R	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
8841	2012*	Georgia	R	R	R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. van Deun
3268	2011*	Bangladesh	S	S	R	S	WT	WT	26	CAS1_DEHLI	A. van Deun
1407	2012*	Bangladesh	S	S	R	S	WT	WT	26	CAS1_DEHLI	A. van Deun
5376	2012*	Bangladesh	R	S	S	R	S315T	WT	234	EAI5	A. van Deun
8496	2011*	Bangladesh	R	S	R	S	WT	WT	2465	EAI6_BGD1	A. van Deun
6520	2012*	Bangladesh	R	S	R	S	WT	WT	2465	EAI6_BGD1	A. van Deun
5013	2012*	Bangladesh	R	R	S	S	WT	WT	orphan	EIA1-SOM	A. van Deun
3607	2011*	Perú	S	S	R	S	WT	WT	50	H3	A. van Deun
3521	2012*	Perú	S	S	R	S	WT	WT	50	H3	A. van Deun
2426	2011*	Georgia	S	S	R	R	S315T	WT	961	LAM1	A. van Deun
5481	2011*	R. D. Congo	R	S	R	R	WT	prom -15	20	LAM1	A. van Deun
9553	2012*	R. D. Congo	R	S	R	R	WT	prom -15	20	LAM1	A. van Deun
4646	2011*	Perú	R	S	R	R	S315T	WT	42	LAM9	A. van Deun
6020	2011*	Perú	S	S	S	S	WT	WT	orphan	orphan #1	A. van Deun
9290	2012*	Perú	S	S	S	S	WT	WT	orphan	orphan #1	A. van Deun
3366	2011*	Georgia	S	S	S	S	WT	WT	orphan	orphan #2	A. van Deun
4465	2011*	Georgia	S	R	S	S	WT	WT	orphan	orphan #2	A. van Deun
375	2012*	Georgia	S	R	S	S	WT	WT	orphan	orphan #2	A. van Deun
6126	2011*	Bangladesh	S	S	S	S	WT	WT	orphan	orphan #3	A. van Deun
5757	2012*	Bangladesh	S	S	S	S	WT	WT	orphan	orphan #3	A. van Deun
4981	2011*	Italia	S	R	R	S	WT	WT	53	T1 Ghana	A. van Deun
8892	2011*	Nigeria	R	R	R	R	S315T	WT	53	T1 Ghana	A. van Deun
2904	2012*	Italia	S	R	R	S	WT	WT	53	T1 Ghana	A. van Deun
4350	2011*	Bangladesh	R	R	R	R	S315T	prom -47	orphan	T2	A. van Deun
9094	2012*	Bangladesh	R	R	R	R	S315T	prom -47	orphan	T2	A. van Deun
7391	2012*	Bangladesh	R	S	S	S	WT	WT	1391	U	A. van Deun

Tabla S1. Cepas de *M. tuberculosis* empleadas para la validación del método REA-315 (continuación)

Cepa	Año	País de origen	Resistencia a drogas				Secuenciación		SIT	Clado	Profesional responsable
			EMB	SM	RIF	INH	<i>katG</i>	<i>inhA</i>			
1647	2001	Armenia			R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. von Groll
774	2008	Suecia			S	S	WT	WT	1	Beijing	A. von Groll
790	2008	Estonia			R	R	S315T	WT	1	Beijing	A. von Groll
791	2008	Suecia			R	R	S315T	prom -15	1	Beijing	A. von Groll
797	2008	Estonia			R	R	S315T	prom -15	1	Beijing	A. von Groll
810	2008	Estonia			R	R	S315T	prom -15	1	Beijing	A. von Groll
821	2008	Estonia			R	R	S315T	prom -15	1	Beijing	A. von Groll
930	2001	Armenia			R	R	S315T	prom -15	1	Beijing	A. von Groll
2934	2002	Bangladesh			R	R	S315T	prom -15	26	CAS1_DEHLI	A. von Groll
738	2003	Bangladesh			R	R	S315T	WT	141	CAS1_DEHLI	A. von Groll
744	2008	Bangladesh			R	R	S315T	WT	1198	CAS1_DEHLI	A. von Groll
762	2008	Suecia			S	S	WT	WT	309	CAS1_DEHLI	A. von Groll
1975	2002	Perú			R	R	S315T	prom -15	1427	EAI5	A. von Groll
2230	2001	Bangladesh			R	R	S315T	WT	138	EAI5	A. von Groll
2399	2002	Bangladesh			R	R	S315T	WT	292	EAI6_BGD1	A. von Groll
779	2008	Argentina			R	R	S315T	WT	2	H2	A. von Groll
764	2008	Suecia			S	S	WT	WT	50	H3	A. von Groll
1914	1999	Perú			R	R	S315N	WT	130	LAM3	A. von Groll
172	2001	Perú			R	R	S315T	WT	93	LAM5	A. von Groll
2614	2001	Perú			R	R	S315T	WT	469	LAM9	A. von Groll
777	2008	Suecia			R	R	S315T	WT	42	LAM9	A. von Groll
757	2008	Suecia			R	R	S315N	WT	34	S	A. von Groll
785	2008	Suecia			R	R	S315N	WT	34	S	A. von Groll
782	2008	Suecia			S	S	WT	WT	53	T1 Ghana	A. von Groll
789	2008	Suecia			S	S	WT	WT	118	T2	A. von Groll
746	2008	Suecia			R	R	S315T	WT	450	U	A. von Groll

Tabla S1. Cepas de *M. tuberculosis* empleadas para la validación del método REA-315 (continuación)

Cepa	Año	País de origen	Resistencia a drogas				Secuenciación		SIT	Clado	Profesional responsable
			EMB	SM	RIF	INH	<i>katG</i>	<i>inhA</i>			
410	1994	Argentina	S	R	R	R	S315T	WT	2	H2	B. López
15526	2007	Argentina	R	R	R	R	S315T	WT	2	H2	B. López
6548	1998	Argentina	R	R	R	R	S315T	WT	2	H2	B. López
12220	2004	Argentina	S	R	R	R	S315T	WT	2	H2	B. López
12838	2005	Argentina	R	R	R	R	S315T	WT	2	H2	B. López
11608	2003	Argentina	S	S	R	R	S315T	WT	33	LAM3	B. López
10518	2003	Argentina	S	S	R	R	WT	prom -15	33	LAM3	B. López
11167	2003	Argentina	S	S	R	R	S315T	WT	33	LAM3	B. López
7073	1999	Argentina	S	S	R	R	S315T	WT	33	LAM3	B. López
10885	2003	Argentina	R	R	R	R	S315T	WT	34	LAM4	B. López
11797	2004	Argentina	R	R	R	R	S315T	WT	93	LAM5	B. López
11940	2004	Argentina	R	R	R	R	S315T	WT	93	LAM5	B. López
11554	2004	Argentina	R	S	R	R	S315T	WT	93	LAM5	B. López
15168	2007	Argentina	S	S	R	R	WT	prom -15	159	T1 Tuscany	B. López
10368	2003	Argentina	R	R	R	R	S315T	WT	159	T1 Tuscany	B. López
11769	2003	Argentina	S	S	R	R	WT	prom -15	159	T1 Tuscany	B. López
11825	2004	Argentina	S	S	R	R	WT	prom -15	159	T1 Tuscany	B. López
12404	2004	Argentina	S	S	R	R	WT	prom -15	159	T1 Tuscany	B. López
12599	2004	Argentina	S	S	R	R	WT	WT	159	T1 Tuscany	B. López
12155	2004	Argentina	S	S	S	S	WT	WT	159	T1 Tuscany	B. López

Todas las cepas fueron sometidas a pruebas de sensibilidad a drogas anti-TB y secuenciación en el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.

El asterisco (*) denota año en que la cepa fue recibida en nuestro laboratorio para control de calidad de pruebas de sensibilidad. Los años restantes indican el año en que la cepa ingresó al Instituto de Medicina Tropical de Amberes (A. von Groll), o a nuestro laboratorio (B. López).

Abreviaturas: EMB: ethambutol, SM: estreptomina; RIF: rifampicina; INH: isoniacida, *katG*: gen de la catalasa-peroxidasa; *inhA*: gen de la enoil-ACP reductasa;

SIT: *spoligo*tipo internacional. SITs y clados están identificados según la base de datos SITVITWEB http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/;

R: resistente; S: sensible; WT: tipo salvaje

Figura S1. Dendrograma obtenido con el software BioNumerics v 5.1 según RFLP 6110 y spoligotipo de 62 aislamientos sensibles a INH. La flecha señala el único aislamiento que resultó MUT por REA-315.

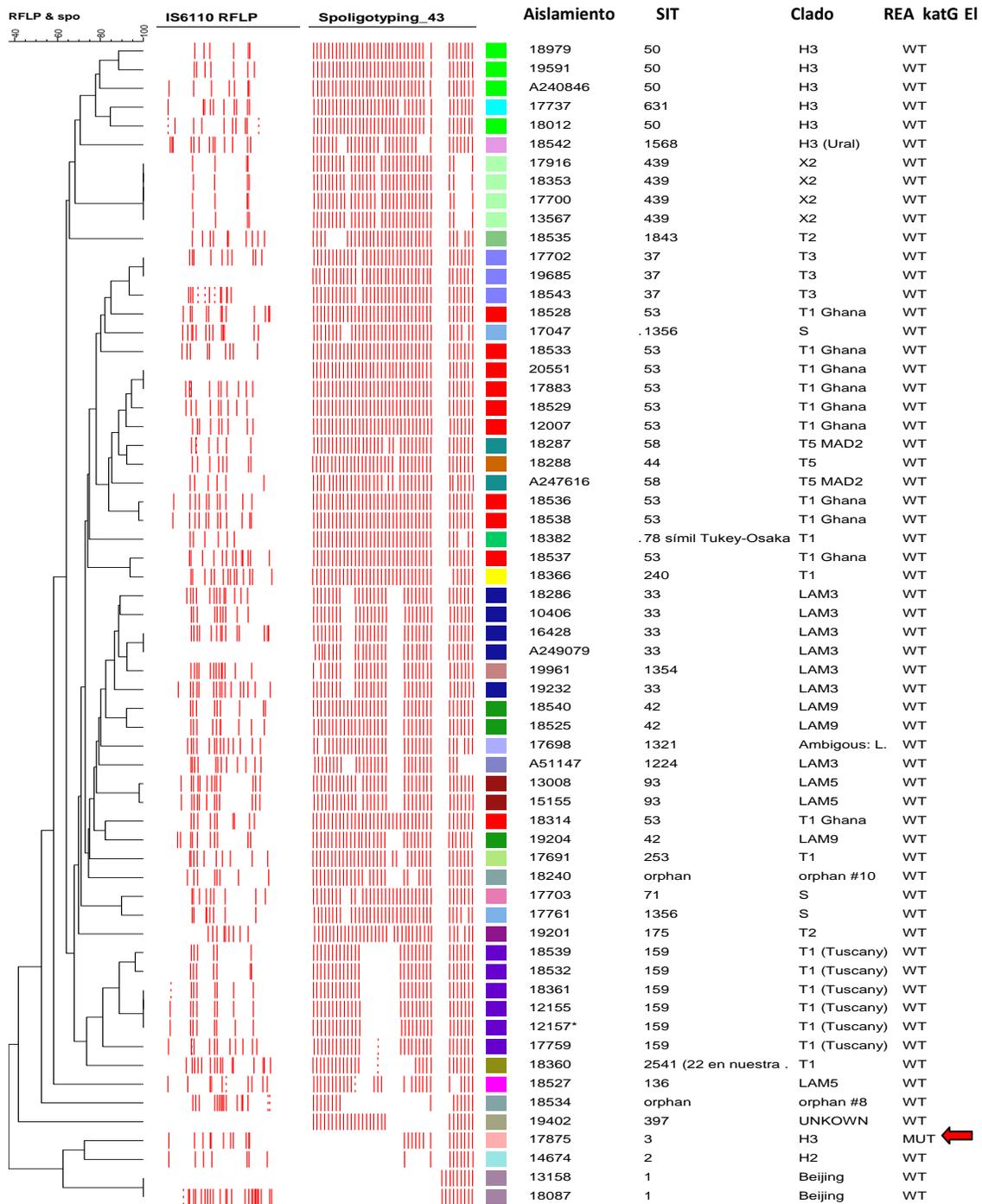
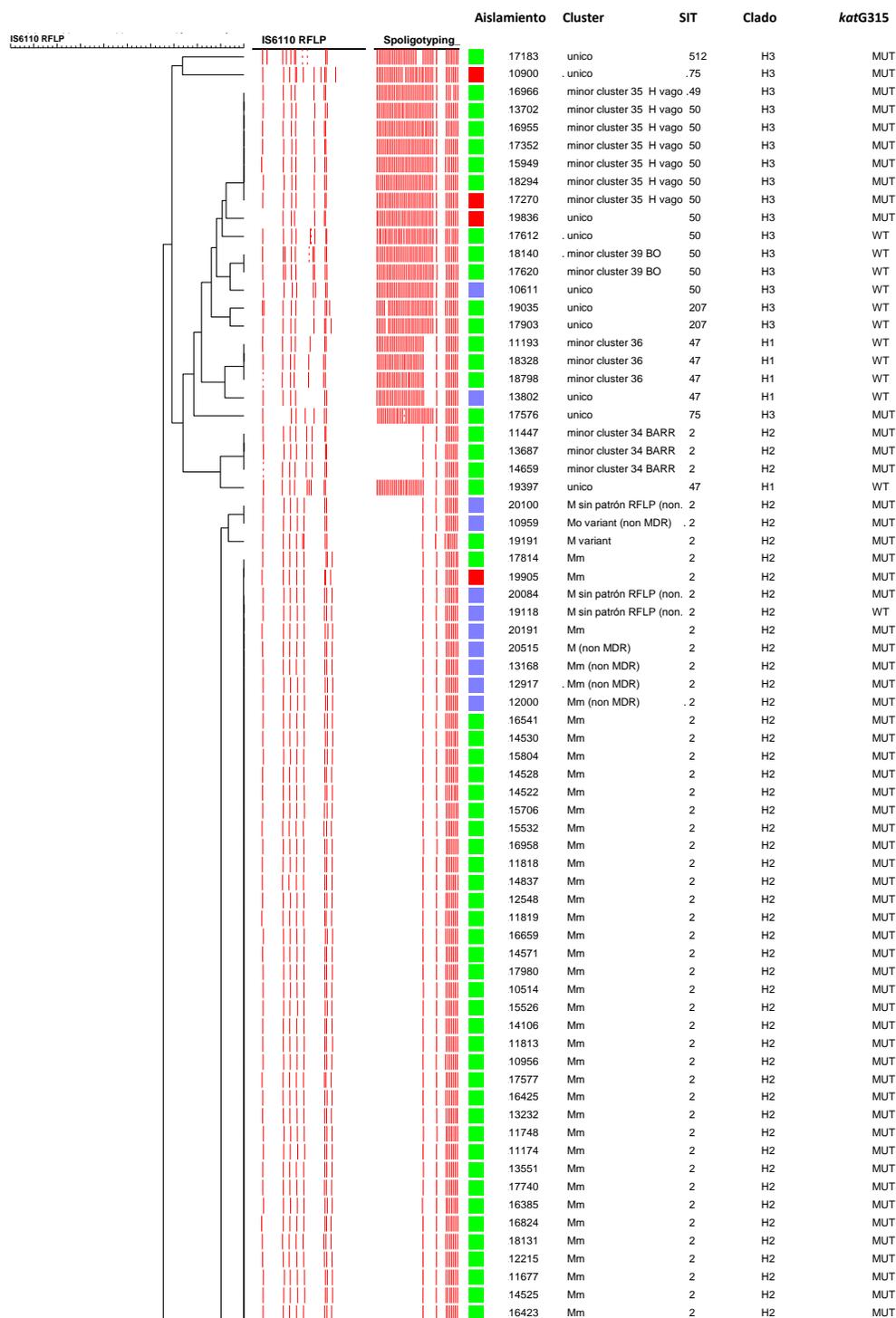
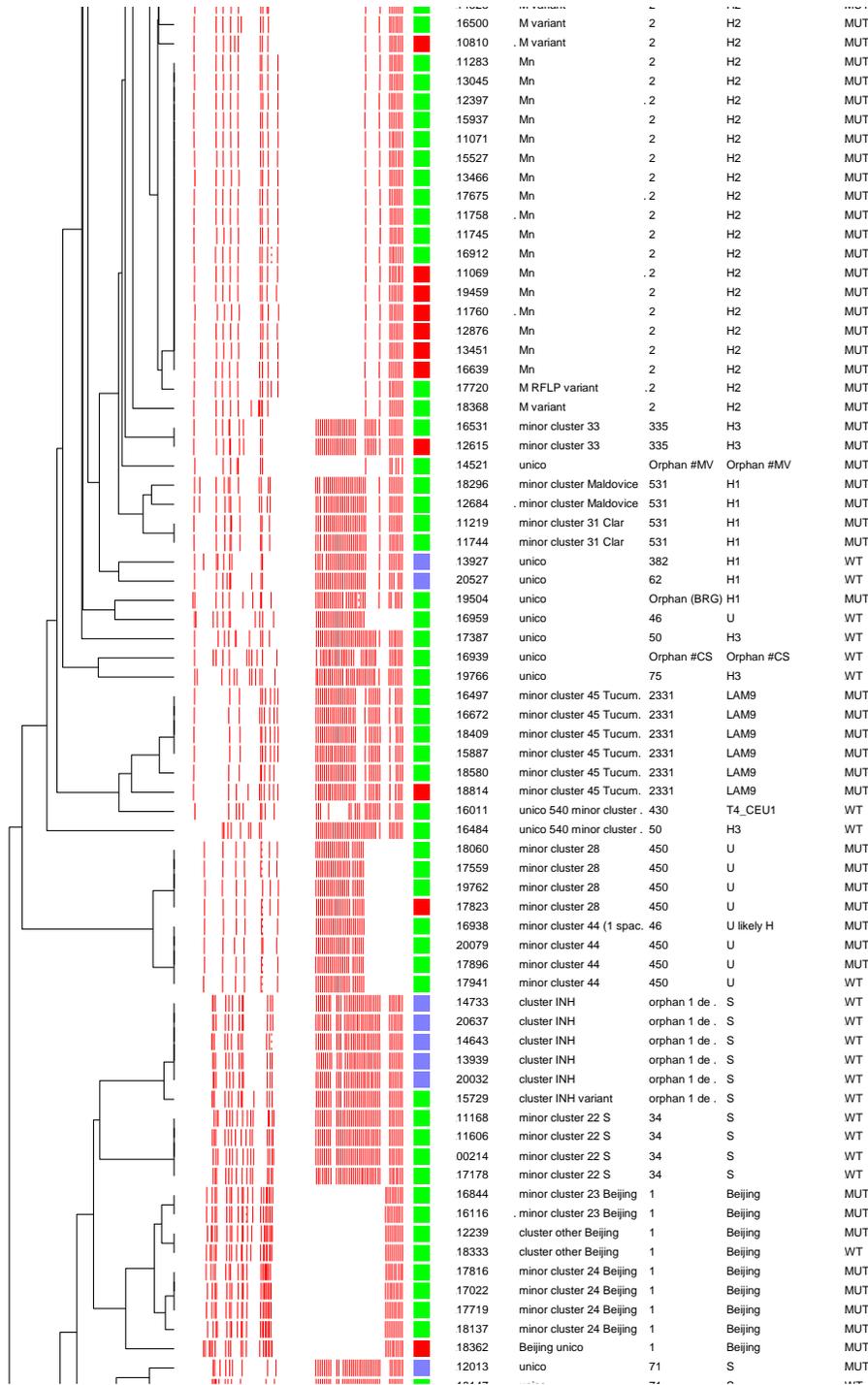
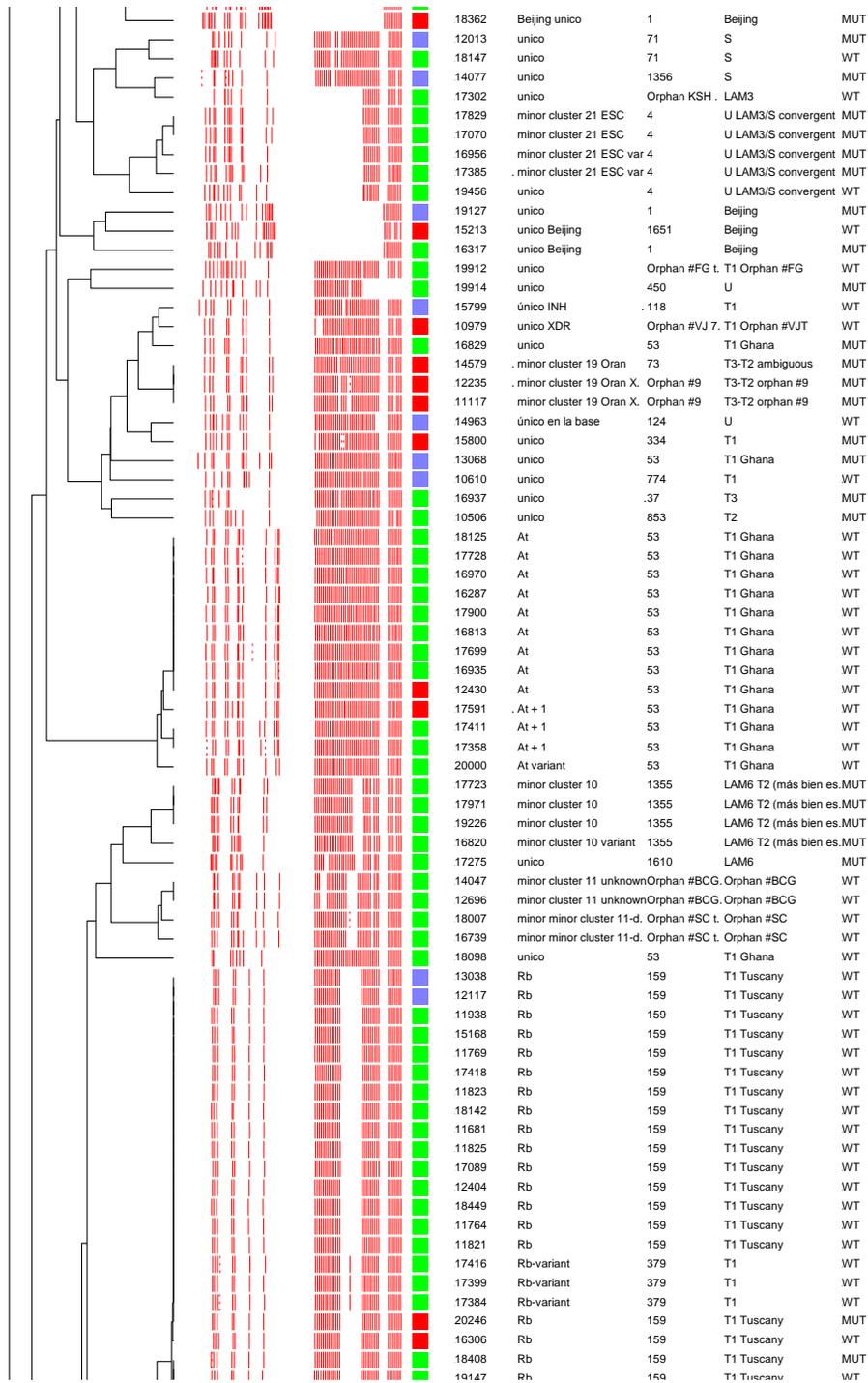
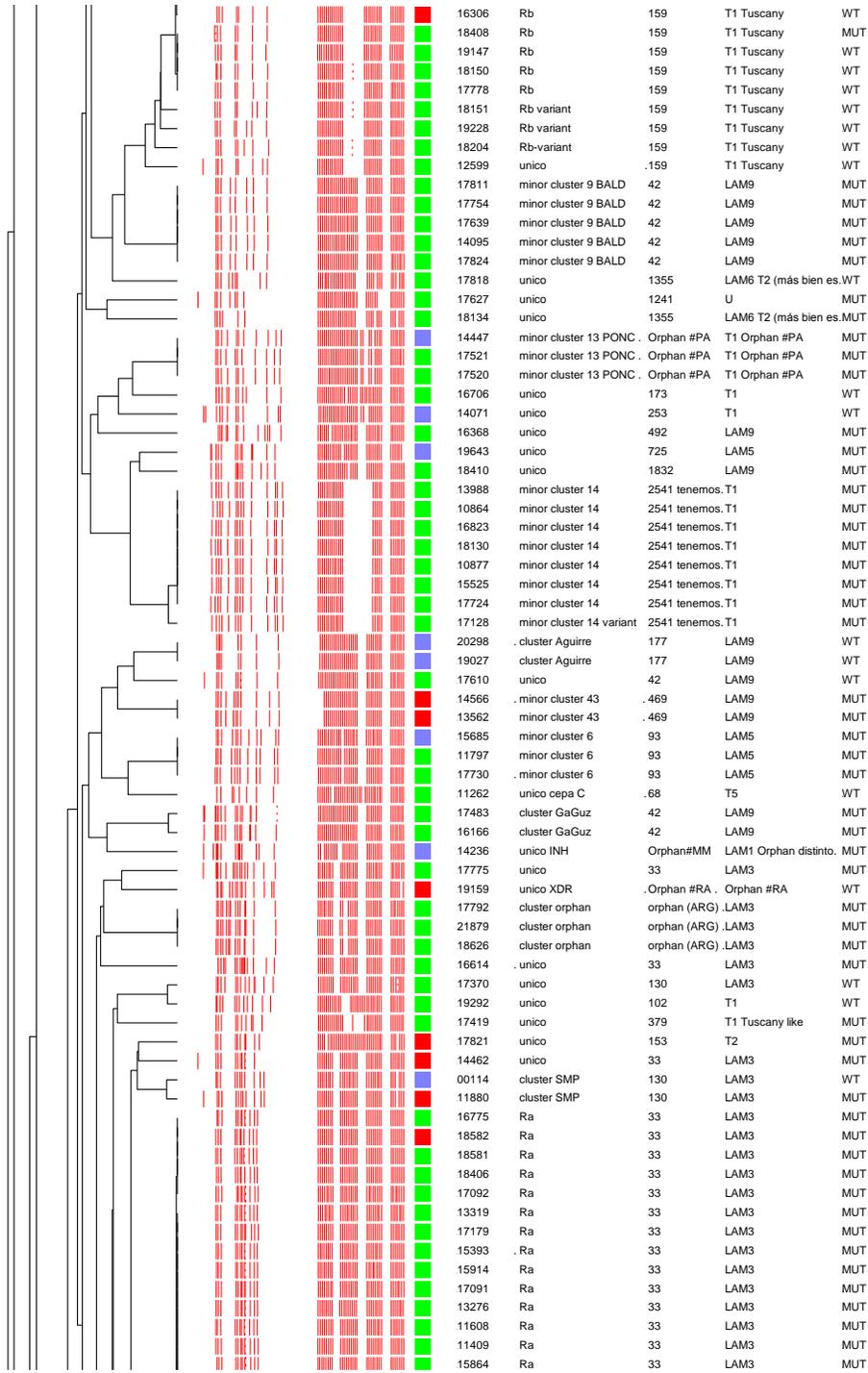


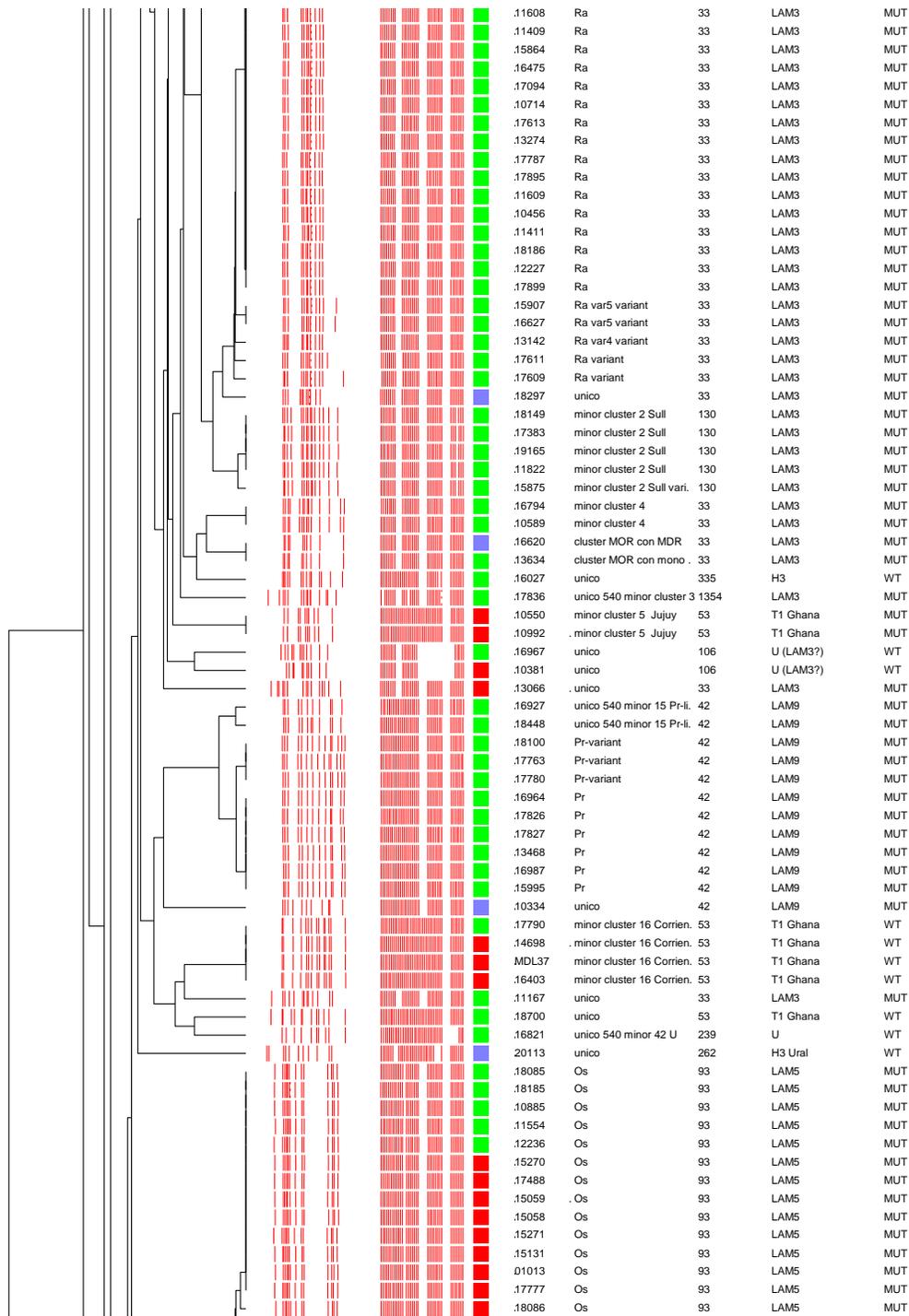
Figura S2. Dendrograma obtenido con el software BioNumerics v 5.1 según RFLP 6110 de 485 aislamientos resistentes a INH con genotipo disponible para análisis de clustering.

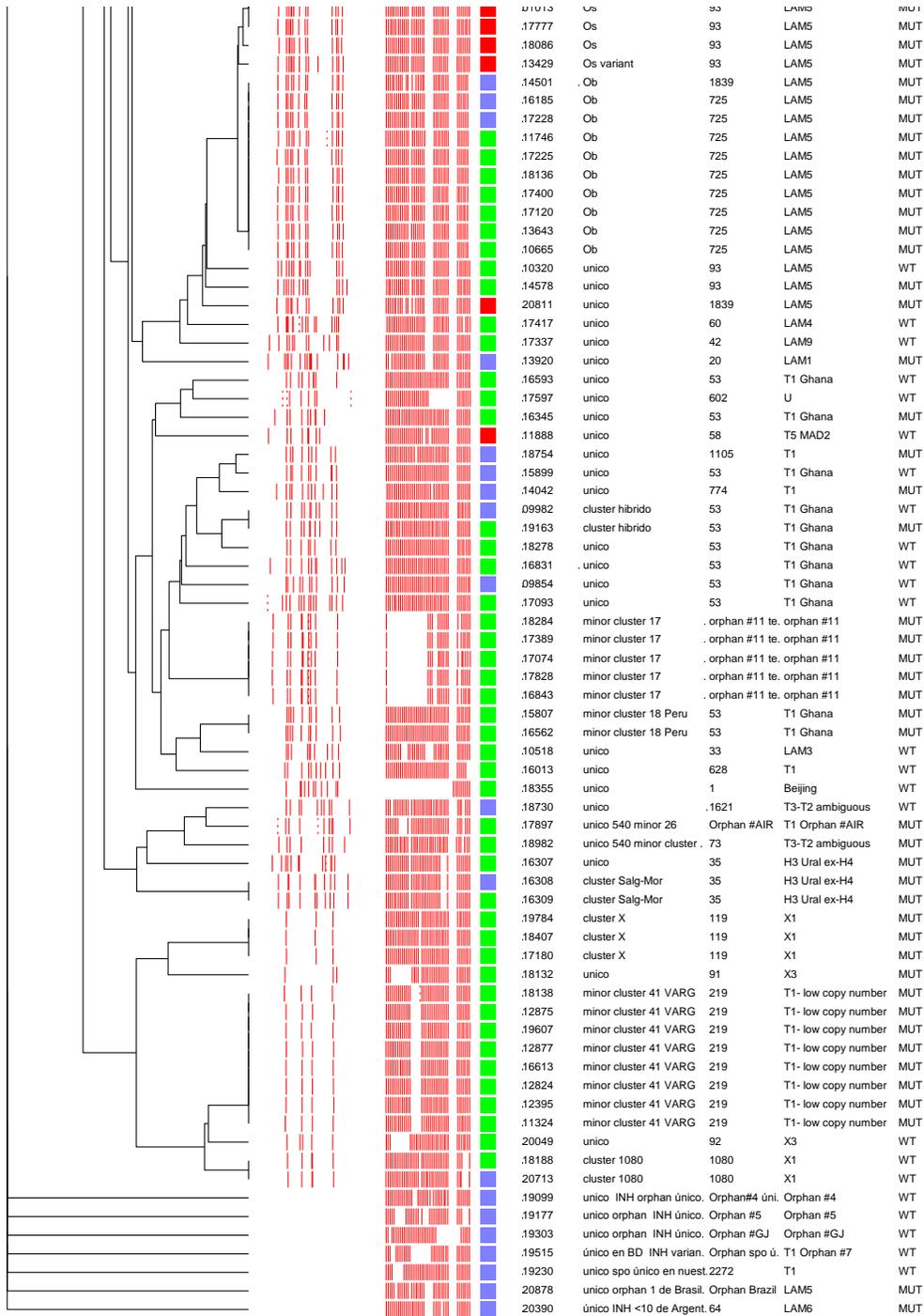












■ MDR

■ XDR

■ INH resistente (no MDR)