

ARTÍCULO ORIGINAL

Descripción de las mutaciones de *Mycobacterium tuberculosis* que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida detectadas mediante GenoType® MTBDRplus V.2 en Colombia.

Claudia Llerena, Raquel Medina

Grupo de Micobacterias, Dirección de Redes en Salud Pública,
Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La metodología de GenoType® MTBDRplus V.2 es una técnica molecular aprobada por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud para la detección de las mutaciones en el gen *rpoβ* del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales confieren resistencia a la rifampicina, y las de los genes *katG* e *inhA* que la confieren frente a la isoniacida. Debido a la variación genética en las cepas circulantes a nivel mundial, los programas nacionales de control de la tuberculosis deben comprobar el desempeño de los nuevos métodos de diagnóstico para su aplicación como prueba rápida.

Objetivo. Describir las mutaciones detectadas mediante la técnica GenoType® MTBDRplus V.2 en muestras pulmonares y aislamientos de *M. tuberculosis* procesados en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud durante el 2014.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio retrospectivo descriptivo que determinó la expresión de los genes *inhA*, *KatG* y *rpoβ* responsables de la resistencia a isoniacida y rifampicina, utilizando la técnica GenoType® MTBDRplus V.2 en 837 muestras y aislamientos de casos de tuberculosis.

Resultados. Se obtuvieron 689 resultados de pruebas: 581 (84,3 %) sensibles, 58 (8,4 %) resistentes y 50 (7,2 %) multiresistentes. Se detectaron diversas mutaciones en el gen *rpoβ*, de las cuales la más frecuente fue la Ser531Leu (36,6 %), seguida por la Asp516Val (21,6 %), en tanto que en el gen *katG* la más frecuente fue la Ser315Thr1 (91,9 %).

Conclusiones. Se detectaron varias mutaciones en los casos resistentes reportados en el país, con frecuencias similares a las reportadas en otros países de la región de América del Sur.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; resistencia a medicamentos; mutación; rifampicina; isoniacida.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3174>

Description of *Mycobacterium tuberculosis* mutations conferring resistance to rifampicin and isoniazid detected by GenoType® MTBDRplus V.2 in Colombia

Introduction: The GenoType®MTBDRplusV.2 assay is a molecular technique endorsed by the World Health Organization and the Pan American Health Organization that allows for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and the detection of mutations in the *rpoβ* gene for rifampicin resistance, and *katG* and *inhA* genes for isoniazid resistance. Due to the genetic variability in the circulating strains around the world, the national tuberculosis control programs should assess the performance of these new diagnostic technologies and their use under program conditions as rapid tests.

Objective: To describe the mutations identified by the GenoType®MTBDRplusV.2 assay in pulmonary samples and *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the *Laboratorio Nacional de Referencia* of the *Instituto Nacional de Salud* in 2014.

Materials and methods. We conducted a retrospective, descriptive study to detect the expression of *inhA*, *KatG* and *rpoβ* genes, responsible for resistance against isoniazid and rifampicin using the GenoType® MTBDRplus V.2 assay in 837 samples and isolates from tuberculosis cases.

Results: Several mutations in the *rpoβ* gene were identified. Ser531Leu was the most frequent (36.6%) followed by Asp516Val (21.6%), while Ser315Thr1 was the most frequent mutation in the *katG* gene (91.9%).

Conclusions: We were able to identify different mutations present in MDR-TB strains in the country, with frequencies similar to those reported in other countries in the South American region.

Keys words: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; drug resistance; mutation; rifampicin; isoniazid.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3174>

Contribución de los autores:

Claudia Llerena: concepción, diseño y desarrollo de los experimentos

Raquel Medina: análisis de los datos

Las dos autoras participaron en la escritura del manuscrito.

La aparición y diseminación de cepas resistentes a los principales fármacos disponibles para el tratamiento de la tuberculosis constituyen un gran problema para el control de la enfermedad a nivel mundial, debido al aumento de casos de tuberculosis multirresistente (TB-MDR), de aquellos causados por *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia *in vitro* a isoniacida y rifampicina, y de casos extremadamente resistentes (TB-XDR), en los cuales se presenta, además, resistencia a las fluoroquinolonas y a los medicamentos inyectables de segunda línea.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2014 se diagnosticaron 9,6 millones de casos nuevos de tuberculosis, de los cuales 480.000 serían multirresistentes, pero las dos estimaciones resultaron inferiores a los casos efectivamente notificados a nivel mundial (1). En ese mismo año, en Colombia se reportaron 12.824 casos de tuberculosis en todas sus formas, de los cuales 103 fueron multirresistentes y, dos, extremadamente resistentes (2,3).

En su plan de respuesta a esta amenaza, la OMS sugiere la implementación de pruebas de laboratorio rápidas para la tamización de la resistencia. En el 2008, recomendó el uso de métodos moleculares del tipo de sondas en línea, entre los cuales se cuenta la prueba comercial GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), con sensibilidad de 97 % y especificidad de 99 % para rifampicina, y de 90 % y 99 % para isoniacida en muestras pulmonares con baciloscopia positiva o aislamientos de *M. tuberculosis* en medios de cultivo sólidos o líquidos, con lo cual se obtienen resultados rápidos, en especial, cuando se trabaja directamente con muestras (4,5).

La metodología de GenoType® MTBDRplus V.2 se basa en la amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación inversa, lo cual permite detectar el complejo *M. tuberculosis*, y las mutaciones responsables de la resistencia a la rifampicina en el gen *rpoB* y las determinadoras de resistencia a la isoniacida en los genes *katG* e *inhA*. Esta técnica ha sido evaluada por los programas nacionales de control

de la tuberculosis en varios países de la región, pues, además de la presencia de resistencia, su uso permite determinar la variabilidad genética de *M. tuberculosis* a nivel mundial.

El diagnóstico de tuberculosis en Colombia se hace principalmente mediante baciloscopia y cultivo, según lo establecido por el Laboratorio Nacional de Referencia para la Red Nacional de Laboratorios. Desde el 2012, la Red ha venido incorporando los nuevos métodos moleculares y hoy el país cuenta con 22 laboratorios de salud pública y de instituciones prestadoras de servicios de salud que cuentan con este tipo de pruebas, así como el Laboratorio Nacional de Referencia, lo cual favorece la oportunidad en la detección de los casos resistentes.

El objetivo de este trabajo fue describir las mutaciones del gen *rpoB* que confieren resistencia a la rifampicina y las de los genes *katG* e *inhA* de resistencia a la isoniacida, detectadas mediante la técnica GenoType® MTBDRplus V.2 en muestras de esputo y aislamientos de *M. tuberculosis* procesadas en el Laboratorio Nacional de Referencia durante el 2014.

Materiales y métodos

Este es un estudio de tipo retrospectivo descriptivo.

Muestras de esputo

El Laboratorio Nacional de Referencia recibió 167 muestras de esputo para diagnóstico de tuberculosis resistente procedentes de 27 laboratorios de salud pública del país, las cuales se descontaminaron y se concentraron mediante el método de NaOH-N-acetil-L-cisteína. La baciloscopia se hizo con la coloración de Ziehl-Neelsen, cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y en medio líquido BBL™ MGIT™ (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), siguiendo las recomendaciones de los manuales de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para baciloscopia y cultivo sólido, y las indicaciones de la casa comercial (Becton-Dickinson) para el cultivo en medio líquido.

Aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*

Se recibieron 670 aislamientos de *M. tuberculosis* de muestras sembradas en los laboratorios de la Red según los protocolos y manuales de procesamiento de cada institución, los cuales deben enviarse a los laboratorios de salud pública y, de ahí, al Laboratorio Nacional de Referencia cuando hay crecimiento, para hacer la prueba de sensibilidad. Todos los resultados obtenidos

Correspondencia:

Claudia Llerena, Grupo de Micobacterias, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1260

cllerena@ins.gov.co

Recibido: 02/03/16; aceptado: 18/05/16

mediante la prueba molecular fueron confirmados por la técnica Bactec MGIT™, considerada como la prueba de referencia.

Extracción del ADN

El ADN se extrajo utilizando el estuche I GenoLyse® DNA Extraction, según instrucciones del fabricante.

Genotype MTBDR plus V.2

Se empleó la prueba siguiendo las instrucciones descritas en el inserto del estuche comercial. Para la amplificación por PCR se utilizó un termociclador de HAIN Lifesciences con los protocolos “MDR DIR” para muestras y “MDR CUL” para cultivos. La hibridación se hizo en un equipo Twincubator®. Se aplicaron controles internos para descartar contaminación con el ADN mediante la evaluación de los reactivos del GenoLyse y las condiciones previas de mezcla de la PCR.

En la prueba se emplean tiras de nitrocelulosa, las cuales tienen 23 sondas; las primeras tres son los controles internos de la prueba (control de conjugado, de amplificación y de detección del complejo *M. tuberculosis*). Para la detección de la resistencia a rifampicina, hay un control de locus y ocho sondas silvestres (*wildtype*, WT) que permiten analizar el segmento entre el codón 505 y el 533, y cuatro sondas específicas para las mutaciones (MUT): Asp516Val, His526Tyr, His526Asp y Ser531Leu. Para la identificación de la resistencia a la isoniácida de alto nivel hay un control de locus, una sonda silvestre que analiza el codón 315 del gen *katG* y dos sondas específicas para las mutaciones Ser315Thr1 y Ser315Thr2. Para determinar la resistencia a isoniácida de bajo nivel, hay un control de locus, dos sondas silvestres y cuatro sondas para las mutaciones C15T, A16G, T8C y T8A.

La lectura de los resultados de las pruebas, así como la interpretación de los patrones de bandas, se hicieron de forma visual utilizando la plantilla incluida en el estuche.

Análisis estadístico de los datos

Se recolectaron y analizaron los datos en una base de datos en Excel®, en la cual se registró el patrón de bandas observado.

Resultados

Se hicieron 837 pruebas, 670 de cultivos y 167 de muestras de esputo. Se obtuvieron 689 resultados de pruebas, de las cuales 581 (84,3 %)

resultaron sensibles, 58 (8,4 %), resistentes, y 50 (7,2 %), multirresistentes; 28 pruebas no pudieron interpretarse debido a irregularidades en el patrón de las bandas y en 120 no hubo amplificación del ADN (cuadro 1).

Mutaciones detectadas en los casos resistentes a rifampicina

Se consideraron como resistentes los patrones de bandas en los que hubo ausencia de una sonda silvestre y presencia de una sonda de mutación, y los patrones de bandas que presentaron ausencia de dos bandas silvestres sin mutación. En 60 de los aislamientos y muestras, se detectaron mutaciones resistentes a rifampicina.

Se observaron siete patrones de banda diferentes en las tiras de prueba, siendo la ausencia de WT8 y la presencia de MUT3 el patrón más frecuente (22 casos, 36,6 %), el cual corresponde a la mutación Ser531Leu. En 13 (21,6 %) de los aislamientos, se evidenció la ausencia de WT3 y de WT4 con presencia de MUT1, siendo este el segundo patrón más frecuente. Se observó un patrón de heterorresistencia en un aislamiento que presentaba todas las sondas WT y una sonda MUT3 (cuadro 2).

Cuadro 1. Resultados obtenidos con la prueba GenoType® MTBDRplus V.2

| Perfiles de resistencia | n | % |
|-------------------------------|-----|------|
| Sensibles | 581 | 84,3 |
| Resistencia a isoniácida (H) | 48 | 7 |
| Resistencia a rifampicina (R) | 10 | 1,4 |
| Tuberculosis multirresistente | 50 | 7,2 |
| Total de pruebas | 689 | 100 |

Cuadro 2. Patrones de bandas de resistencia a rifampicina

| Patrón | n | % | Mutación |
|---|----|------|-------------|
| Ausencia de WT8 y presencia de MUT3 | 22 | 36,6 | Ser531Leu |
| Ausencia de WT3 y WT4 y presencia de MUT1 | 13 | 21,6 | Aps516Val |
| Ausencia de WT7 y presencia de MUT2B | 11 | 18,3 | His526Tyr |
| Ausencia de WT7 y de presencia MUT2A | 6 | 10,0 | His526Asp |
| Ausencia de WT2 y WT3 sin mutación | 4 | 6,6 | Desconocida |
| Ausencia de WT3 y WT7 sin mutación | 2 | 3,3 | Desconocida |
| Ausencia de WT2 y WT7 sin mutación | 1 | 1,6 | Desconocida |
| Presencia de todas las WT y MUT 3 | 1 | 1,6 | - |
| Total | 60 | 100 | - |

Mutaciones detectadas en los casos resistentes a isoniacida

Se encontraron 98 aislamientos que presentaron resistencia a isoniacida. El 99 % de las mutaciones ocurrió en el gen *KatG*. El patrón más frecuente fue la ausencia de WT y la presencia de MUT1 en 90 aislamientos (91,9 %), el cual corresponde a la mutación Ser315Thr1 con resistencia de alto nivel. Se observó un patrón con ausencia total del gen *katG*, el cual se interpretó como resistente, y un aislamiento con mutación en el gen *inhA* y un patrón de ausencia de WT1 y presencia de MUT1, el cual corresponde a la mutación C15T (cuadro 3).

Resultados no interpretables

Se obtuvieron 28 pruebas con resultados no interpretables. Para rifampicina, se encontraron patrones de bandas que solo presentaban ausencia de una sonda WT y ausencia de sondas MUT, o con alguna sonda WT de poca intensidad en el color del revelado, es decir, muy tenue. Se observaron patrones con ausencia de WT8, WT7, WT6 y WT2, que tampoco fueron concluyentes.

Como parte de la metodología de procesamiento en el LNR, todas las pruebas moleculares se confirmaron con el sistema Bactec MGIT™, en tanto que en los casos no interpretables el reporte de resultados se hizo mediante el método convencional.

Aislamientos sin resultados de amplificación

En 18 aislamientos no se obtuvo la amplificación del ADN debido a que correspondían a otras especies de micobacterias y en 102 muestras de esputo registradas como positivas, se observaron pocos bacilos o fueron negativas en la baciloscopia.

Discusión

La implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis resistente y multirresistente es relativamente reciente en el país. Es importante que la Red Nacional de Laboratorios continúe promoviendo su adopción en aquellas instituciones que cuentan con la capacidad técnica y el recurso humano, pues este proceso de descentralización fortalece las actividades de detección y diagnóstico del programa, ya que se emplean métodos que cuentan con el aval de la OMS y la OPS por haber comprobado su idoneidad a nivel mundial y sus ventajas, tales como la rapidez en la obtención de resultados, aproximadamente seis horas en muestras con baciloscopia positiva. En aquellos casos con uno a nueve bacilos ácido-alcohol resistentes en 100 campos microscópicos

Cuadro 3. Patrones de bandas de resistencia a isoniacida

| | n | % | Mutación |
|-------------------------------------|----|------|-------------|
| Patrón en el gen <i>katG</i> | | | |
| Ausencia de WT y presencia de MUT1 | 90 | 91,9 | Ser315Thr1 |
| Ausencia de WT y presencia de MUT2 | 5 | 5,1 | Ser315Thr2 |
| Ausencia total del <i>katG</i> | 2 | 2,0 | Desconocida |
| Patrón en el gen <i>inhA</i> | | | |
| Ausencia de WT1 y presencia de MUT1 | 1 | 1,0 | C15T |

observados, o con baciloscopia negativa, no se recomienda el uso de esta prueba, ya que no se logra la amplificación del ADN. La implementación de este tipo de pruebas de forma rutinaria favorecería la tamización de la resistencia y, en consecuencia, el inicio del tratamiento adecuado.

En varios países se ha implementado este tipo de pruebas con base en los datos de concordancia con las técnicas convencionales y la frecuencia de las mutaciones evaluadas (6-9). La divulgación de tales resultados ha permitido compartir la información sobre la variabilidad genética de las cepas circulantes en las regiones del mundo, la presencia de diferentes mutaciones y si confieren resistencia a los fármacos o no. Por esta razón, es importante que las redes nacionales de laboratorios que decidan comenzar a aplicar estas técnicas evalúen la pertinencia de su uso, determinando si las mutaciones reconocidas corresponden a las mismas que el estuche comercial detecta para, así, validar su utilidad como método de diagnóstico (10).

Con respecto a la resistencia a la rifampicina, en este estudio se encontró que el 36,6 % (22/60) de los casos resistentes presentaban el patrón de ausencia de WT8 y presencia de MUT3, lo cual corresponde a la mutación Ser531Leu. Se observó, igualmente, el patrón de ausencia de WT3 y WT4 y presencia de MUT1 en 21,6 % (13/60) de las muestras, patrón que corresponde a la mutación Asp516Val, en tanto que en el 18,3 % (11/60) de las muestras se presentó el patrón de ausencia de WT7 y presencia de MUT2B, es decir, la mutación His526Tyr.

En estudios en otros continentes se ha evidenciado que la mutación Ser531Leu es la más frecuente, con porcentajes entre 41 y 73 % (11-13). En la región de las Américas, Chile, Argentina y Perú, reportan frecuencias entre 56 y 67 % (14,15). En Colombia, Ferro, *et al.*, registraron una frecuencia de 64 % para esta misma mutación en aislamientos provenientes de la región del Valle del Cauca (16).

Al comparar estos datos con los obtenidos en nuestro estudio, es claro que hay diferencias en las proporciones encontradas, lo cual demuestra que es necesario verificar la utilidad de estas pruebas como un ejercicio rutinario para decidir con respecto a su implementación como método de diagnóstico. Dicha evaluación debe considerar la epidemiología de la enfermedad, pues es posible que existan variaciones, incluso entre zonas con alta prevalencia de resistencia a fármacos, como puede verse por las diferencias entre los resultados de este trabajo y lo reportado por Ferro, *et al.* (16).

La resistencia a isoniacida se presentó en 99 % de los aislamientos debido a mutaciones en el gen *katG*, siendo la mutación Ser315Thr1 la más frecuente (91,9 %; 90/98). Al comparar estos datos con los obtenidos por Asencios, *et al.*, en Perú (15), donde la mutación en *katG* más frecuente fue la MUT1, con 71,2 % de los casos, los datos del presente estudio fueron similares en términos de frecuencia. En el estudio de Tessema (11), se encontró que el 100 % de las mutaciones estaban en la MUT1, lo cual coincide con lo reportado en el presente trabajo y resalta la variabilidad genética.

Solo se presentó un aislamiento con resistencia en el gen *inhA*. En otros estudios en la región de las Américas, esta mutación se ha reportado con poca frecuencia, sin embargo, es fundamental que los programas realicen un estudio más detallado de su prevalencia y relevancia dado que el profesional clínico debe definir un esquema de tratamiento del caso con base en tales resultados (14,15).

Se reportaron 23 (3,34 %) casos no interpretables en cuanto a su resistencia a rifampicina debido a la ausencia de una sonda WT (WT8, WT7, WT6 y WT2) y de la sonda MUT, lo cual sugiere la presencia de mutaciones en el gen *rpoB* que no están presentes en la tira reactiva de este estuche comercial, y plantea la necesidad de hacer estudios para determinar mejor su frecuencia. Alonso, *et al.* (17), reportaron que la ausencia de la WT3 sin mutación puede presentarse cuando hay mutaciones silenciosas; puesto que esta es una de las limitaciones de los métodos estudiados, en estos casos es fundamental hacer una prueba fenotípica, idealmente con técnicas de secuenciación para determinar si se trata de mutaciones poco frecuentes y cuál es su relevancia clínica.

En Colombia, se identificaron diversas mutaciones del gen *rpoB* que generaban resistencia a la rifampicina, de las cuales la más frecuente fue la

Ser531Leu, aunque en menor porcentaje que en otros países. En cuanto a la resistencia a isoniacida, la mutación más común asociada a la resistencia de alto nivel fue la Ser315Thr1 en el gen *katG*.

Con estos datos puede concluirse que la técnica de GenoType® MTBDR_{plus} V.2 permite reconocer las mutaciones más frecuentes asociadas a la resistencia y que, en los casos con resultados no interpretables, debe considerarse la confirmación mediante pruebas fenotípicas e incluir también a aquellos pacientes cuya evolución clínica y bacteriológica sugiere resistencia.

Una característica importante de *M. tuberculosis* es que los mecanismos de su resistencia a los fármacos no están completamente descritos y, aunque la presencia de mutaciones es el principal, deben considerarse otros como las bombas de expulsión activa, en el cual el diagnóstico de farmacoresistencia solo se logra mediante una prueba convencional (18).

Se evidencian, así, nuevas oportunidades de investigación para evaluar las mutaciones que no se habían detectado antes, así como su relevancia clínica para el país.

Agradecimientos

A los profesionales y al equipo de apoyo técnico-administrativo del Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no haber tenido ningún conflicto de intereses.

Financiación

El estudio se financió con los recursos del Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. **World Health Organization.** Global tuberculosis control WHO report – 2015. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1
2. **Instituto Nacional de Salud.** Informe final, tuberculosis, Colombia - 2014. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202014.pdf>
3. **Instituto Nacional de Salud.** Tuberculosis farmacoresistente nuevo evento de notificación obligatoria – 2014. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/Noticias/Memorias%20Reunin%20Nacional%20de%20Vigilancia%20y%20Control%20e/2-3-TB%20resistente.pdf>

4. **World Health Organization.** The Global MDR-TB and XDR-TB response plan 2007-2008. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/2007/global_response_plan.pdf
5. **World Health Organization.** Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement - 2008. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf
6. **Imperiale B, Zumárraga M, Weltman G, Zudiker R, Cataldi A, Morcillo M.** First evaluation in Argentina of the GenoType®MTBDRplus assay for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* detection from clinical isolates and specimens. *Rev Argent Microbiol.* 2012;44:283-9.
7. **Lacoma A, García N, Prat C, Ruiz J, Haba L, Rosés S, et al.** GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3660-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00618-08>
8. **Akpaka P, Shirematee B, Clarke D, Lorraine F, Rastogi N.** Evaluations of methods for rapid detection of resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in the Caribbean. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3426-8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01455-08>
9. **Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Simak T, Malomanova N, Fedorin I, Drobniewski F.** Performance of the Geno Type®MTBDRplus assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation. *BMC Clin Pathol.* 2009;9:1-9. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6890-9-2>
10. **Filliol I, Driscoll J, van Soolingen D, Kreiswirth B, Kremer K, Valétudie G, et al.** Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1347-9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0811.020125>
11. **Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff A.** Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2012;12:1-7. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-12-37>
12. **Zhang L, Ye Y, Duo L, Wang T, Song X, Lu X, et al.** Application of GenoType® MTBR plus in rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volume laboratory in Southern China. *Mol Biol Rep.* 2011;38:2185-92. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0347-0>
13. **Tracevska T, Jansone I, Broka L, Marga O, Baumanis V.** Mutations in the *rpoB* and *katG* genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3789-92. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.10.3789-3792.2002>
14. **Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, Leiva T, Sccapatticio A.** Detección de mutaciones asociadas a cepas multidrogresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en Chile. *Rev Med Chile.* 2011;139:467-73. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000400008>
15. **Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, et al.** Prueba molecular GenoType® MTBDR plus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogresistente. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2012;29:92-8.
16. **Ferro B, García P, Nieto L, Soolingen D.** Predictive value of molecular drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Valle del Cauca Colombia. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2220-4. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00429-13>
17. **Alonso M, Palacios J, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E.** Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2688-90. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00659-11>
18. **Coll P.** Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27:474-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.010>