

ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis bacteriológico y molecular de *Mycobacterium tuberculosis* rifampicina resistente aislados en siete regiones de Bolivia

Molecular and bacteriological analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from seven regions of Bolivia

Aneth María Vasquez Michel, Mirtha Camacho, Julia Molina Orihuela

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Unidad de Bioquímica Molecular. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés.

Dirección para correspondencia: Aneth Vasquez Michel, Av.Saavedra S/N, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Telf: 70103933

E mail: anethvasquez@ gmail.com

Recibido para publicación en 28/10/11

Aceptado en 26/12/11

RESUMEN

La tuberculosis continúa siendo una enfermedad de importancia a nivel mundial. Aquella enfermedad que una vez fue considerada como erradicada en los países industrializados hoy renace con mayor fuerza causada por cepas drogo-resistentes. Este trabajo representa un estudio de 66 cepas resistentes y 71 sensibles de *Mycobacterium tuberculosis* en 7 regiones de Bolivia. Los objetivos fueron (i) evaluar los perfiles fenotípicos de resistencia de estos aislamientos, (ii) evaluar un método de genotipificación basado en hibridación; y (iii) asociar las mutaciones más frecuentes en el gen *rpoB* con la distribución geográfica y la condición clínica de los pacientes. El test de susceptibilidad fenotípico, fue realizado por el método de las proporciones. El ensayo de genotipificación fue de hibridación con sondas. El análisis de los perfiles de susceptibilidad reveló 10% de cepas monoresistentes a RIF: el resto de estas, también presentaron resistencia a Isoniacida, de estas últimas 15% fueron resistentes a estreptomycin y 2% a Etambutol; 8% resistentes a las 4 drogas de primera línea; se encontraron 1,5% de cepas poliresistentes. El análisis estadístico de test diagnóstico para la evaluar la efectividad del ensayo refirió una sensibilidad de 79% y una especificidad de 94%. La concordancia entre ambos métodos fue de 0,75. 25% de las cepas expresaron mutaciones indeterminadas, entre las restantes, las mutaciones más frecuente en relación a la distribución geográfica fueron S531L (MUT3) 59% y menos frecuente H526D (MUT2B) 4%. En cuanto a las condiciones clínicas las más frecuentes fueron: fracaso

terapéutico 50%, de estas 25% presentaron mutaciones nuevas, recaída en 25%, donde 86% presentaron mutaciones conocidas y 14 % mutaciones nuevas.

Este ensayo además de ser bastante confiable en cuanto a diagnóstico y determinación de susceptibilidad, permite encontrar mutaciones específicas, datos que podrían colaborar al desarrollo de fármacos y vacunas nuevas para adelantarse a los nuevos genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* que emergerán a corto o largo plazo.

Palabras Clave: Rifampicina, genotipo, fenotipo, mutación, susceptibilidad, hibridación, resistencia, sensibilidad, especificidad.

ABSTRACT

Tuberculosis remains an important disease worldwide, this disease once considered eradicated in industrialized countries today is reborn with more force caused by drug-resistant strains. This work represents a study of 66 resistant and 71 sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* in 7 regions of Bolivia. The objectives were (i) to assess the phenotypic profiles of resistance of these isolates, (ii) to evaluate a method of genotyping (iii) to associate the most frequent mutations in *rpoB* gene with the geographical distribution and the clinical condition of patients. The phenotypic susceptibility testing was performed by the proportions method. The genotyping assay was done by probe hybridization. The susceptibility profiles revealed 10% of RIF mono-resistant strains, the rest of these strains were also resistant to isoniazid, 15 % of the last ones were also

resistant to streptomycin, 2% to ethambutol and 8% were resistant to the 4 first line drugs. Besides, we found 1.5% poliresistant strains. The diagnostic test analysis to assess the effectiveness of the assay reported a sensitivity of 79% and a specificity of 94%. The concordant value between both methods was 0.75.

25% of the strains, expressed indeterminate mutations, among the 75% remaining, the most frequent mutations in relation to geographical distribution were S531L (MUT3) 59% and less frequent H526D (MUT2B) 4%. With regard to the clinical conditions the most frequent were treatment failure 50%, 25% of these presented new mutations, relapse in 25%, 86% showed known mutations and 14% new mutations.

This assay has demonstrated enough reliability in terms of diagnosis and determination of susceptibility, this would allow us to find specific mutations, data that might collaborate to develop new drugs and vaccines to new *Mycobacterium tuberculosis* genotypes.

Key Words: Rifampicin, genotype, phenotype, mutation, susceptibility, hybridization, resistance, sensitivity, specificity.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) continúa siendo una enfermedad de importancia a nivel mundial, aquella enfermedad que una vez fue considerada como erradicada en los países industrializados hoy renace con mayor fuerza causada por cepas drogo-resistentes. En los países en vías de desarrollo se ha convertido en una plaga implacable.

El alto índice de migraciones y de los casos de infección por el virus de inmunodeficiencia humana en los últimos años, ha contribuido a la diseminación generalizada de este mal. En consecuencia la Organización mundial de la Salud ha declarado a la TB como emergencia global en salud¹. A pesar de los continuos esfuerzos por mejorar los programas de control de TB tanto a nivel nacional como internacional, recientes encuestas revelan que la TBMDR, está aún presente y las tasas de infección son alarmantemente altas en muchos países.²

Aunque la Multidrogo-resistencia (MDR-TB) se define como resistencia al menos a Isoniacida (INH) y Rifampicina (RIF), la clave determinante de fallas en el tratamiento la constituye la resistencia a RIF. La monoresistencia a esta droga es rara y al menos 90 % de todos los aislamientos resistentes a RIF son también resistentes a Isoniacida³. Por lo tanto un resultado de resistencia a RIF, podría predecir con mucha utilidad si una cepa es o no multidrogo resistente.

Ya que la ejecución del test de susceptibilidad convencional requiere de 2 a 4 semanas luego del aislamiento primario, se necesita con mucha urgencia el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas para este fin,

que permitan obtener perfiles de sensibilidad rápidos y confiables para apoyar al diagnóstico convencional

En cepas resistentes a RIF se ha visto que de 95-98% está dada por mutaciones espontáneas en el gen *rpoβ*, que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa, la RIF interactúa específicamente con la RNA polimerasa procarionta para inhibir la transcripción, lo cual lleva a una muerte celular, las mutaciones específicas en *rpoβ* producen resistencia a la droga disminuyendo la afinidad de unión de la RIF a la RNA polimerasa^{4,5}

Este trabajo, representa el resultado de un estudio de 66 cepas resistentes y 71 sensibles de MTB que fueron aisladas en 7 regiones de Bolivia entre los años 2007 y 2009. Los objetivos de este estudio fueron (i) evaluar los perfiles fenotípicos de resistencia de estos aislamientos, (ii) evaluar un método de genotipificación rápido para la detección de mutaciones basado en un ensayo de sondas; y (iii) asociar las mutaciones más frecuentes en el gen *rpoβ* tanto con la distribución geográfica como con la condición clínica de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio. Para el presente trabajo se escogió un test diagnóstico que permitió evaluar los parámetros de la sensibilidad y especificidad en base al paquete informático Epi-Info EPI-INFO versión 6.0 tomando en cuenta los siguientes datos: Intervalo de confianza estimado 95%, por tanto se acepta un error tipo I del 5%; además de los valores predictivos positivos y negativos. Se tomó como patrón de oro (gold standard) la caracterización fenotípica por los métodos de cultivo para determinar si una cepa pertenece o no al CMBT. Finalmente el método de las proporciones Cannetti Rits⁶ para determinar los perfiles de susceptibilidad a drogas. Asimismo, se utilizó el cálculo de índice Kappa para determinar la concordancia entre ambos métodos.

Cepas de *M. tuberculosis*. Las cepas para este estudio fueron enviadas a partir del segundo semestre del 2008 por el Laboratorio de Referencia Nacional de Diagnóstico de Tuberculosis (INLASA) de la ciudad de La Paz, provenientes de 7 regiones de Bolivia (Ver Tabla 1): La Paz, Santa Cruz, Cochabamba, Potosí, Tarija, Chuquisaca y Yacuiba. Las cepas utilizadas tuvieron un perfil de resistencia fenotípico previamente caracterizado, por el método Cannetti Rist⁶. El procesamiento molecular de las muestras se llevó a cabo en la unidad de Bioquímica Molecular del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Se trabajó con un total de 137 cepas, 66 resistentes tanto a RIF como a otros antituberculosos y 71 controles.

Tabla 1. Cepas enviadas al Laboratorio de Referencia Nacional (INLASA), provenientes de siete regiones de Bolivia

Número de aislados		
Lugar de aislamiento	RIF. Resistente	RIF. Sensible
Sucre	4	1
La Paz	16	11
Cochabamba	16	20
Santa Cruz	20	35
Potosí	2	0
Tarija	8	2
Yacuiba	0	2
Total	66	71

Test de susceptibilidad a drogas. Para el test de susceptibilidad a RIF fue utilizado el método de las proporciones con Lowestein Jensen en tubo, que fueron incubados a 37°C. Se hizo una lectura preliminar a las 3 semanas y una lectura final a las 4 semanas, Se comparó con el medio control inoculado con una dilución 1:10,000, el punto de corte fue 1%. El número de cepas de CFU rifampicina resistentes fue comparado con el medio control inoculado con una dilución 1:10,000, el punto de corte fue 1%.

Ensayo de hibridación con sondas. El procedimiento completo se dividió en tres pasos: aislamiento de ADN obtenido de cultivos, amplificación multiplex con primers marcados con biotina (constituida por 35 µl de oligonucleótidos, 5 µl de buffer 10 X, con 2mM de MgCl₂, 1 a 2 U de taq polimerasa y extracto de DNA cromosomal); y una hibridación reversa que incluyó desnaturalización química del producto a amplificar, hibridación de los amplicones en un sola cadena, marcados con biotina, a sondas unidas a la membrana, lavado astringente, adición de conjugado de fosfatasa alcalina/ estreptavidina. La hibridación y detección de las mutaciones fue realizado en un agitador automatizado BOECO.

Análisis e interpretación de resultados.- El análisis de los resultados se realizó mediante plantillas suministradas por el fabricante (HAIN LIFESCIENCE).

En caso de una mutación, el respectivo amplicón no se uniría a la correspondiente sonda WILD TYPE, indicando por lo tanto resistencia de la cepa testada al respectivo antibiótico.

RESULTADOS

(i) Patrones fenotípicos de susceptibilidad a drogas de primera línea

De los 137 aislamientos mostrados, el 100% fueron positivos para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El análisis de los perfiles de susceptibilidad reveló 14 (10%) cepas monoresistentes a RIF: el resto de las cepas resistentes a RIF, también presentaron resistencia a Isoniacida 52 (38%), de estas últimas 20(15%) fueron resistentes también a estreptomycin y 3 (2%) a Etambutol; 11(8%) resistentes a las 4 drogas de primera línea; además se encontraron 2 cepas poli-resistentes que representan el (1,5%).

Finalmente estuvieron las cepas monoresistentes a otros antituberculosos de primera línea diferentes a RIF 33 (24%) y las cepas sensibles 12 (9%) y pansusceptibles 26 (19%). Ya que una cepa de MTB es definida como MDR cuando es resistente tanto a RIF como a INH, aproximadamente el 38% de los aislamientos RIF resistentes estudiadas fueron MDR (Tabla 2)

Tabla 2. Perfil de resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* fenotipificadas en el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), La Paz-Bolivia

	Perfil de resistencia (método proporciones)	Nº de cepas (%)
MDR	INH, RIF	18 (13.14)
	INH, RIF, SM	20 (14.59)
	INH, RIF, EMB	3 (2.20)
	INH, RIF, SM, EMB	11 (8.03)
Mono-resistentes	RIF	12 (8.75)
	INH	19 (13.87)
Poli-resistentes	RIF, SM	1 (0.73)
	RIF, SM, PR	1 (0.73)
	INH, SM	9 (6.57)
	INH, SM, EMB	2 (1.46)
	INH, SM, PR	3 (2.20)
Sensibles	Sensibles a INH y RIF	12 (8.75)
Pansusceptibles		26 (18.98)

INH: Isoniacida, RIF: Rifampicina, SM: Estreptomina, EMB: Etambutol, PZ: Pirazinamida

(ii) Evaluación del método de hibridación

Paralelamente al análisis genético molecular de las 137 cepas por el método de hibridación, se realizó el análisis estadístico de test diagnóstico para la evaluar la efectividad del ensayo y detectar cepas resistentes a Rifampicina, tomando como referencia al gold estándar

mundial que fue el método de las proporciones o Canneti-Rist.⁶

El análisis refirió los siguientes resultados: concordancia 0,75; sensibilidad de 79%, especificidad de 94%, valores predictivos positivos 93 %, valores predictivos negativos 84% . Los resultados de la comparación entre ambos métodos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la comparación entre el método genotípico y el método de las proporciones en Lowenstein-Jensen en 137 aislamientos

Resultados Aislamientos INLASA	Número de aislamiento		
	Resultados Genotype MTBDRplus		Falla en controles de hibridación
	Mutaciones (+)	Mutaciones (-)	
RIF Resistente (n=14)	10	4	0
INH Resistentes (n=33)	19	12	0
MDR (n=52)	36	16	0
Sensibles (n=39)	2	38	1

(iii) Hallazgos genético-moleculares en cepas Rifampicina resistentes:

(a) Asociación de los hallazgos moleculares con la distribución geográfica. Este análisis se lo realizó sólo tomando en cuenta las cepas resistentes a RIF por el método molecular, es decir sólo con aquellas cepas que presentaron alguna mutación en el ensayo.

Un total de 56 cepas presentaron perfil genotípico de resistencia a Rifampicina, las cuales expresaron una

mutación en la región de 81 pb del gen *rpoB*, facilitando así en forma rápida un acercamiento convencional para detectar la resistencia a la Rifampicina y/o a MDR. De estas, 14(25%) expresaron mutaciones indeterminadas, entre las 42 restantes, las mutaciones más frecuentes y en relación a la distribución geográfica, se encontraron en las posiciones S531L (MUT3) 59% (33/56); H526Y (MUT2A) 7% (4/56), D516V (MUT1) 5% (3/56) y la menos frecuente se encontró en la posición H526D (MUT2B) 4% (2/56). (Tabla 4)

Tabla 4. Distribución Geográfica de Mutaciones en el Gen *rpoβ* en Siete Regiones de Bolivia

Mutación <i>rpoβ</i>	Sucre	La Paz	Cbba	Santa Cruz	Potosí	Tarija	Yacuiba	Total
D516V (MUT1)	0	0	0	3	0	0	0	3
H526Y (MUT2A)	1	0	2	1	0	0	0	4
H526D (MUT2B)	0	0	1	1	0	0	0	2
S531L (MUT3)	2	8	7	8	2	6	0	33
Indeterminado	1	6	4	1	0	2	0	14
Total	4	14	14	14	2	8	0	56

(b) Asociación de los hallazgos moleculares con la condición clínica de los pacientes. Finalmente, se obtuvieron resultados de una posible aproximación

entre la condición clínica del paciente y las mutaciones encontradas (Tabla 5).

Tabla 5. Relación entre condición clínica y mutaciones detectadas en el gen *rpoβ* de cepas de *M. tuberculosis* genotipificadas en la FCFB, La Paz-Bolivia 2010

Mutación <i>rpoβ</i>	Fracaso terapéutico	Recaída	Abandono	Caso contacto	Control de tratamiento	Otro	Total
D516V (MUT1)	0	2	1	0	0	0	3
H526Y (MUT2A)	3	1	0	0	0	0	4
H526D (MUT2B)	0	1	0	0	0	1	2
S531L (MUT3)	18	8	0	3	3	1	33
Indeterminado	7	2	0	2	2	1	14
Total	28	14	1	5	5	3	56

De las diferentes condiciones clínicas en las cuales los pacientes se encontraron al momento de realizar este ensayo las más frecuentes fueron, fracaso terapéutico 28(50%), de estas 75%, presentaron mutaciones previamente descritas en otros estudios y 25% mutaciones indeterminadas nuevas, seguido por recaída en 14 (25%), donde 86% presentaron mutaciones conocidas y 14 % mutaciones nuevas.

En lo referente a contacto y abandono 9% y 2% de casos respectivamente, el resto se derivaron como control de tratamiento.

DISCUSIÓN

(i) Patrones fenotípicos de susceptibilidad a drogas de primera línea

La rifampicina es el antibiótico más potente usado para el tratamiento de la TB, tiene actividad bactericida contra bacilos tuberculosos tanto extracelulares como aquellos casi inactivos que residen dentro del macrófago. En el caso de las cepas drogo susceptibles el uso combinado de drogas antituberculosas de primera

línea, RIF, INH, ETB Y PNZ, generalmente resultan en remisión exitosa de la enfermedad⁷.

La RIF e INH son las más activas de las drogas de primera línea y las MTB que son resistentes a ambas drogas son MDR². En general la drogo resistencia es adquirida en dos pasos, el primer paso es la adquisición de resistencia a INH más que a RIF⁸, lo cual sugiere que la resistencia a RIF puede ser un marcador clave para la detección de MDR- TB⁹. En nuestro estudio según el genotipo, 46 cepas fueron resistentes a RIF, de las cuales 36 también presentaron resistencia a INH, con lo cual se confirmaría que RIF es un buen predictor de MDR para estudios de susceptibilidad en Bolivia.

(ii) Evaluación del método de genotipificación para susceptibilidad a Rifampicina

Los resultados del presente estudio mostraron que el ensayo de sondas es fácil de realizar y tiene la capacidad de detectar rápidamente resistencia no sólo a RIF sino también a INH, por lo tanto demuestra alta capacidad de detección de cepas MDR- TB. Como lo muestran otros estudios de hibridación con sondas^{10,11}, éste es un

ensayo molecular confiable para determinar perfiles de susceptibilidad a RIF, los mismos que son distintos en función a los patrones de mutaciones encontrados, dichos patrones nos indican en muchos casos si la resistencia es a altas o a bajas concentraciones de la droga¹².

El ensayo confiere un protocolo simple que es compatible con el flujo de trabajo de rutina de los laboratorios de TB y puede ser completado en 24 horas. Con respecto a la concordancia de este método genotípico con el método de las proporciones convencionales (fenotipo), la detección de resistencia RIF según cálculos de índice kappa es de 0,75 que entra dentro de los límites óptimos de permisibilidad de un método¹³.

Los resultados del presente estudio, indican una alta sensibilidad (éxito en la amplificación de todas las cepas) para una rápida detección del CMTB (100%) y para mutaciones en el gen *rpoB* (79%). Asimismo, se observa una especificidad bastante alta de 94%, tal como lo revelan otros estudios a nivel mundial^{13,14}.

(iii) Hallazgos genético-moleculares en cepas Rifampicina resistentes

(a) Asociación de los hallazgos moleculares con la distribución geográfica. La frecuencia de mutaciones encontradas en este estudio es similar a la compilada en 478 aislamientos de cepas resistentes a RIF en varias partes del mundo, en los cuales la frecuencia de sustitución en los codones 531 y 526 fueron de 41 y 36% respectivamente^{13, 14,15}

Sin embargo llama la atención el hallazgo de una cantidad importante de cepas 14 (25%), que presentaron mutaciones indeterminadas, es decir diferentes a las encontradas en otras investigaciones, hecho sumamente importante debido a que esto nos indica que en nuestro medio existe variabilidad genética en cuanto a la resistencia a RIF indicador de que a mayor variabilidad mayor la tendencia a encontrar nuevos casos.

(b) Asociación de los hallazgos moleculares con la condición clínica del paciente. Al parecer, teóricamente la condición clínica de los pacientes no tiene relación alguna con la presencia o no de mutaciones específicas. Este estudio lleva a analizar concretamente el caso de los fracasos terapéuticos que constituyen el mayor porcentaje de casos clínicos que derivan en resistencia a RIF, sin embargo, el hallazgo de ciertas mutaciones más frecuentes que otras daría a entender que la diseminación de ciertas cepas no está siendo controlada.

En conclusión, éste ensayo además de ser bastante confiable en cuanto a diagnóstico y determinación de susceptibilidad, permite encontrar mutaciones específicas y nuevas, los cuales son datos muy

importantes para una orientación directa acerca de la evolución que tendrá no solo la bacteria como tal, si no, también ayuda a predecir la evolución de la resistencia en Bolivia. De este modo, se permite el desarrollo de fármacos y vacunas nuevas para que Bolivia adelante a los nuevos perfiles de *Mycobacterium tuberculosis* que emergerían a corto o largo plazo.

REFERENCIAS

1. Organización mundial de salud. Control global de tuberculosis: supervisión, estudio, financiamiento. Reporte de la OMS 2009. WHO/HTM/TB/2009. Ginebra, OMS, 2009.
2. Mendez P, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F. Global surveillance for antituberculosis drug resistance, in the world, 1994-1997. *N Engl J Med.* 1998; 338:1641-9
3. Drobniewski FA and Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a molecular story. *J Med Microbiol.* 1998; 47:189-196.
4. Ramaswamy S and Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc. Lung Dis.* 1998; 79:3-29.
5. Sintchenko V, Chew WK, Jelfs PJ, and Gilbert GL. Mutations in *rpoB* gene and rifabutin susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *Pathology.* 1999; 31:257-260.
6. Canetti G, Rist N, Grosset J. 1963. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires pour le method des proportions. *Rev Tuberc (PARIS).* 27:217-72.
7. Ashor R, Awdhesh K. and Nishat A. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *All India Institute of Medical Sciences.* 1998; 4(2): 195-209.
8. Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orru G, Thoresen OF, Ricci ML, Oggioni MR, Fattorini L, and Orefici G. *rpoB* mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin. Microbiol.* 1999; 37:1197-1199.
9. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, and Wang H. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol.* 2001; 41:2209-2212.
10. Bang D, Andersen AB, and Thomsen BO. Rapid genotypic detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2605-2608
11. Makinen J, Marttila HJ, Marjamaki M, Viljanen MK, and Soini H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(2):350-352.
12. Valim AR, Rossetti MR, Ribeiro MO, and Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant

- Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. J Clin Microbiol. 2000; 38:3119–3122.
13. Silva S y Gonçalves J. Evaluacion de pruebas de diagnóstico. Instituto de Patología Tropical y Salud Pública. 2003; 3: 5-17.
 14. Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, and Cirillo DM. Use of GenoType MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. J Clin Microbiol. 2006; 44:2485–2491.
 15. Yuen LK, Leslie D, and Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. J Clin Microbiol. 1999; 37:3844–3850.