

Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión

Genotyping methods for *Mycobacterium bovis*. Review

Rosalinda Acosta-Salinas^a, Ciro Estrada-Chávez^b, Feliciano Milián-Suazo^c

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una zoonosis que produce grandes pérdidas a la economía de muchos países y constituye un problema de salud pública. Su epidemiología resulta muy compleja debido a que se trata de una bacteria de lento crecimiento, que puede permanecer de forma latente y afectar a diversas especies animales, incluyendo fauna silvestre que funge como reservorio. Por este motivo en todo el mundo existe la necesidad de genotipificar de manera precisa las cepas de *M. bovis* y rastrear el origen de la infección. En la actualidad existen técnicas de genotipificación sustentadas en marcadores genéticos polimórficos con distinta estabilidad genética, entre los que se cita a los RFLP, *Spoligotyping* y VNTRs. Su factibilidad, reproducibilidad y utilidad para crear bases de datos dinámicas que coadyuven al control de la TBB se discuten en este trabajo.

PALABRAS CLAVE: Genotipificación, *Spoligotyping*, VNTRs, Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (BTB) is a zoonotic disease that causes big losses to the livestock industry and represents a risk to public health in many countries. The epidemiology of BTB is quite complex, the bacilli grows very slowly, it can remain in dormancy for long periods of time and affects different animal species; including non-reservoir wildlife. Because of this, international efforts have been focus on developing genotyping techniques for better understand the epidemiology of the disease and trace back sources of infection. Nowadays, genotyping is based on the polymorphism of genetic markers with variation in stability. In this paper, the role of RFLP, *spoligotyping* and VNTR in genotyping *M. bovis* is discussed. The possibility of creating national and international dynamic databases of genotypes that support policies to eradicate the disease from cattle is analyzed.

KEY WORDS: Genotyping, *Spoligotyping*, VNTR, Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad bacteriana crónica causada por *Mycobacterium bovis*, que se caracteriza por producir granulomas en diferentes órganos, especialmente pulmones y nódulos linfáticos de varias especies animales y el hombre. Es una enfermedad zoonótica que puede ser adquirida por la ingestión de leche sin pasteurizar o derivados de ésta, por lo que trabajadores de establos, de rastros y veterinarios son considerados poblaciones de alto riesgo^(1,2). La vía de infección más frecuente es la respiratoria,

INTRODUCTION

Bovine tuberculosis (BTB) is a chronic disease caused by *Mycobacterium bovis* whose characteristic is the presence of tubercles in different organs, especially lungs and lymph nodes from different animal species and man. The disease is a zoonosis that can be acquired by ingesting no pasteurized milk or fresh cheese elaborated with contaminated milk; farm and abattoir workers and veterinarians are considered high-risk populations^(1,2). The main route of infection is the respiratory route; however, the oral route may also be important. Lesions in

Recibido el 30 de octubre de 2008. Aceptado para su publicación el 6 de mayo de 2009.

a) Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencias Agropecuarias, UAEH.

b) Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ, A.C.), Unidad de Biotecnología, Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, México. cestrada@ciatej.net.mx. Correspondencia al segundo autor.

c) Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología, INIFAP.

CONACYT-SAGARPA-2004-C01-161/C-1

por exposición a microaerosoles cargados con bacilos, pero también puede ser entérica. Las lesiones en el tracto digestivo son comunes en animales carnívoros que ingieren su alimento contaminado⁽¹⁾.

En la actualidad la importancia de la tuberculosis bovina en México radica en que representa un riesgo para la salud pública y en que se ha convertido en una barrera no arancelaria para el comercio internacional^(1,2). La participación de *M. bovis* en casos de TB humana en algunas regiones de México se ha estimado hasta en un 7 %⁽³⁾, mientras que en la zona fronteriza sur de los Estados Unidos la proporción llega al 40 %⁽⁴⁾. Por ser ésta una enfermedad que limita el comercio, los canales tradicionales internos de comercialización de animales se han visto afectados como consecuencia de su presencia en el ganado y la vulnerabilidad a las presiones comerciales internacionales es latente. Por esto, la mayoría de los países afectados cuentan con programas nacionales para eliminar la enfermedad.

La estrategia para el control de la tuberculosis en el humano es la vacunación de infantes y la terapia; sin embargo, esta estrategia no está disponible en el ganado. La vacunación no se usa porque la respuesta inmune interfiere con las pruebas de campo y los tratamientos antimicrobianos resultarían extremadamente costosos e incrementarían el riesgo de desarrollar cepas resistentes. *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida, usada en la terapia de corta duración (DOTS) recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que incluye isoniazida, rifampicina, estreptomycin y etambutol⁽⁵⁾. Lamentablemente, la estrategia DOTS deja de ser la opción terapéutica para pacientes infectados con cepas multirresistentes a pirazidamida o algún otro de estos cinco antibióticos⁽⁶⁾. La posibilidad de implementar la vacunación en el ganado y de diferenciar infecciones causadas por *M. bovis* en pacientes son razones epidemiológicas de importancia para identificar las especies del complejo de *M. tuberculosis*.

La epidemiología de la TBB en el mundo se ha complicado por la participación de la fauna silvestre

the digestive tract are common in carnivorous animals that eat contaminated food⁽¹⁾.

BTB represents a risk to public health and is one of the most important non-tariff barriers for international trade of cattle^(1,2). Human cases of TB by *M. bovis* in some parts of Mexico have been estimated in 7 %⁽³⁾. In the San Diego area in the United States this proportion is 40 %⁽⁴⁾. Presence of TB in cattle greatly reduces trade, eliminates traditional channels of marketing for domestic animals, limits genetic improvement of livestock and reduces exportation. Currently, most affected countries have national programs to eliminate the disease.

The main strategy for controlling tuberculosis in humans is vaccination of infants and therapy. However, none of these is available in cattle: vaccination is not used because the immune response interferes with field testing, and treatment is expensive and increases the risk of resistant strains. *M. bovis* is resistant to pirazinamide, which is used in short-time directly observed treatments (DOTS), recommended by the World Health organization (WHO), which also includes isoniazide, rifampicine, streptomycin and ethambutol⁽⁵⁾. Unfortunately, DOTS is not the best option for patients with resistance to pirazinamide or resistance to any of the other five drugs against TB⁽⁶⁾. Opportunities to use vaccination against TB in cattle and to differentiate infections by *M bovis* in patients are good epidemiological reasons to differentiate species of the *M. tuberculosis* complex species.

The epidemiology of BTB in the world has been complicated by the involvement of wildlife in persistence and spread of the bacilli. For example, a problem considered particular of cattle in New Zealand has spread to possums⁽⁷⁾, to badgers in Ireland and the United Kingdom^(8,9) and to deer in the United States^(10,11); the jump of *M. bovis* to other species seem to increase virulence. Other countries may be experiencing wildlife infections but the lack of studies might be masking the problem. International trade of animals as a consequence of globalization increases the risk of

en la persistencia o en la diseminación de la enfermedad. Un problema que se consideraba especial de los bovinos se ha propagado a la zarigüeya en Nueva Zelanda⁽⁷⁾, el tejón en Irlanda y el venado en los Estados Unidos^(10,11). El salto del agente etiológico entre especies parece incrementar la virulencia de las cepas. Otros países pueden estar experimentando la participación de la fauna silvestre en la diseminación de la enfermedad, sólo que la falta de trabajos no ha permitido la identificación del problema. El comercio internacional de animales incrementa el riesgo de la diseminación de cepas, aunque no se sabe la repercusión de éstas en la virulencia y diseminación del agente.

Todo lo anterior hace patente la necesidad de incrementar el arsenal tecnológico para combatir la enfermedad, a la vez que se entiende mejor su epidemiología. Se requiere de estudios epidemiológicos más precisos que permitan definir el origen de la infección, identificar las cepas de mayor prevalencia por región geográfica, medir el riesgo de la movilización de animales y su efecto en la distribución de la enfermedad; así como realizar estudios poblacionales y filogenéticos, asociar el genotipo bacteriano con su fenotipo y caracterizar el grado de patogenicidad y virulencia de las diferentes cepas. Es necesario integrar bases de datos accesibles, de uso fácil, flexibles y con información detallada de las cepas obtenidas. La genotipificación deber estar basada en criterios de tipificación que sean homogéneos, reproducibles, con amplio poder de discriminación entre casos sin relación y con una concordancia alta con el diagnóstico convencional.

GENOMA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Con técnicas inmunológicas y de biología molecular se ha determinado la enorme similitud existente entre diversas micobacterias causantes de tuberculosis; algunas de ellas, las de mayor similitud, se han agrupado en lo que se conoce como “complejo *M. tuberculosis*”, que incluye a: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinipedii*, *M. caneti*, *M. bovis* y *M. caprae*. *M. bovis* posee un genoma de 4,345,492 pb, con 4,003 genes que codifican para

spreading tuberculosis; however, up to now it is not well known the impact of this spreading on virulence changes of the bacillus.

To better understand the epidemiology of tuberculosis and to increase the probabilities of success of eradicating this disease, it is necessary to increase also the battery of technologies available. Epidemiological studies are required to precisely define sources of infections, to identify prevalent strains in specific geographic regions, to evaluate the risk of moving animals between regions and the effect of this on the distribution of the disease. It is also important to perform population and phylogenetic studies, correlate bacterial genotype with phenotype and to characterize the degree of pathogenicity and virulence. There is a need for integrating databases which are accessible, user-friendly, flexible, and detailed enough to be useful. Genotyping should be based on criteria which are: homogeneous, reproducible, with high power of discrimination between unrelated strains and high correlation with conventional diagnosis.

MYCOBACTERIUM BOVIS GENOME

A high degree of similarity has been established between *Mycobacterium* that cause tuberculosis, throughout immunological and molecular techniques. Some of these techniques, the one's with the highest level of similarity, have been grouped in what is known as “*M. tuberculosis* Complex”. This complex includes *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinipedii*, *M. caneti*, *M. bovis* and *M. caprae*. *M. bovis* has a 4,345,492 bp genome, 4,003 to 3,952 genes that encode proteins and 50 structural RNAs. The genome also includes a phago and 42 insertion sequences (IS) (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/). Structurally, *M. bovis* also contains about 65 % G + C combination, which is reflected in the content of basic amino acids of proteins, mostly enzymes for metabolism of lipids in the cell wall, such as mycolic acids⁽¹²⁾.

The genome of *M. bovis* is 99.95 % identical to that of *M. tuberculosis*, but the size has been reduced due to deletions, -events considered unique

3,952 proteínas y 50 RNAs estructurales, incluye un profago y 42 secuencias de inserción (IS) (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/). Estructuralmente *M. bovis* además, contiene aproximadamente 65 % de G+C, lo que se refleja en el contenido de aminoácidos básicos de sus proteínas, en su mayoría enzimas necesarias para el metabolismo de lípidos constitutivos de su pared celular, tales como los ácidos micólicos⁽¹²⁾.

El genoma de *M. bovis* tiene más del 99.95 % de identidad con *M. tuberculosis*, pero su tamaño se ha reducido debido a deleciones, eventos considerados únicos y unidireccionales en las bacterias: la recombinación genética en micobacterias es un evento raro. Así como tampoco hay evidencias de translocación, duplicación e inversiones, posiblemente debido a su lento crecimiento. La ausencia de mecanismos de intercambio genético, como la conjugación o la transformación se le considera como el origen de la similitud entre las especies del complejo *M. tuberculosis*. Algunas teorías suponen que evolucionaron como patógenos no hace mucho tiempo, con la aparición de los primeros homínidos en África oriental^(13,14).

La mayoría de los cambios del genoma del complejo *M. tuberculosis* se han asociado a elementos móviles como las IS, constituidas por fragmentos pequeños de DNA capaces de auto-insertarse dentro del genoma de la micobacteria y conferir polimorfismo entre las cepas. No obstante, en cepas de *M. bovis* este polimorfismo se asocia a deleciones de IS, pues comúnmente, poseen una sola copia^(12,15,16). Existen al menos cinco tipos de secuencias repetidas asociadas a la diversidad genética de cepas del complejo *M. tuberculosis*, entre ellas las secuencias en tándem ricas en GC (PGRS) y las secuencias repetidas en serie de número variable (VNTR). Estos últimos agrupan variantes, como son las secuencias polimórficas repetidas principales en serie, (MPTR), las secuencias repetidas exactas en serie (ETR) y las unidades repetidas dispersas de *Mycobacterium* (MIRU)⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

PRINCIPIOS DE LA GENOTIPIFICACIÓN

La genotipificación de las micobacterias se basa en el principio de la estabilidad genética por su

and unidirectional in bacteria; genetic recombination in *Mycobacterium* is uncommon. There is no evidence either of translocation, duplication and inversions, probably due to its slow growth. The absence of genetic exchange mechanisms, such as conjugation or transformation is considered the origin of similarity between species of the *M. tuberculosis* Complex. Some theories assume that they evolved as pathogens not long ago, with emergence of early hominids in East Africa^(13,14).

Most changes in the genome of *M. tuberculosis* have been associated with mobile elements such as insertion sequences (IS), which are small fragments of DNA capable of auto-insert into the genome and confer polymorphism among strains. However, polymorphism of *M. bovis* is more associated to deletions of IS, since they have a single copy^(12,15,16). There are at least five types of repeated sequences associated with genetic diversity of strains of the *M. tuberculosis* complex, including tandem GC-rich (PGRS) sequences and variable number tandem repeats (VNTR). The latter group of variants such as major polymorphic tandem repeat (MPTR), the exact tandem repeat (ETR) and *Mycobacterium* interspersed repeated units (MIRU)⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

PRINCIPLES OF GENOTYPING

Genotyping of *Mycobacterium* is based on the principle of genetic stability due to asexual reproduction, which allows to the bacillus to create clones: bacteria with the same genetic information. Therefore, it is assumed that strains with the same genotype have the same origin and that strains with different genotypes come from different sources^(14,17,18); based on this, traceability is possible. Throughout genotyping can be establish if a recently introduced animal is responsible for an outbreak, if an outbreak comes from the reactivation of latent infections in false negative animals or if infection comes from reservoirs. Nevertheless, it is important to remember that bacteria are susceptible to change after a number of no lethal replications occur. In this case, survival of the bacteria is possible and a new genetic line arises.

Genotyping requires polymorphic markers to identify minor differences between strains. Some

reproducción asexual, donde una bacteria da origen a clonas: bacterias con la misma información genética. De este modo, se deduce que cepas de micobacterias con idéntico genotipo tienen el mismo origen y que cepas con genotipo diferente provienen de lugares diferentes^(14,17,18). La rastreabilidad, con el principio de estabilidad genética, permite determinar si un animal recientemente introducido es el causante de un brote de tuberculosis. Asimismo, se puede analizar si el brote derivó de la reactivación de la infección latente en animales falsos negativos, desapercibidos por la falta de sensibilidad del diagnóstico o si proviene de la infección en reservorios silvestres. No obstante, las bacterias son susceptibles de experimentar mutaciones después de un número indeterminado de replications, que si éstas no afectan el funcionamiento de enzimas esenciales o de proteínas estructurales, permiten la sobrevivencia de las bacterias y la herencia del cambio a su descendencia, dando origen a nuevas líneas genéticas.

La genotipificación requiere marcadores polimórficos que definan diferencias sutiles entre las diversas cepas. Algunos de estos marcadores son capaces de detectar polimorfismos y distinguir a la cepa como una clona diferente, pero no todos los marcadores son capaces de detectar dichas diferencias. Por lo tanto, para genotipificar cepas de micobacterias se debe de considerar el cambio que cada marcador es capaz de detectar de manera efectiva. Se deben seleccionar marcadores genéticos dependiendo de su tasa de mutación^(17,18,19,21), ya que si el reloj molecular de la mutación marcada es demasiado rápido (≤ 2 años), existe el riesgo de que el número de cepas sea sobre-estimado y si es muy lento (≥ 100 años) el riesgo es de una sub-estimación. Por lo tanto, el marcador ideal debe ser de estabilidad media, capaz de discriminar cepas sin sesgos severos en la estimación⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

La importancia de la tuberculosis como una enfermedad re-emergente ha favorecido el desarrollo de numerosas técnicas de genotipificación para *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Algunas de estas técnicas involucran todo el genoma en el análisis, otras necesitan gran cantidad de ADN de buena calidad (≥ 1 μg), lo que representa un problema por el

of the markers are able to detect polymorphism and distinguish specific clones; however, not all detect clones; thus, to appropriately genotype strains it is necessary to consider the changes in the strain that each marker is able to detect. Thus, genetic markers should be selected depending on the rate of mutation^(17,18,19,21). On the one hand, if the molecular clock of mutation is marked too fast (≤ 2 yr), there is a risk that the number of strains is over-estimated, on the other hand, if it is too slow (≥ 100 yr), the risk is a sub-estimation. Therefore, the ideal marker should be half of stability, which can discriminate strains without severe bias in the estimation⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

The importance of tuberculosis as a re-emerging disease has encouraged the development of numerous techniques for genotyping *Mycobacterium*. Some techniques involve the whole genome in the analysis and some others require large amounts of DNA (≥ 1 μg), which is a problem because *Mycobacterium* grows slowly. Some techniques are based on the polymerase chain reaction (PCR) for the analysis of polymorphic *loci*. Those have better discrimination power and require minimum amounts of DNA (< 1 ng); besides, amplify a few viable microorganisms impossible to recover by culture (Figure 1)^(17,18,19).

Genotyping with restriction endonucleases. One of the first techniques for genotyping is formerly known as genomic footprints or fingerprints, which consists of banding patterns obtained by cutting genomic DNA with restriction enzymes; for example, *PvuII* or *AluI*^(22,23,24). The fragments (30 to 50 kb) are then separated by pulsed field electrophoresis (≈ 18 h). Because the process is laborious, the fact that requires a large number of bacilli and that the discrimination power is poor, the technique has been disposed. The technique is commonly known as restriction fragment length polymorphism (RFLP) and it has been widely used to link outbreaks to sources of infection and to study transmission between species⁽²⁵⁻²⁸⁾. Probes have been used against various targets, the most common for *M. tuberculosis* are: IS6110, PGRS-RFLP and DR-RFLP.

lento crecimiento de las bacterias. Por otro lado, existen técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para el análisis de *loci* polimórficos que tienen mayor poder de discriminación, requieren una cantidad mínima de ADN (< 1 ng) y permiten amplificar muestras con microorganismos poco viables o imposibles de recuperar, como es el caso de las micobacterias latentes (Figura 1)^(17,18,19).

Genotipificación con endonucleasas de restricción

Una de las primeras técnicas de genotipificación en los organismos es la antes denominada huella genética o fingerprint, que consiste en obtener patrones de bandeo a partir del DNA genómico cortado con endonucleasas de restricción; por ejemplo, PvuII o AluI^(22,23,24). Esta técnica involucra el análisis del genoma completo de la micobacteria, donde se utilizan endonucleasas con secuencias consenso de corte poco frecuente, lo que produce fragmentos largos (30 a 50 kb). Estos fragmentos son separados mediante electroforesis en campos pulsados (≈18 h). Lo laborioso del proceso de este tipo de tipificación y la gran cantidad de ADN requerida ha provocado su desuso. Esta técnica es comúnmente conocida como fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) y ha sido ampliamente utilizada para relacionar brotes de tuberculosis a focos de infección específicos o estudiar la transmisión de la enfermedad entre especies⁽²⁵⁻²⁸⁾. Las sondas utilizadas han sido dirigidas contra diversos blancos, entre las más frecuentes para *M. tuberculosis* están: IS6110, RFLP-PGRS y RFLP-DR.

RFLP-IS6110

El RFLP-IS6110 es el método más usado debido a que analiza al elemento IS6110 integrado en diversos *loci* del genoma de las especies del complejo *M. tuberculosis*, comúnmente en hot spots, tales como: las secuencias de repetición directa (DR), el locus *ipl* y la región intergénica *dnaA-dnaN*. Este marcador es considerado estándar de oro para la evaluación de nuevos métodos de tipificación de cepas de *M. tuberculosis*. Algunas cepas de *M. tuberculosis* llegan a presentar hasta 25 copias. En la IS6110 existe una secuencia consenso para la

Figura 1. RFLP-IS6110. Los patrones de restricción obtenidos con la enzima PvuII se evidencian por medio de la hibridación con la sonda que reconoce la IS6110. Secuencias repetidas directos (DR), secuencias repetidas inversos (IR)

Figure 1. RFLP-IS6110. The restriction patterns were gotten with PvuII and hybridization with a probe directed to IS6110. Direct repeated sequences (DR), inverse repeated sequences (IR), Open reading frames (ORF)

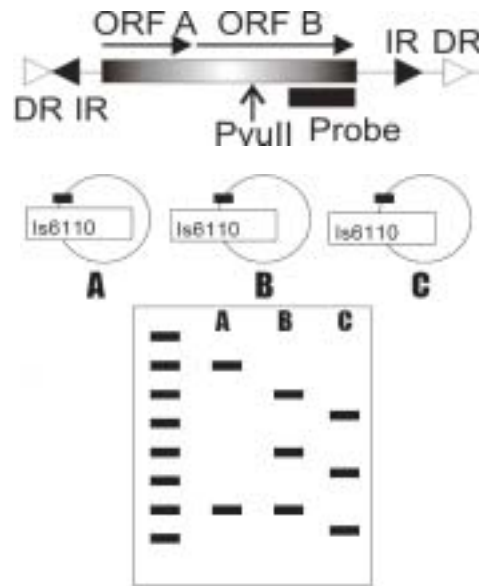


Figure taken from Gutiérrez's talk, MTET Course 2005-2006- Pasteur Institute.

IS6110-RFLP typing

IS6110-RFLP is the most common method for typing *M. tuberculosis*. It analyzes the element IS6110 integrated at various *loci* of the genome, usually located in hot spots, such as the direct repeat sequences (DR), the *ipl* locus and intergenerational *dnaA-dnaN* regions. This "flag" is considered the gold standard for evaluating new methods for genotyping *M. tuberculosis*. Strains of *M. tuberculosis* have up to 25 copies of the element IS6110, which is located in a consensus sequence for the restriction enzyme *PvuII*; therefore, when the *Mycobacterium* DNA is cut, a specific pattern of bands is formed. The number and size of bands depends on the number of copies of IS6110, the location and the distance between cuts in the genome

enzima de restricción PvuII, por lo tanto, al cortar el ADN de las micobacterias se forma un patrón de bandas específico que depende del número de copias y los cortes en el genoma (Figura 2), así como a su localización, la distancia entre los sitios de corte y la longitud de cada banda. Para revelar el patrón, el DNA cortado se somete a electroforesis en agarosa y se transfiere a una membrana de nylon, para hibridar los fragmentos con una sonda biotinilada complementaria a la secuencia 3' del IS6110, inmediata posterior a la secuencia consenso de la PvuII.

El número y la localización de las copias de IS6110 hacen del RFLP un buen método de tipificación para *M. tuberculosis*, sin embargo, en el caso de *M. bovis* presenta algunas limitaciones, dado que esta micobacteria presenta entre una y cinco copias; comúnmente localizadas en el *locus* DR, dependiendo de la especie de origen. Esto, aunado a que se requieren grandes cantidades de ADN puro y a la necesidad de personal calificado, hacen de éste un método poco útil para tipificar cepas de *M. bovis*. Además, la estabilidad y la rastreabilidad del RFLP-IS6110 es dudosa: el cambio de una o más bandas es frecuente en aislamientos de pacientes cuya re-infección era poco probable, sugiriendo que su reloj genético es de aproximadamente 3.2 años (Cuadro 1). En un intento por compensar esta inestabilidad se agrupan cepas con una banda de diferencia, pero la interpretación inter-laboratorios es muy variable⁽²³⁻³¹⁾.

Polimorfismo de secuencias ricas en GC (PGRS)

En cepas de bacterias del complejo *M. tuberculosis*, con pocas copias del IS6110, se recurre al análisis de otras regiones distribuidas múltiples veces en su genoma: tal es el caso de aquellas ricas en las bases guanina y citocina (G+ C, ≈66 %) agrupadas en secuencias repetidas cortas de 24 pb, llamadas secuencias polimórficas ricas en GC (PGRS)⁽³²⁾. Para identificar este tipo de secuencias se digiere el ADN con AluI y los fragmentos obtenidos se hibridan con el plásmido pTBN12, que contiene una secuencia PGRS clonada de 3.8 Kb del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. La estabilidad reportada de este marcador es de aproximadamente 3.5 años,

(Figure 2). To reveal the fingerprint, the sliced DNA is passing throughout agarose gels by electrophoresis and transferred to a nylon membrane, where it hybridizes to biotinylated DNA-fragments (probes) complementary to the sequence 3' of the IS6110 element.

The number and location of the IS6110-RFLP make a good typing method for *M. tuberculosis*, however, in the case of *M. bovis*, it has serious limitations. First of all, *M. bovis* has a reduced number of IS6110 copies (five), depending on the species. This fact, in addition to the large quantities of pure DNA required and the need for skilled personnel, the method is barely used to genotype

Figura 2. Los productos de amplificación de las secuencias espaciadoras entre los repetidos directos son hibridados con sus secuencias complementarias inmovilizadas en una membrana y detectados por quimioluminiscencia

Figure 2. Spoligotyping method. The spacer sequences amplified between direct repeat sequences are hybrid to complementary sequences fixed in a membrane and detected by quimioluminiscense

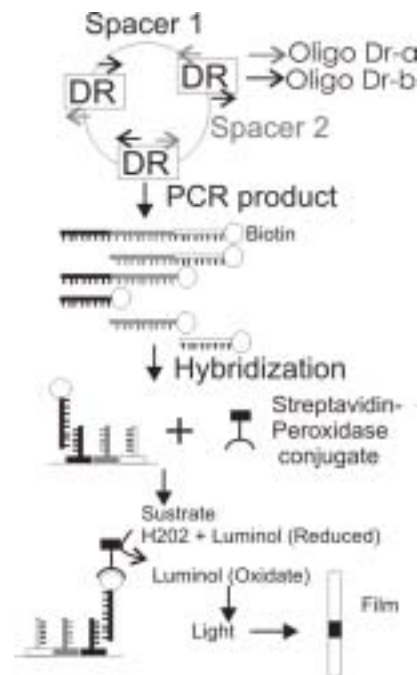


Figure taken from the Hass's talk, MTET Course 2005-2006. Pasteur Institute.

similar a la observada para IS6110 y con los mismos problemas técnicos (Cuadro 1). Una desventaja adicional es que las PGRS no son específicas del complejo *M. tuberculosis* y en *M. bovis* su interpretación es más complicada, pues aunque es más sensible para diferenciar entre aislamientos con una sola copia de IS6110, por lo general muestra patrones de bandeo de polimorfismo moderado, es menos reproducible y sumamente laboriosa^(26,27,28,30,32).

Otros RFLP

Ninguno de los marcadores RFLP mencionados (IS6110, PGRS o MPTR) posee el polimorfismo adecuado para la diferenciación precisa de cepas de *M. bovis*, por lo que otros métodos han sido probados. El polimorfismo de las secuencias de repetición directa del *locus* DR es otro marcador usado para genotipificar cepas de *M. bovis* con pocas copias de IS6110. Las secuencias DR se repiten a lo largo del genoma y entre sus secuencias repetidas de 36 pb se localizan espaciadores de secuencias únicas que varían de 36 a 41 pb de longitud. Para identificarlos también se digiere con Alu I y los fragmentos obtenidos se hibridan con la sonda DR⁽³³⁾. La estabilidad de este marcador es de aproximadamente 10 a 20 años y su polimorfismo se presenta por delección de secuencias repetidas y secuencias adyacentes (Cuadro 1). El RFLP-DR es más estable y al ser multicopia, su detección es más sensible que la de IS6110^(19,22,29,30).

El RFLP-pUCD es otro marcador que requiere cortar el ADN con Alu I y su posterior hibridación con el plásmido pUCD, que contiene un inserto genómico de *M. bovis* con una serie de cinco unidades de secuencias repetidas perfectas de 69 pb y tres copias de otra región de secuencias repetidas; identificados como parte de la familia génica de proteínas ricas en prolina-prolina-glutamato (PPE), ampliamente dispersa en el genoma de las micobacterias^(34,35,36). Otro RFLP reportado usa DNA digerido con EcoR1 y como sonda la secuencia promotora PAN de *M. paratuberculosis*, localizada adyacente a la secuencia terminal 3' del elemento de inserción 900 (IS900).

M. bovis. More than that, stability and traceability of IS6110-RFLP has been questioned: a change of one or more bands is common in isolates from patients whose re-infection was unlikely, suggesting that the genetic clock is about 3.2 yr (Table 1). In an attempt to compensate for instability, strains with a band difference are group together, but the interpretation inter-laboratory is highly variable⁽²³⁻³¹⁾.

GC-rich sequence polymorphism (PGRS)

Because of the low copy number of IS6110 in *M. bovis*, other genotyping methods have been tried. The GC-rich sequence polymorphism method (PGRS) is based on the analysis of G-C rich regions of the *Mycobacterium* genome. These are guanine and cytosine (G + C, ≈ 66 %) rich areas grouped into 24 short repeated base pairs distributed multiple times in the genome⁽³²⁾. In this method, DNA is digested with the enzyme *AluI* and fragments hybridized to the *pTBN12* plasmid, which contains a PGRS sequence cloned: 3.8 Kb of the genome of *M. tuberculosis* H37Rv. Stability of this marker is approximately 3.5 yr, similar to that observed for IS6110. Technical problems between PGRS and IS6110-RFLP are quite similar (Table 1). Additional disadvantages are that PGRS is not specific for *M. tuberculosis* and *M. bovis*, interpretation of the results are complicated due to the moderate

Cuadro 1. Valores de reproducibilidad y capacidad de discriminación usando diversos marcadores genéticos

Table 1. Reproducibility values and discrimination capacity using diverse genetic markers

Binary code	Octal code
0 000	0
0 001	1
0 010	2
0 011	3
0 100	4
0 101	5
0 110	6
0 111	7

El locus PAN se presenta en *M. bovis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* y tiene una identidad del 70 % con la secuencia PAN de *M. paratuberculosis*. El locus PAN está localizado cerca de la secuencia terminal 3' de la región polimórfica DR1 de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, y su polimorfismo permite diferenciar entre las cepas vacunales BCG⁽¹¹⁾.

En general, los otros RFLP mencionados distintos al IS6110 son multicopia en *M. bovis*, lo que puede ser una ventaja para la discriminación de cepas, pero no se ha determinado con precisión su estabilidad (Cuadro 1). Las principales desventajas del RFLP y por tanto, para cualquiera de las secuencias blanco analizadas mediante esta técnica, son requerir demasiado DNA, de calidad y pureza excelentes, sin degradación, ni contaminación con DNA de otra especie, así como también, la excesiva laboriosidad del procedimiento. Además, depende de comparar patrones de bandedo completos, lo que hace imposible la creación de bases de datos y la automatización del análisis.

Genotipificación con PCR

Los métodos de tipificación basados en la PCR tienen la característica de requerir cantidades mínimas de ADN, incluso parcialmente degradado y mezclado con ADN de otras especies, la cual puede ser amplificada haciendo más factible, rápida, estable y versátil la genotipificación. En el caso de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* se hicieron intentos por amplificar las regiones descritas en RFLP, pero los múltiples problemas experimentados, principalmente la pobre reproducibilidad, hicieron que se desechara la idea de los PCR-RFLP^(37,38).

Tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping)

En la actualidad una de las técnicas más utilizadas para la genotipificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* es *Spoligotyping*. Este método se basa en la presencia o ausencia de variantes de DR (DVR, por sus siglas en inglés). Las DVR se componen de una secuencia repetida de 36 pb conservada y de una secuencia espaciadora variable de 35 a 41 pb: el blanco de la tipificación

polymorphism of bands, it is extremely laborious and has poor reproducibility. Nevertheless, PGRS is more sensitive for differentiating isolates with a single IS6110 copy^(26,27,28,30,32).

Direct repeat (DR) sequence polymorphism. Polymorphism of the DR locus is another marker used to genotype *M. bovis* strains with low copy number of IS6110. DR are sequences that repeat throughout the genome with spacers in-between. These are unique sequences ranging from 36 to 41 pb long. To identify these markers, DNA is digested with *Alu I* and fragments hybridized to the DR probe⁽³³⁾. Genetic stability of this marker is about 10 to 20 yr and the polymorphism is a consequence of deletions of repeated sequences and sequences adjacent to each other (Table 1). DR-RFLP is more stable and, because of the large number of DR copies, it is more sensitive than the IS6110-based methods^(19,22,29,30).

RFLP-*pUCD* is another marker that works by cutting the DNA with *AluI*. The DNA is cut with the enzyme and fragments hybridize to the *pUCD* plasmid, which contains an insert of genomic *M. bovis* with series of five units perfect repeated sequences 69 bp long and three copies of another region of repeated sequences, -identified as part of the gene family of protein-rich Proline-Proline-glutamate (PPE), widely dispersed in the genome of *Mycobacterium*^(34,35,36). Another RFLP reported is the one that digest DNA with *EcoRI* and uses as a probe sequence the promoter sequence PAN of *M. paratuberculosis*, located next to the terminal sequence 3' from the insertion element IS900. PAN is present in *M. bovis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* and has a 70 % identity with the sequence of PAN *M. paratuberculosis*. PAN locus is located near the terminal sequence 3' of the polymorphic region of DR1 of *M. bovis* and *M. tuberculosis*. This polymorphism allows differentiating between BCG vaccine strains⁽¹¹⁾.

In general, other than the IS6110 restriction fragments mentioned are multicopy in *M. bovis*, which is an advantage for discrimination of strains, but its stability is not well known (Table 1). The main disadvantage of RFLP and any of the target sequences analyzed

es esta región variable. A la fecha se han reportado 94 diferentes espaciadores entre los DR: el cromosoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv tiene 48 DVR y el de *M. bovis* BCG 41. De este modo, para la genotipificación se utilizan de manera rutinaria 43 espaciadores, 37 de H37Rv y 6 de BCG. Como ya se mencionó, las secuencias de inserción IS6110 se integran preferencialmente en este tipo de *hot spots*, favoreciendo la delección de espaciadoras, ya sea por inserción asimétrica o por escisión de las secuencias IS6110⁽³⁹⁻⁴²⁾.

El método de *Spoligotyping* inicia con una PCR donde se utiliza un par de oligonucleótidos complementarios a la región conservada de los DVR, de modo que a partir de ahí se inicie la amplificación de las regiones espaciadores. A los productos de la PCR se les hibrida con cada una de las 43 secuencias complementarias conocidas, previamente fijadas en una membrana de Nylon. Para discriminar los diversos espaciadores amplificados, uno de los oligonucleótidos está marcado con biotina. Finalmente, los puntos de hibridación serán revelados con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, que se une a la biotina para formar un complejo luminoso al agregar el sustrato luminol. La reacción enzimática que se produce es capaz de quemar una placa radiográfica, en el punto que corresponde a cada espaciador hibridado, determinando los espaciadores presentes o ausentes en cada una de las cepas (Figura 3)^(22,30,43,44,45,46,47).

La presencia o ausencia de espaciadores, permite crear bases de datos sencillas, con un código binario de 1 (presencia) y 0 (ausencia), las cuales sirven para formar matrices que más tarde son utilizadas en diferentes tipos de análisis filogenéticos para determinar grupos de cepas de similitud genética. Estas matrices de 0 y 1 pueden ser utilizados para hacer códigos que se pueden transformar en octales, agrupando los patrones binarios de 3 en 3 y asignándoles un nuevo valor del 0 al 7, donde 0 corresponde al código 000 y 7 al 111 (Cuadro 2). La codificación permite comparar fácilmente el genotipo de cepas aisladas en diversos laboratorios en diferentes partes del mundo.

El polimorfismo generado por *Spoligotyping* tiene una reproducibilidad alta, dentro de y entre los

by this technique are they required large amounts of DNA with excellent quality and purity. Moreover, comparisons depend on complete banding patterns, making impossible to create databases and making difficult automation of the analysis.

PCR genotyping

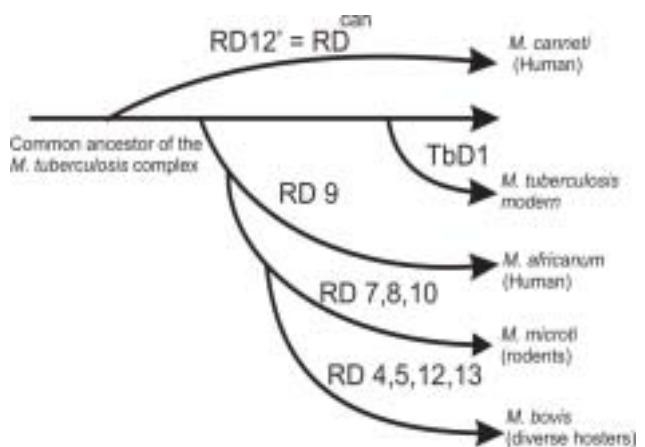
PCR-genotyping has the advantage of requiring low amounts of DNA. Partially degraded and mixed-DNA is also useful; thus, PCR-genotyping is fast, stable and versatile. In the case of *Mycobacterium* from the *M. tuberculosis* complex, attempts were made by amplifying the regions obtained with RFLP, however, due to the multiple problems experienced, the PCR-RFLP idea was disposed^(37,38).

Spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)

Currently, one of the most commonly used techniques for genotyping mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex is spoligotyping. This method relies on the presence or absence of variants of the direct repeat sequences (DR). The DVR consists

Figura 3. Origen de los ecotipos del complejo *M. tuberculosis*, donde se muestran las regiones perdidas durante el proceso de evolución de estas bacterias, así como sus hospederos

Figure 3. Origin of the *M. tuberculosis* complex ecotypes. This figure showed the region loosed into genome during the evolve to this bacterial species



Adapted from Brosch *et al.*⁽⁹⁾.

Cuadro 2. Códigos usados para el reporte de spoligotipos

Table 2. Codes used for the report of Spoligotypes

Locus	Alias	Localization*	Size**	Alleles	Reference
ETR-A	pUCD	2165		1-7	
ETR-B		2561		1-5	
ETR-C		577	230-404 pb (2-5)	4	25
ETR-D	MIRU 4	580	253-715 pb (2-8)	7	25, 2, 75
ETR-E	MIRU31	3192	545-819 pb (1-6)	6	25, 2, 75
ETR-F		3239	(1-3)	3	25
MPTR-A		531	(15-16)	3	25
MPTR-B		1010	12	1	25
MPTR-C		1010	15	1	25
MPTR-D		2640	10	1	25
MPTR-E		2160	14	1	25
QUB-5	MIRU 27	3007	551-710 pb (1-4)	4	71, 2, 75
QUB-11a	pUCD	2163	305-1832 pb (3-26)	15	71
QUB-11b	pUCDI	2163	136-2, 756 pb (2-11)	8	71
QUB-18		192, 75	387-1167 pb (2-12)	9	71
QUB-23		1612	141-203 (5-8)	3	71
QUB-26		4052	abr-14	5	71
MIRU 2		154	455-561 pb (1-3)	3	2, 75
MIRU 10		959	537-1014 pb (1-10)	9	2, 75
MIRU 16		1644	618-777pb (1-4)	4	2, 75
MIRU 20		2059	01-feb	2	2, 75
MIRU 23		2531	608-979 pb (1-8)	7	2, 75
MIRU 25		2684	(1-2)	2	2, 75
MIRU 26		2996	563-818 pb (2-7)	5	2, 75
MIRU 39		4348	593-699 pb (1-3)	3	2, 75
MIRU 40		802	199-469 pb (1-6)	5	2, 75

* In *M. tuberculosis* H37Rv genome (Kb). ** Amplicon and (number of copies).

laboratorios, y una estabilidad media de 10 a 20 años, lapso durante el cual se espera que las cepas mantengan sus códigos (Cuadro 1). Esta y otras técnicas de genotipificación basadas en la PCR, tienen como ventajas la rapidez, la sencillez y el requerimiento de poco ADN de calidad media. Además, el *Spoligotyping* permite el diagnóstico y genotipificación de bacterias del complejo *M. tuberculosis* directamente de muestras clínicas.

No obstante, como ya se mencionó, a mayor estabilidad menor el polimorfismo de un marcador, así como su poder de discriminación entre cepas no

of a repeated sequence of 36 bp conserved sequence and a variable spacing from 35 to 41 bp. The target for typing is this variable region. Up to date, 94 spacers have been reported in the DR's: the chromosome of *M. tuberculosis* H37Rv has 48 DVR, *M. bovis* BCG has 41. For rutin spoligotyping *M. bovis*, 43 spacers are used: 37 from the H37Rv *M. tuberculosis* strain and 6 from the *M. bovis* BCG strain. As mentioned above, insertion sequence IS6110 are frequently integrated in such hot spots, which increases the deletion of spacers, either by asymmetric insertion or excision of IS6110 sequences⁽³⁹⁻⁴²⁾.

relacionadas, lo que indudablemente constituye una desventaja para estudios epidemiológicos, pero una ventaja para estudios filogenéticos^(13,14). De estos últimos se ha concluido que las especies ahora conocidas como complejo *M. tuberculosis* derivan de un ancestro común, que por adaptación a determinados hospederos se habría diversificado^(13,48). Esta especiación puede ser monitoreada por *Spoligotyping*. Por ejemplo, la mayoría de las cepas de *M. bovis* carecen de diversos DR y la ausencia de cuatro de esos puede ser comprobada fácilmente por la ausencia de los espaciadores 39 al 43 (Figura 4)^(34,39,40,43,49).

Secuencias repetidas en serie de número variable (VNTR)

Estos marcadores genéticos, antes denominados minisatélites, se identificaron inicialmente en seres humanos, donde han tenido su mayor aplicación en pruebas forenses y de paternidad^(50,51). Los VNTR son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o delección de secuencias repetidas. Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por PCR con oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas en sus flancos. El tamaño del amplicón revela el polimorfismo del VNTR y puede expresarse como el número de secuencias repetidas que contiene, permitiendo almacenar códigos numéricos comparables entre diversos laboratorios y crear bases de datos de fácil acceso (Cuadro 3). Usando VNTR se han genotipificado diversos microorganismos, entre ellos: *M. leprae*, *M. ulcerans*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*⁽⁵²⁻⁵⁸⁾.

Secuencias repetidas polimórficos principales en serie (MPTR) y secuencias repetidas en serie exactos (ETR)

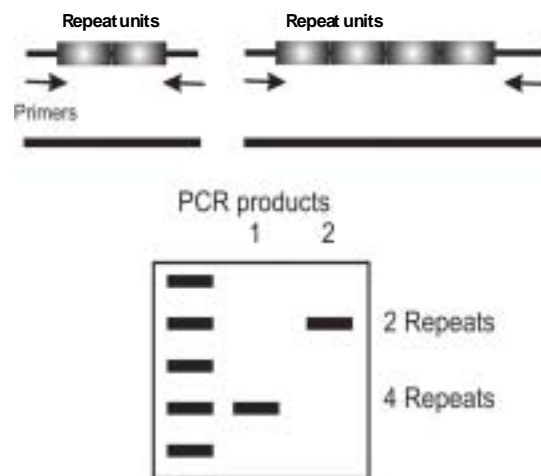
En el caso de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, Frothingham y Meeker-O'Connell analizaron 11 *loci* VNTR dentro del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y de acuerdo a su estructura genética los dividieron en dos tipos diferentes⁽⁴⁹⁾: MPTRs y ETRs. Los primeros cinco son similares a los DRV, pero con secuencias repetidas, prácticamente homogéneas de 10 pb, más un

The method starts with a PCR, which uses a pair of oligonucleotides complementary to the conserved region of the DVR, so amplification of spacer regions start from there. PCR products are hybridized to each of the 43 complementary known sequences previously set in a nylon membrane. To discriminate between amplified spacers, one of the oligonucleotides is biotin-labeled. Finally, hybridized points are revealed with a streptavidin-peroxidase conjugate, which binds to biotin to form a luminous complex when luminal is added to the substrate. The enzyme reaction produced is able to burn a radiographic plate at the hybridized point determining presence or absence of spacers for each strain (Figure 3)^(22,30,43,44,45,46,47).

The presence or absence of spaces can create simple databases, with a binary code of 1 (presence) and 0 (absence). This information is used to form matrices that are later used in phylogenetic analysis

Figura 4. Determinación de marcadores VNTR. Los iniciadores amplifican la región aledaña a los repetidos, por lo que el tamaño del amplicon dependerá del número de repetidos

Figure 4. Determination of VNTR markers. The primers amplified repeat sequences into genome to mycobacterias, the size of the amplicon depends on the number of repeats in the clone



Taken of the Supply's talk, MTET Course 2005-2006. Pasteur Institute.

espaciador adyacente variable de 5 pb. La mayoría de los VNTR dentro del genoma de *M. tuberculosis* pertenecen a esta familia y se han designado MPTR. De los cinco MPTR analizados (del A al E) sólo se observa un polimorfismo ligero en MPTR-A, con tres variantes alélicas. El MPTR-A se localiza en el gen de una proteína de pared celular, de la familia de proteínas PPE, caracterizada por contener múltiples copias del motivo Asn-X-Gly-X-Gly-Asn-X-Gly en la porción C-terminal⁽¹⁹⁾.

Los otros seis VNTR analizados son secuencias polimórficas repetidas de 53 a 79 pb, denominados ETR, del ETR-A al ETR-F. Excepto el ETR-A, que se encuentra dentro del gen *katG*, se localizan en regiones no codificables. La reproducibilidad de los ETR es del 97 %, pero su poder de discriminación entre cepas no relacionadas es inferior al observado con RFLP-IS6110 para cepas con múltiples copias y mejor para cepas con pocas copias. En la Universidad Queen de Belfast se describió a otros VNTR con secuencias repetidas de 56 a 60 pb y los denominaron QUB. Al igual que los ETR, los QUB presentan una reproducibilidad alta, pero un poder de discriminación menor entre cepas con alto número de copias IS6110 y mayor para cepas con pocas copias. Los análisis con VNTR permiten discriminar cepas de *M. bovis* no relacionadas mejor que el *Spoligotyping*⁽⁵⁹⁻⁶²⁾.

Unidades repetidas dispersas de Mycobacterium (MIRU)

Los marcadores VNTR descritos originalmente por Supply *et al*⁽⁶³⁾ y denominados MIRU, se identificaron al estar buscando una secuencia específica de *M. tuberculosis* en la región intergénica SenX3-RegX3 del complejo *M. tuberculosis*⁽⁶⁴⁾. Los MIRU se agrupan en tres familias de acuerdo a su tamaño: de 77 a 101 pb; de 46 a 53 pb; y de 58 a 101 pb. Se estiman de 40 a 50 MIRU en el genoma de *M. tuberculosis*, cuya diferencia con otros VNTR radica en su asimetría y orientación en fase con los genes adyacentes. Para la genotipificación del complejo *M. tuberculosis* se han utilizado los 12 MIRU con mayor polimorfismo. Los MIRU tienen una estabilidad mayor de 18 meses y debido a que su análisis implica a más de un *locus*,

or to identify groups of strains with genetic similarity. Matrices of 0's and 1's can be used to make codes that can be converted into octal, grouping binary patterns in sets of three, assigning a new value from 0 to 7, where 0 corresponds to code 000 and 7 to 111 (Table 2). Coding allows easy comparisons of spoligotypes from different laboratories in different parts of the world.

Polymorphism generated by spoligotyping is highly reproducible within and between laboratories, and an average genetic stability of 10 to 20 yr; a period in which strains are expected to keep their codes (Table 1). This and other PCR-based genotyping techniques, have advantages such as speed, simplicity and use of low amounts of DNA with average quality. In addition, spoligotyping allows both, diagnostic and genotyping of bacteria of the *M. tuberculosis* complex directly from clinical samples.

However, as mentioned earlier, the larger the stability the smaller the polymorphism of a Marker, as well as the power of discrimination in unrelated strains. What is certainly a handicap for epidemiological studies, but an advantage for phylogenetic studies^(13,48). Of the latter, it has now been established that the species known as from the *M. tuberculosis* complex came from a common ancestor, that through adaptation to specific hosts have been varied^(13,47). The speciation can be monitored by spoligotyping. For example, most *M. bovis* strains have not specific DR's, and the absence of four of those can be easily verified by the absence of spacers 39 to 43 (Figure 4)^(34,39,40,43,49).

Variable number tandem repeats (VNTR)

These genetic markers, formerly known as minisatellites, were identified initially in humans where have been mostly applied in forensics and paternity tests^(50,51). VNTR are repeated sequences in variable number tandem scattered throughout the genome. Polymorphism is caused by addition or deletion of repeated sequences. To identify a VNTR the sequence is amplified by PCR with oligonucleotides complementary to specific sequences at their flanks. Size amplicon reveals

su poder de discriminación es comparable al descrito para los RFLP -IS6110 y -DR (Cuadro 1). Además tienen una reproducibilidad, intra e interlaboratorios, hasta de un 98 %, por lo que son buenos marcadores para estudios de epidemiología molecular. La genotipificación por MIRU basada en PCR tiene la ventaja de analizar cantidades ínfimas de ADN y que en combinación con *Spoligotyping* permite discriminar un mayor número de cepas no relacionadas. Los resultados expresados sencillamente con el número de secuencias repetidas presente por *locus* permiten comparar rápidamente cepas y crear bases de datos mundiales^(20,25,65,66).

Otra ventaja de los VNTR sobre otros métodos de tipificación es la posibilidad de automatizar el análisis. En lugar de hacer mezclas de PCR para cada *locus* y visualizar los amplicones en geles de agarosa para determinar su tamaño y asignar el número de secuencias repetidas, se pueden diseñar mezclas con múltiples oligonucleótidos marcados diferencialmente con fluorocromos, organizándolas en función de los tamaños esperados de los amplicones para cada *locus*. La automatización ahorra tiempo, optimiza reactivos y disminuye costos, aunque es necesario el acceso a equipos de electroforesis capilar. Además, si se cuenta con un programa de genotipificación como en el caso de los sistemas de secuenciación, el tamaño del alelo también puede codificarse automáticamente^(23,62). Otras formas de automatizar el análisis de los

the VNTR's polymorphism and can be expressed as the number of repeated sequences contained. This allows the storage of numeric codes which can be used to compare results between laboratories and the creation of accessible databases (Table 3). Different microorganisms, including *M. leprae*, *M. ulcerans*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* have been genotype by VNTR⁽⁵²⁻⁵⁸⁾.

Mayor polymorphism tandem repeats (MPTR) and exact tandem repeats (ETR)

In the case of mycobacteria of the *M. tuberculosis*, complex, Frothingham and Meeker - O'Connell⁽⁴⁹⁾ analyzed 11 VNTR *loci* within in the genome of *M. tuberculosis* H37Rv. According to the genetic structure those loci were divided into two different types: MPTR's and ETR'S. The first five are similar to the DRV's, but with repeated sequences almost homogeneous in 10 bp plus an adjacent variable spacer 5 bp long. Most VNTR's from *M. tuberculosis* genome belong to this family called MPTR. Of the 5 MPTR analyzed (from A to E) only a small polymorphism, MPTR-A is observed with three allelic variants. The MPTR-A is located in a protein cell wall gene from the PPE family of proteins, characterized by containing multiple copies of the plea Asn-X-Gly-X-Gly-Asn-X-Gly in the C-terminal portion⁽¹⁹⁾.

Cuadro 3. VNTRs utilizados en la actualidad para la genotipificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Table 3. VNTRs used at the present time for the genotyping *Mycobacterium tuberculosis* complex

Genetic marker	Method	Instability		
		Biological clock (years)	Reproducibility	Discrimination
IS6110	RFLP	2-4	Medium	Low*
	PCR		Very low	
PGRS	RFLP	3-5	Medium	High
DR	RFLP	10-20	Very low	Low
	Spoligotyping		High	
MPTR	VNTR	≥1.5	High	Low
ETR				
MIRU				

* With *M. bovis*. ** Using several *loci*.

amplicones obtenidos es el análisis por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) acoplado a espectrofotometría por UV⁽⁶⁷⁾. La automatización confiere robustez al análisis VNTR porque minimiza el error humano y lo hace más objetivo, reproducible y eficiente. En el Cuadro 2 se muestra una lista de los *loci* VNTRs que se han estudiado, la localización dentro del genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv, el tamaño del amplicon esperado y el número de alelos que se han identificado en las diversas cepas del complejo tuberculosis que se han analizado.

Secuencias repetidas cortas o simples (SSR)

Otros marcadores útiles para la genotipificación son las secuencias repetidas cortas o simples (SSR), antes microsátélites. Los SSR son secuencias repetidas de 1 a 6 nucleótidos distribuidas en los genomas de todo tipo de organismos. Su polimorfismo debido a deleciones o adiciones va de 10-6 hasta 10-2 por generación. Al igual que los VNTRs estos marcadores se amplifican con oligonucleótidos específicos por PCR y para su lectura es preferible usar electroforesis capilar, por lo que su automatización es una necesidad. El genoma de las micobacterias tiene 220 SSR por kilobase, aproximadamente. Debido a su abundancia y polimorfismo será interesante comparar su utilidad para genotipificar cepas del complejo *M. tuberculosis*⁽⁶⁸⁾.

GENOTIPIFICACIÓN DE *M. BOVIS*

La necesidad de genotipificar *M. bovis* ha sido mundial, en especial de cepas aisladas de bovinos tratando de determinar focos de infección. La existencia de reservorios de fauna silvestre ha fomentado estudios epidemiológicos para determinar el papel de ésta en la persistencia regional de la tuberculosis, así como también para evaluar su impacto en salud pública⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾. En la última conferencia internacional sobre *M. bovis* se manifestó el enorme riesgo de generar cepas más virulentas por la interacción de este bacilo con la fauna silvestre y es necesario estimar el riesgo derivado de la movilización indiscriminada de animales. La rastreabilidad permitirá evaluar los riesgos derivados tanto de la movilización, la fauna

There are other six VNTR polymorphic repeat sequences, 53 to 79 bp long, used for genotyping, called ETR, from ETR-A to ETR-F. Except for the ETR-A, which locates within the *katG* gene, the rest are located in not coding regions. Reproducibility of the ETR's is 97 %, but the power to discriminate between unrelated strains is lower than the observed with IS6110-RFLP for strains with multiple copies, and a little better for strains with low copy number. In Queen University in Belfast, another set of VNTR sequences repeated, 56 to 60 pb long have been described, called QUB. Like the ETR's, the QUB show high reproducibility but lower discrimination power for strains with high copy number of IS6110 and higher for strains with low copy number. VNTR analysis allows discriminating unrelated strains of *M. bovis* better than spoligotyping⁽⁵⁹⁻⁶²⁾.

Mycobacterium interspersed repeated units (MIRU)

VNTR markers originally described by Supply *et al*⁽⁶³⁾ called MIRU, were identified while looking for a specific sequence of *M. tuberculosis* in the intergenic region SenX3-RegX3 region of *M. tuberculosis*⁽⁶⁴⁾. According to size, MIRU groups into three families: from 77 to 101 bp; 46 to 53 bp, and from 58 to 101 bp. The number of MIRU in the genome of *M. tuberculosis* is estimated in 40 to 50. Difference with other VNTR is the asymmetry and orientation in phase with adjacent genes. For genotyping strains from the *M. tuberculosis* complex the 12 most polymorphic MIRU's have been used. MIRU have stability larger than 18 mo, and because any analysis involves more than one locus, the power of discrimination is comparable to that described for IS6110-RFLP and DR- (Table 1). Reproducibility between laboratories is as high as 98 %, which makes them good markers for molecular epidemiology studies. MIRU genotyping based on PCR has the advantage of detecting very small quantities of DNA and that allows in combination with spoligotyping discriminates more unrelated strains. Results expressed simply by the number of repeated sequences by locus allow quick comparison of strains and to create worldwide databases^(20,25,65,66).

Another advantage of VNTR typing over other methods is the possibility of systematize the

silvestre, como de la inminente reactivación de la tuberculosis latente en los bovinos. Por otra parte, la caracterización de genotipos persistentes en una zona geográfica o población determinada puede facilitar el desarrollo de nuevos métodos de control⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾.

La genotipificación de cepas de *M. bovis* con RFLP inició desde 1985. Los marcadores RFLP más usados han sido: -IS6110, -DR y -PGRS. A partir de 1995 se inicia la utilización del *Spoligotyping*, método que debido a su rapidez, reproducibilidad y poder de discriminación se ha convertido en la primera opción para la genotipificación de *M. bovis*. Tal ha sido su utilidad que en 2001 se creó una base internacional de datos con spoligotipos de cepas de *M. bovis* (www.mbovis.org)^(14,27,43,44,65). Posteriormente, los primeros trabajos de tipificación de *M. bovis* con VNTR se reportaron a partir del 2002 y debido a su robustez, también se está construyendo una base de datos internacional con genotipos identificados por MPTR, ETR y MIRUs en la misma página www.mbovis.org. En la literatura aún se reportan trabajos con RFLP, pero en combinación con *Spoligotyping* y VNTR para tener un mayor poder de discriminación^(29,44,47,59,71,72).

Entre los ejemplos recientes del poder de la epidemiología molecular combinando de manera objetiva distintos marcadores genéticos, está un trabajo en poblaciones de ganado de varios países africanos sub-saharianos⁽⁷⁹⁾. En ese trabajo se identifica con alta frecuencia al denominado complejo clonal de *M. bovis* Af1 caracterizado por la delección RDAf1, mediante la ausencia del espaciador 30 en el *Spoligotyping*⁽⁸⁰⁾. Este grupo determinó que este complejo clonal está geográficamente limitado en la región, como resultado de la introducción de la tuberculosis bovina en vacas nativas. No obstante, al incluir marcadores VNTR demostró que existen distintas cepas dentro del grupo clonal correspondientes a cada país, probablemente debido a que la mezcla de cepas entre los países es poco común en esta área.

En China, se estudia una población de vacas con una prevalencia de 38 % de tuberculosis y por *Spoligotyping* se identifica a *M. tuberculosis* como

analysis. Instead of mixtures of PCR for each locus and display amplicons in agarose gels to determine size and allocate the number of repeated sequences, mixtures can be designed with multiple oligonucleotides marked differentially with fluorochromes, organized according to the sizes expected for each locus. Systematization saves time, optimize reagents and reduces costs. There is a need for capillary electrophoresis though. Furthermore, if there is a program for genotyping, such as sequencing systems, the size of the allele can also be codified automatically^(23,62). Some other ways to systematize the analysis of amplicons is by high pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to UV spectrophotometry⁽⁶⁷⁾. VNTR systematization confers robustness to the analysis because it minimizes person error and makes the analysis more objective, reproducible and efficient. Table 2 shows a list of VNTR's loci that have been studied, location within the genome of *M. tuberculosis* H37Rv strain. Expected amplicon size and the number of alleles identified in different strains of the tuberculosis complex analyzed up to now.

Short or simple sequence repeat (SSR)

Other markers useful for genotyping are short or simple sequence repeat (SSR) known before as microsatellites. The SRS are 1 to 6 nucleotides distributed in genomes from all kinds of organisms. Polymorphism due to additions or deletions goes from 10⁻⁶ to 10⁻² per generation. Like VNTR markers, SRS markers are amplified by PCR with specific oligonucleotides. Polymorphism reading is preferred by capillary electrophoresis, thus systematization is required. Mycobacteria genome has 220 SRS per KB. Due to abundance and polymorphism, it would be interesting to compare its usefulness for genotyping strains from the *M. tuberculosis* complex⁽⁶⁸⁾.

M. BOVIS GENOTYPING

There has been an increasing demand for genotyping *M. bovis* strains lately, especially in cases of cattle TB searching for sources of infection. The existence of reservoirs for BTB has encouraged the

causante de algunos de ellos⁽⁸¹⁾. Paralelamente, la tipificación de MIRU-VNTR del 82 % de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes en esa zona, tipificadas como de la familia Beijing, demostró que el tercer genotipo con mayor incidencia en humanos era igual al encontrado en el ganado bovino. En Portugal, al determinar la diversidad genética por *Spoligotyping* de cepas aisladas de ganado bovino, caprino, venado rojo y jabalíes se encontraron 29 spoligotipos distintos, en ganado bovino para producción de carne en sistema extensivo 12 de 13 spoligotipos se compartían con animales de fauna silvestre⁽⁸²⁾.

En un Parque Nacional en España se desarrolló un estudio para entender la epidemiología de *M. bovis* que afecta al ganado y a los animales silvestres⁽⁸³⁾. La caracterización molecular por *Spoligotyping* y MIRU-VNTR de las cepas aisladas reveló 9 genotipos de los cuales dos eran los de mayor prevalencia SB1232 (77.30 %) y SB1230 (15.34 %). Se pudo corroborar a las cepas de *M. bovis* persistentes en especies silvestres, como las de mayor prevalencia en ganado bovino. La variación de los genotipos observada sugiere eventos de microevolución en la población de *M. bovis* de esta área. Este estudio evidencia el riesgo que presenta la introducción de animales domésticos en áreas de vida silvestre, donde no existen garantías de libertad de enfermedades, diagnóstico apropiado y medidas de control. En Korea, la combinación de *loci* de VNTR permitió una discriminación entre cepas de 0.86, permitiendo señalar a dos genotipos con la mayor prevalencia (20 %)⁽⁸⁴⁾. Mediante un índice de la diversidad alélica (*h*), se determinó que los *loci* más discriminativos fueron QUB 3336 (*h*= 0.64), QUB 26 y MIRU 31 (*h*= 0.35).

Los estudios filogenéticos han determinado que las cepas de *M. bovis* de mayor prevalencia en Argentina fueron introducidas en bovinos importados del Reino Unido en el siglo XIX⁽⁹⁾. También han permitido identificar factores de riesgo para la transmisión del agente etiológico y la identificación de cepas drogo-resistentes; así como las vías comunes de infección en niños^(70,71,85,86,87). En México, el primer reporte de genotipificación de *M. bovis* se realizó en 1997 comparando los

development of epidemiologic studies to determine the role of wildlife in regional persistence of the disease, as well as to assess the impact on public health⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾. In the 2005 international conference on *M. bovis*, enormous interest was expressed in relation to the risk of more virulent strains arisen from of wildlife reservoirs. The evolution of strains to virulence and the epidemiologic impact of the indiscriminate move of animals between regions have to be established. More than that, characterization of genotypes persistent in a geographic area or a population need to be studied to develop new control strategies of the disease⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾.

Genotyping of *M. bovis* by RFLP started in 1985. Most used RFLP-bookmarks at that time were: IS6110, DR and PGRS. However, since 1995 spoligotyping became the first-choice method because it is fast, reproducible, easy to perform and shows high discriminatory power. The method became so popular that in 2001 an international database of spoligotypes for *M. bovis* (www.mbovis.org) was created^(14,27,43,44,65). As new markers were identified in the *M. bovis* genome, new genotyping methods have been developed. In 2002 the VNTR method was reported. VNTR is a robust method based on MPTR and ETR MIRU's. International types for *M. bovis* obtained with this method are also in www.mbovis.org. Spoligotyping, in combination with VNTR, have become the methods of choice for *M. bovis* epidemiological studies worldwide^(29,44,47,59,71,72).

A recent example of using a combination of these two methods to increase discrimination in *M. bovis* typing is that reported by Müller *et al*⁽⁷⁹⁾ in cattle populations in several sub-Saharan African countries. Authors identify a so called clonal complex of *M. bovis* characterized by the deletion RDAf1 through the absence of spacer 30 in spoligotyping⁽⁸⁰⁾. This group found that this clonal complex is geographically limited to that region, as a result of the introduction of bovine tuberculosis in native cattle. However, when VNTR markers were included, it was shown that different strains, particular to each country were present, indicating that mixture of strains between countries is not common in that area.

patrones de RFLP-DR de las cepas BGC utilizadas como vacuna en diversos países⁽³³⁾. Posteriormente se realizaron algunos trabajos con *Spoligotyping* en aislamientos de *M. bovis* de bovinos sacrificados en el norte y de algunas otras regiones del país, incluyendo una combinación de marcadores RFLP-IS6110 y RFLP-PGRS^(32,40,46).

La tipificación molecular puede innovar la identificación de *M. bovis* y al mismo tiempo, generar genotipos mediante la combinación de distintos marcadores polimórficos, para la investigación epidemiológica en zonas acreditadas para la exportación de ganado^(4,7). En Estados Unidos de América (EUA) se analizaron 41 cepas aisladas de *M. bovis* en ese país, utilizando 27 *loci* VNTR⁽⁸⁸⁾. Usando sólo un subgrupo de 6 *loci*, las cepas se diferenciaron en 14 grupos, los cuales estaban genéticamente relacionados y presentaron concordancia con los datos de rastreo epidemiológicos generados de forma tradicional.

La combinación de los marcadores spoligootyping y VNTR ha demostrado el mayor poder de discriminación entre cepas. Al tratar de determinar la fuente más probable de infección en el ganado bovino de origen mexicano que ingresa a los EUA, utilizando la genotipificación por *Spoligotyping*, un grupo de investigación binacional, observó spoligotipos específicos de cada país y una mayor diversidad genética en los aislamientos mexicanos⁽⁷⁷⁾. Se concluye que a pesar de la posibilidad del origen mexicano de algunos bovinos con lesiones sacrificados en los EUA, ese país tiene sus propias fuentes de infección, probablemente derivados de la transmisión entre ganado lechero y venados⁽¹¹⁾. El rastreo de cepas fuera del país es un logro conjunto de la tecnología y el quehacer científico, que permiten un diálogo franco y la toma de decisiones a luz de las evidencias.

Recientemente en México, mediante bacteriología se identificó a *M. bovis* como causa del 20 % del total de casos nuevos de tuberculosis en humanos, indudablemente asociados a la TBB⁽⁸⁹⁾. Asimismo, con *Spoligotyping* se identificó a *M. bovis* como causante de más del 13 % de tuberculosis activa en

In China, Chen *et al*⁽⁸¹⁾ studied a population of cows with a 38 % prevalence of tuberculosis by spoligotyping was determined that *M. tuberculosis* was the cause for some of them. When MIRU-VNTR was used, it was found that one third of 82 % of the *M. tuberculosis* strains isolated from patients in this area, defined as the Beijing family, was similar to that found in cattle. Similarly, in Portugal, while determining genetic diversity by for strains isolated from cattle, goats, red deer and wild boars by spoligotyping, found 29 different spoligotypes in beef cattle, 12 of 13 were similar to those found in wildlife⁽⁸²⁾.

A study was conducted to explore the epidemiology of *M. bovis* in cattle and wildlife in a Spanish National Park⁽⁸³⁾. Molecular characterization by MIRU-VNTR and spoligotyping of *M. bovis* found that from 9 genotypes, 2 were the most frequent: SB1232 (77.30 %) and SB1230 (15.34 %). Some of the most persistent strains in wildlife were similar to those found in cattle, suggesting microevolution of *M. bovis* in the area. This findings support the risk of introducing cattle in areas of wildlife, where no guaranty of disease freedom, biosecurity and diagnostic services are present. It has been estimated⁽⁸⁴⁾ that the combination of all VNTR *loci* have a discrimination power of 0.86. The combination was able to draw two genotypes with the highest prevalence (20 %). Calculating an allelic diversity index (h), it was demonstrated that the most discriminatory *loci* were: QUB 3336 (h = 0.64), QUB 26 and MIRU 31 (h = 0.35).

Phylogenetic studies have shown that the most prevalent strains of *M. bovis* in Argentina were introduced with cattle imported from the United Kingdom in the nineteenth century⁽⁹⁾. They have also identified risk factors for transmission of *M. bovis* and drug-resistant strains, as well as common pathways of infection in children^(70,71,85,86,87). The first report of *M. bovis* genotyping in Mexico was conducted in 1997, comparing patterns of RFLP-DR from BGC strains used as vaccine in different countries⁽³³⁾. Subsequently, studies have been conducted using spoligotyping, and some other genetic markers (RFLP-IS6110 and RFLP-PGRS) in isolates of *M. bovis* from cattle slaughtered in

pacientes de una zona con alta incidencia de TBB⁽³⁾. También en México se identificó a *M. bovis* como causante de casos de tuberculosis extra pulmonar en aproximadamente 14 % de pacientes con HIV y 7 % sin el virus⁽⁹⁰⁾. Estos casos estaban comúnmente asociados al consumo de productos lácteos no pasteurizados. Para entender la epidemiología de la tuberculosis causada por *M. bovis* en pacientes de los EUA se tipificaron 11,860 aislamientos por *Spoligotyping* y MIRU⁽⁹¹⁾. Ellos encontraron 165 (1.4 %) casos asociados a *M. bovis*, principalmente en pacientes hispanos no nacidos en EU, de menos de 15 años de edad, HIV positivos y con tuberculosis extra pulmonar, sugiriendo la transmisión alimentaria de *M. bovis*.

Las investigaciones para definir el impacto de *M. bovis* en la salud pública se verán beneficiadas con las técnicas de genotipificación modernas. Estas técnicas también coadyuvan al control de calidad del diagnóstico bacteriológico mediante el monitoreo de la contaminación, evitando el reporte de aislamientos falsos positivos asociados a la sobrecarga de trabajo o inexperiencia en laboratorios recién integrados^(51,92,93).

PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

El RFLP-IS6110 es poco eficiente para discriminar cepas de *M. bovis* debido a que posee pocas copias. Además los marcadores RFLP constituyen una técnica exhaustiva y demandante. Por el contrario, las técnicas basadas en PCR que permiten analizar un *locus*, como el *Spoligotyping* o diversos *loci*, como los VNTRs, son altamente factibles, reproducibles y codificables. La combinación de marcadores genéticos de alta y mediana estabilidad, como el *Spoligotyping* y los VNTRs, respectivamente, tiene un efecto sinérgico para discriminar entre cepas. Dicha combinación constituye potentes criterios de genotipificación, para expresar grupos discretos de clonas, crear bases homogéneas que integren información fidedigna y efectivos para la rastreabilidad. Otros marcadores como los SSR requieren una estimación confiable de su estabilidad, pero dada su abundancia podrían ser de gran utilidad en combinación y para casos con mayor información epidemiológica.

different regions trying to group strains by geographic location^(32,40,46).

Nowadays, molecular typing can identify and genotype *M. bovis* in tissue at the same time by combining different polymorphic markers for epidemiological studies in cattle exportation-accredited areas^(4,7). Forty-one *M. bovis* isolates from animals in North America were analyzed using 27 *loci* of VNTR's known⁽⁸⁸⁾. When using only a subset of 6 *loci*, 14 epidemiologically related groups of strains were distinguished; epidemiological relationship was determined by tracing back animals to origin.

The combination of markers, spoligotyping and VNTRs, have shown the best results in terms of discrimination. In trying to determine the probable source of infection for cattle of Mexican origin entering the United States of America (USA) Milian-Suazo *et al*⁽⁷⁷⁾ observed spoligotypes specific by country and greater genetic diversity in Mexican isolates. Conclusion was that despite of the possibility of some Mexican calves pass the border as false negative, the USA has its own sources of infection, most probably coming from wildlife⁽¹¹⁾. Tracking strains in a different country is the achievement of collaboration in technology and science, which allows communication and common decisions supported by scientific evidence.

Recently, *M. bovis* was identified as the cause of 20 % of all cases of tuberculosis in humans in a Mexican region⁽⁸⁹⁾. By spoligotyping it was established that *M. bovis* was involved in 13 % of those cases and that some share genetic similarity with those found in cattle⁽³⁾. Also in Mexico, Cicero *et al*⁽⁹⁰⁾ reported *M. bovis* cases of extrapulmonary tuberculosis (14 % HIV-positive and 7 % HIV-negative) which related to the consumption of dairy, unpasteurized products. To understand the epidemiology of tuberculosis caused by *M. bovis* in patients from the United States, Hlavsa *et al*⁽⁹¹⁾ typed 11,860 isolates by spoligotyping and MIRU, 165 (1.4 %) of these cases were caused by *M. bovis*. Patients were primarily Hispanics, less than 15 yr old, HIV positive and with extra pulmonary tuberculosis; suggesting oral transmission.

La genotipificación bacteriana es un proceso que ha venido evolucionando de manera continua tratando de dar respuesta a los cuestionamientos epidemiológicos de la biomedicina. Una de sus principales aplicaciones es la detección de focos de infección. La identificación precisa de *M. bovis* en cada caso es de vital importancia para conocer la distribución de este microorganismo en diversas poblaciones, pero el cultivo bacteriológico y las pruebas bioquímicas constituyen una barrera de tiempo. No obstante, a pesar de que el poder discriminación, reproducibilidad, estabilidad y factibilidad de algunos métodos sean óptimos, la relación genética no es sinónimo de relación epidemiológica. De esta observación deriva la importancia de capturar información geográfica, clínica y patológica entre otras, que sustente los hallazgos. Lo anterior nos lleva a concluir también que la información generada por la tipificación no deja de ser una herramienta al servicio del profesional de la salud para la toma de decisiones. En México, la integración de diversos grupos de investigadores permitirá la creación de una base de datos nacional que agrupe los genotipos obtenidos de *M. bovis*, tanto de animales domésticos, como de humanos y fauna silvestre. Esta base saturada de genotipos con diversos marcadores, así como de información epidemiológica convencional, coadyuvará al control y erradicación de la TBB.

LITERATURA CITADA

1. Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex MAC. *Vet Res* 2005;363:411-436.
2. de Kantor IN, Ritacco V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol* 2006;1122-4:111-118.
3. Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartín-Chávez M. Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico. *Salud Pública Mex* 2008;504:286-291.
4. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis* 2008;146:909-916.
5. Scorpio A, Collins D, Whipple D, Cave D, Bates J, Zhang Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol* 1997;35:106-110.

Research to identify the impact of *M. bovis* in public health will benefit from the existence of modern genotyping techniques. These techniques will contribute to evaluate quality of bacteriological diagnosis by monitoring contamination and preventing false positive reports in new laboratories or laboratories with high workload and inexperience^(51,92,93).

PERSPECTIVES AND CONCLUSIONS

IS6110-RFLP is not very efficient in discriminating strains of *M. bovis* due to low copy number and because the process is demanding and time consuming. PCR-based techniques, which allow analyzing a *locus*, such as spoligotyping, or various loci, such as VNTR's, have shown to be better. They are reproducible and produce genetic patterns easy to codify. The combination of genetic markers with high and medium stability, such as spoligotyping and VNTR, has a synergistic effect to discriminate strains. This combination constitutes powerful criteria for genotyping, to express discrete groups of clones and to build homogeneous databases with reliable information for effective traceability. Other markers, such as the SSR require reliable estimates of stability; however, because they are abundant they are useful when used in combination and in those cases with good epidemiological information.

Bacterial genotyping has been evolving continuously in response to epidemiological and medical questions. One of the main applications is in detecting sources of infection in outbreaks. The identification of *M. bovis* in each case is vital to know the distribution of the bacilli in different populations, but bacteriological culture and biochemical tests represent a barrier of time. However, despite the fact that discrimination power, reproducibility, stability and feasibility of the genotyping methods are optimal, the genetic relationship is not synonymous of epidemiological relationship. Therefore, in order to establish genetic and epidemiological information, appropriate geographic, clinical and pathological information is required to support findings. This leads us to conclude that any information generated by

6. de Jong BC, Onipede A, Pym AS, Gagneux S, Aga RS, DeRiemer K, Small PM. Does resistance to pyrazinamide accurately indicate the presence of *Mycobacterium bovis*? J Clin Microbiol 2005;437:3530-3532.
7. Porphyre T, McKenzie J, Stevenson M. A descriptive spatial analysis of bovine tuberculosis in intensively controlled cattle farms in New Zealand. Vet Res 2007;383:465-479.
8. Carter SP, Delahay RJ, Smith GC, Macdonald DW, Riordan P, Etherington TR, Pimley ER, et al. Culling-induced social perturbation in Eurasian badgers *Meles meles* and the management of TB in cattle: an analysis of a critical problem in applied ecology. Proc Biol Sci 2007;2741626:2769-2777.
9. Cataldi AA, Gioffré A, Santangelo MP, Alito A, Caimi K, Bigi F, Romano MI, Zumárraga M. The genotype of the principal *Mycobacterium bovis* in Argentina is also that of the British Isles: did bovine tuberculosis come from Great Britain? Rev Argent Microbiol 2002;341:1-6.
10. Miller R, Kaneene JB, Schmitt SM, Lusch DP, Fitzgerald SD. Spatial analysis of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer *Odocoileus virginianus* in Michigan, USA. Prev Vet Med 2007;821-2:111-122.
11. O'Brien DJ, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Berry DE, Hickling GJ. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: The Michigan, USA. 4th Intern Conf on *Mycobacterium bovis*. 2005;1122-4:313-323.
12. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci. USA. 2003;10013:7877-7882.
13. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci. USA. 2002;996:3684-3689.
14. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog 2005;11:e5.
15. Amadio A, Romano MI, Bigi F, Etchechoury I, Kubica T, Niemann S, Cataldi A, Caimi K. Identification and characterization of genomic variations between *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* H37Rv. J Clin Microbiol 2005; 435:2481-2484.
16. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect Immun 1991;598:2695-2705.
17. Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. Rev Sci Tech 2000;193:689-701.
18. Durr PA, Hewinson RG, Clifton-Hadley RS. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. Rev Sci Tech 2000;193:675-688.
19. Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res Vet Sci 2004;761:1-18.
20. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongarnpim P, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999; 378:2607-2618.
21. Olive DM, Bean P. Principles and Application of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organism. J Clin Microbiol 1999;376:1661-1669.
22. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Cousins D. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol1998;614:311-324.
23. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, De Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. J Clin Microbiol 1993;315:1143-1147.
24. Singh SK, Verma R, Shah DH. Molecular fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from India by restriction fragment length polymorphism. J Vet Sci 2004;54:331-335.
25. Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. J Clin Microbiol 2006;446:1951-1962.
26. Costello E, Flynn O, Quigley F, O'Grady D, Griffin J, Clegg T, McGrath G. Genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from badgers in four areas of the Republic of Ireland by restriction fragment length polymorphism analysis. Vet Rec 2006;15919:619-623.
27. Costello E, O'Grady D, Flynn O, O'Brien R, Rogers M, Quigley F, Egan J, Griffin J. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. J Clin Microbiol 1999;3710:3217-3222.
28. Skuce RA, Brittain D, Hughes MS, Neill SD. Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. J Clin Microbiol 1996;3410:2469-2474.
29. Michel AL, Hlokwé TM, Coetzee ML, Maré L, Connaway L, Rutten VP, Kremer K. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. Vet Microbiol 2008;1261-3:151-159.

End of english version

30. Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, Hughes MS, Skuce RA, van Embden JD, Neill SD. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Vet Microbiol* 1998;611-2:111-120.
31. Zanini MS, Moreira EC, Salas CE, Lopes MT, Barouni AS, Roxo E, Telles MA, Zumarraga MJ. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from south-east Brazil by spoligotyping and RFLP. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005;523:129-133.
32. Santillan-Flores MA, Flores J, Arriaga-Diaz C, Romero-Torres C, Suárez-Güemes F, Espitia C. Polymorphism of the PE domain of PE/PE_PGRS sequences in clinical isolates of *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Vet Microbiol* 2006;1154:364-369.
33. Howard, S.T.; Laszlo, A., Johnson, W.M. Genetic Identification of *Mycobacterium bovis* BCG by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Direct-Repeat Region. *J Clin Microbiol* 1997;354:965-968.
34. Cameron H, O'Brien R, Murray A, Cryan B, Hone R, Rogers M. Evaluation of the *Mycobacterium bovis* restriction fragment length polymorphism probe pUCD, in combination with the direct repeat probe, for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Ireland. *J Clin Microbiol* 2001;3912:4404-4406.
35. Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 *esx* gene cluster regions. *BMC Evol Biol* 2006;6:95.
36. O'Brien R, Danilowicz BS, Bailey L, Flynn O, Costello E, O'Grady D, Rogers M. Characterization of the *Mycobacterium bovis* restriction fragment length polymorphism DNA probe pUCD and performance comparison with standard methods. *J Clin Microbiol* 2000;389:3362-3369.
37. Glennon M, Jäger B, Dowdall D, Maher M, Dawson M, Quigley F, Costello E, Smith T. PCR-based fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates. *Vet Microbiol* 1997;54:235-245.
38. Gutiérrez M, Samper S, Gavigan JA, García Marín JF, Martín C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J Clin Microbiol* 1995;3311:2953-2956.
39. Caimi K, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bigi F, Cataldi A. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 2001;393:1067-1072.
40. Cobos-Marín L, Montes-Vargas J, Zumarraga M, Cataldi A, Romano MI, Estrada-García I, Gonzalez-y-Merchand JA. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. *Can J Microbiol* 2005;5111:996-1000.
41. Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Dang DA, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 2003;415:1963-1970.
42. Javed MT, Aranaz A, de Juan L, Bezos J, Romero B, Alvarez J, Lozano C, Mateos A, Dominguez L. Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. *Tuberculosis Edinb* 2007;875:437-45.
43. Roring S, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Vet Microbiol* 2000;743:227-236.
44. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996;3411:2734-2740.
45. Cousins D, Williams S, Liébana E, Aranaz A, Bunschoten A, Van Embden J, Ellis T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998;361:168-178.
46. Milian-Suazo F, Banda-Ruiz V, Ramirez-Casillas C, Arriaga-Diaz C. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. *Prev Vet Med* 2002;554:255-256.
47. Zumarraga MJ, Martin C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F, Ramos MC, Cataldi A, van Soolingen D, Romano MI. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *J Clin Microbiol* 1999;372:296-303.
48. Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, van Soolingen D, Hewinson RG, Smith JM. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol* 2006;2392:220-225.
49. Haddad N, Ostyn A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, Inwald J, Hewinson RG, Durand B. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin Microbiol* 2001;3910:3623-3632.
50. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 1998;144 Pt 5:1189-1196.
51. Gascoyne-Binzi DM, Barlow RE, Frothingham R, Robinson G, Collins TA, Gelletlie R, Hawkey PM. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2001;391:69-74.
52. Ablordey A, Hilty M, Stragier P, Swings J, Portaels F. Comparative nucleotide sequence analysis of polymorphic variable-number tandem-repeat Loci in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* 2005;4310:5281-5284.
53. Bricker BJ, Ewalt DR. Evaluation of the HOOF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol* 2005;5:37.
54. Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Bystrom M, Fox J, Chu M, Forsman M, Sjostedt A, Keim P. Worldwide genetic relationships among Francisella tularensis isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol* 2004;18617:5808-5818.
55. Koeck JL, Njanpop-Lafourcade BM, Cade S, Varon E, Sangare L, Valjevac S, Vergnaud G, Pourcel C. Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. *BMC Microbiol* 2005;5:66.
56. Le Fleche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramière V, Sylvestre P, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* 2001;1:2.
57. Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Kapperud G. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *J Clin Microbiol* 2003;414:1469-1479.

58. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, Travis J, Potempa J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2003;414:1801-1804.
59. Hilty M, Diguimbaye C, Schelling E, Baggi F, Tanner M, Zinsstag J. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat VNTR typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Vet Microbiol* 2005;1093-4:217-222.
60. Roring S, Scott A, Brittain D, Walker I, Hewinson G, Neill S, Skuce R. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2002;406:2126-2133.
61. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 2002;148:519-528.
62. Skuce RA, McDowell SW, Mallon TR, Luke B, Breadon EL, Lagan PL, McCormick CM, McBride SH, Pollock JM. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats. *Vet Rec* 2005;15717:501-504.
63. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001;3910:3563.
64. Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998;364:937-943.
65. Mignard S, Pichat C, Carret G. *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France. *Emerg Infect Dis* 2006;129:1431-1433.
66. Roring S, Scott AN, Glyn Hewinson R, Neill SD, Skuce RA. Evaluation of variable number tandem repeat VNTR loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol* 2004;1011:65-73.
67. Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, Boese KA, Warren RE, Hong G. Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 2004;429:4175-4180.
68. Sreenu VB, Kumar P, Nagaraju J, Nagarajaram HA. Simple sequence repeats in mycobacterial genomes. *J Biosci* 2007;321:3-15.
69. Romero B, Aranaz A, de Juan L, Alvarez J, Bezos J, Mateos A, Gómez-Mampaso E, Domínguez L. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same profile as isolates from animals. *J Clin Microbiol* 2006;449:3405-3408.
70. Gibson AL, Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A, Inwald J, Drobniowski FA. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2004;42:431-434.
71. Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *J Clin Microbiol* 2006;4411:4218-4221.
72. Parra A, Fernández-Llario P, Tato A, Larrasa J, García A, Alonso JM, Hermoso de Mendoza M, Hermoso de Mendoza J. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet Microbiol* 2003; 971-2:123-133.
73. Parra A, Larrasa J, García A, Alonso JM, de Mendoza JH. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol* 2005;1103-4:293-300.
74. Serraino A, Marchetti G, Sanguinetti V, Rossi MC, Zanoni RG, Catozzi L, Bandera A, et al. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J Clin Microbiol* 1999;379:2766-2771.
75. Corner LAL. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. 4th International Conference on *Mycobacterium bovis*. 2005;1122-4:303-312.
76. Michel AL, Bengis RG, Keet DF, Hofmeyr M, de Klerk LM, Cross PC, Jolles AE, et al. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: Implications and challenges 4th Intern Conf *Mycobacterium bovis*. 2005;1122-4:91-100.
77. Milián-Suazo F, Harris B, Arriaga Díaz C, Romero Torres C, Stuber T, Alvarez, Ojeda G, Morales Loreda A, Perez Soria M, Payeur JB. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Prev Vet Med* 2008;873-4:261-271.
78. Ryan TJ, Livingstone PG, Ramsey DSL, de Lisle GW, Nugent G, Collins DM, Buddle BM. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: The experience from New Zealand. 4th Intern Conf *Mycobacterium bovis*. 2005;1122-4:211-219.
79. Müller B, Hilty M, Berg S, García-Pelayo MC, Dale J, Boschirolu ML, Cadmus S, Et al. An epidemiologically important clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon and Chad. *J Bacteriol* 2009;1916:1951-1960.
80. Müller B, Steiner B, Bonfoh B, Fané A, Smith NH, Zinsstag J. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC Vet Res* 2008;4:26.
81. Chen Y, Chao Y, Deng Q, Liu T, Xiang J, Chen J, Zhou J, et al. Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. *Tuberculosis Edinb* 2009;891:95-100.
82. Duarte EL, Domingos M, Amado A, Botelho A. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet Microbiol* 2008;1303-4:415-421.
83. Romero B, Aranaz A, Sandoval A, Alvarez J, de Juan L, Bezos J, Sánchez C, et al. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation. *Vet Microbiol* 2008;1321-2:87-95.
84. Jeon B, Je S, Park J, Kim Y, Lee EG, Lee H, Seo S, Cho SN. Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea. *J Vet Sci* 2008;92:145-153.
85. Kazwala RR, Kusiluka LJ, Sinclair K, Sharp JM, Daborn CJ. The molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in Tanzania. *Vet Microbiol* 2006;1122-4:201-210.
86. LoBue PA, Betancourt W, Cowan L, Seli L, Peter C, Moser KS. Identification of a familial cluster of pulmonary *Mycobacterium bovis* disease. *J Tuberc Lung Dis* 2004;89:1142-1146.
87. Velayati AA, Farnia P, Boloorsaze MR, Sheikholislami MF, Khalilzadeh S, Hakeeme SS, Masjedi MR. *Mycobacterium bovis* infection in children in the same family: transmission through inhalation. *Monaldi Arch Chest Dis* 2007;673:169-172.

88. Martinez LR, Harris B, Black WC 4th, Meyer RM, Brennan PJ, Vissa VD, Jones RL. Genotyping North American animal *Mycobacterium bovis* isolates using multilocus variable number tandem repeat analysis. *J Vet Diagn Invest* 2008;206:707-715.
89. Valdez-Vázquez R. Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en humanos. INER-INCMNSZ Foro estatal de tuberculosis bovina y brucelosis. Guadalajara, Jalisco. 2007 [comunicación personal].
90. Cicero R, Olivera H, Hernández-Solis A, Ramírez-Casanova E, Escobar-Gutiérrez A. Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and -negative Mexican patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;2711:1137-40.
91. Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Crawford JT, Lobue PA. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 2008;472:168-175.
92. Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Andersen AB. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997;354:988-991.
93. Maurer JR, Desmond EP, Lesser MD, Jones WD Jr. False-positive cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 1984;863:439-443.