



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHAVEZ”**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Tipificación molecular y diversidad genética de
Mycobacterium spp”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

**MED. CIR. CON ESPECIALIDAD EN EPIDEMIOLOGÍA
DAVID MARÍN HERNÁNDEZ**

DIRECTORAS DE TESIS:

**D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS
D. en C. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO**

Morelia, Michoacán, Noviembre 2008

AGRADECIMIENTOS:

**A QUIEN NOS DIO LA EXISTENCIA, LA CONSCIENCIA, EL AMOR, LA LUZ,
NUESTROS MÁS PUROS SENTIMIENTOS, Y EN GENERAL LA VIDA MISMA.
GRACIAS A ESE GRAN SER OMNIPRESENTE.**

Cada etapa de nuestras vidas es un paso que damos en la búsqueda de la superación personal, familiar y social, como parte de un todo. Y es imperante agradecer a todos los que nos ayudaron a avanzar, con su confianza, sus conocimientos y su valioso tiempo.

Gracias a mis padres Carmen y Rodolfo, quienes fueron mis primeros maestros, además de darme toda su vida. A Lourdes, mi esposa y a mis hijos David y Tania por su comprensión y por compartir su tiempo con mi trabajo, a quienes quiero expresar mi amor y dedicar este trabajo. Gracias a toda mi familia,

Las instituciones no están constituidas por los edificios, sino por quienes están dispuestos a servir. Nosotros contamos con la fortuna de conocer y ser aceptados como discípulos de grandes personas: Nuestros Maestros, que nos estimulan a trabajar para poder aprender, nos inquietaron por buscar otros puntos de vista, incitando el sentido especial que es la perspectiva de la investigación, ayudándonos a comprender y vislumbrar otras posibilidades, en todo esto y más me ayudaron ustedes mis Maestros y Amigos. Especial agradecimiento a mis Directoras de Tesis: D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y D. en C. Ma. Guadalupe Zavala Páramo; a nuestro Tutor, M en C.M. Cleto Álvarez Aguilar y al D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo, por su asesoría calificada y desinteresada que me brindaron con tanta paciencia y entrega. Gracias por ser tutores y piedra angular de nuestra apoteosis.

**A TODOS AQUELLOS, QUIENES DE FORMA DIRECTA O INDIRECTA ME
INSPIRARON Y APOYARON DURANTE TODA MI FORMACIÓN PERSONAL Y
PROFESIONAL: UN MILLÓN DE GRACIAS**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH, bajo la dirección de la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas, la codirección de la D. en C. María Guadalupe Zavala Páramo del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, la tutoría del M. en C.M. Cleto Álvarez Aguilar de la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica del Hospital General Regional N° 1 del IMSS en Morelia, Mich., y la colaboración de la Q.F.B. Gabriela Vázquez Narváez del Departamento de Microbiología del Hospital General “Dr. Miguel Silva” de Morelia, Mich., de la SSM.

El Med. Cir. Especialista en epidemiología David Marín Hernández, recibió una beca del IMSS-SNTSS para realizar sus estudios de Maestría.

ÍNDICE

• Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Tuberculosis	
1.1.1 Incidencia de la enfermedad.	
1.1.2 Agente causal	
1.1.3 Epidemiología.	
1.1.4 Inmunopatología.	
1.1.5 Diagnóstico de la tuberculosis.	
1.1.6 Estimación de la variabilidad genética.	
2. Planteamiento del problema	14
3. Justificación	15
4. Objetivos	17
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos específicos	
5. Estrategia	17
6. Materiales y Métodos.	18
6.1 Población de estudio y muestra	
6.2 Criterios de inclusión.	
6.3 Criterios de exclusión	
6.4 Criterios de eliminación	
6.5 Cepas de referencia	
6.6 Procesamiento de los Aislados Clínicos	
6.7 Extracción de ADN de alto peso molecular	
6.7.1 Aislados clínicos y cepas de referencia	
6.7.2 De esputo	
6.8 Identificación del <i>Mycobacterium</i> presente	
6.8.1 Iniciadores utilizados en la amplificación PCR.	
6.8.2 Condiciones de amplificación.	
6.9 Determinación de la variabilidad genética.	
6.9.1 Ensayos de amplificación tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).	
6.9.2 Análisis de Datos.	
7. Resultados	23
8. Discusión	31
9. Bibliografía	36

ÍNDICE DE TABLAS

		Pag.
1	Cepas bacterianas de referencia	18
2	Iniciadores utilizados en las amplificaciones PCR	20
3	Iniciadores empleados en los ensayos RAPD.	22
4	Parámetros de diversidad genética obtenidos mediante los datos RAPD.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pag.
1	ADN de aislados bacterianos.	23
2	ADN de esputo.	23
3	PCR de ADN de aislado con iniciadores universales para bacterias.	24
4	PCR rápido de ADN de aislado y esputo con iniciadores específicos para el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	24
5	PCR rápido de ADN de cepas de referencia con iniciadores SA1 y SA2.	25
6	PCR rápido de ADN de expectoración con iniciadores SA1 y SA2.	25
7	PCR rápido de ADN de aislado con iniciadores SA1 y SA2.	25
8	Amplificación PCR con el ADN de aislados bacterianos con iniciadores específicos para <i>M. bovis</i>	26
9	Ensayo RAPD de los aislados bacterianos	27
10	Dendograma de <i>M. tuberculosis spp</i>	29
11	Análisis de coordenadas principales.	30

RESUMEN

La Tuberculosis sigue siendo la enfermedad infecciosa con mayor prevalencia en el mundo con un tercio de la población infectada por algún miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

La enfermedad se ha expandido en los países en desarrollo y para el 2005 en México la incidencia fue de 15,249 nuevos casos pulmonares confirmados en el laboratorio.

Aunque *Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal principal de la tuberculosis humana, se han reportado continuamente casos de tuberculosis asociada a *M. bovis* y esta zoonosis se ha convertido en un problema de salud pública, principalmente debido a su asociación con pacientes con inmunodeficiencia causada por el VIH.

En Michoacán existe gran variedad de factores de riesgo para la infección por *M. tuberculosis*, sin embargo, se carece de estudios sobre la diversidad genética de las cepas que afectan a la población.

En este trabajo se estandarizó un ensayo para la tipificación genético molecular de aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Este método disminuye sustancialmente el tiempo de diagnóstico de 48 a 6 horas, desde la preparación de la muestra para la extracción del ADN, hasta la tipificación del *Mycobacterium tuberculosis*. De los 46 aislados analizados uno fue tipificado como *M. bovis*, siendo el primer caso reportado para México de dicha especie en tuberculosis humana. También se analizó la diversidad genética de los aislados mediante el ensayo PCR-RAPD encontrándose cuatro grupos y un aislado independiente mediante el criterio de agrupamiento UPGMA. El análisis de los datos mediante el análisis de coordenadas principales es congruente con el agrupamiento UPGMA. El valor de diversidad genética media calculado para la población de estudio fue de 0.234 y el índice corregido de Shannon-Wiener fue de 2.04. Los resultados de diversidad obtenidos son comparables con los reportados para otras poblaciones de *M. tuberculosis*, no obstante el empleo de únicamente tres iniciadores RAPD.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis

1.1.1 Incidencia de la Enfermedad.

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa más antigua que afecta al hombre a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en 1990 un tercio de la población mundial se encontraba infectada de *Mycobacterium tuberculosis*, con 10 millones de casos nuevos y 3.5 millones de defunciones atribuidas a la tuberculosis por año. La tasa mundial de incidencia de TB (per cápita) creció en aproximadamente un 1,1% anual y el número de casos en un 2,4% anual. La tasa mundial de detección de casos bacilíferos fue del 37% en 2002 lo que establece que no solo es una enfermedad infecciosa antigua, sino que prevalece como problema de salud pública (WHO 2004, 2005).

La OMS considera que cada segundo se produce un nuevo caso de tuberculosis en el mundo. Del 5 al 10% de las personas que están infectadas se enferman o son contagiosas en algún momento de su vida. Además, las personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA) son más propensas a enfermarse por tuberculosis. Para el 2005 la OMS reportó 8'811,000 casos nuevos (tasa de 136 por 100 mil habitantes), de los cuales 3'902,000 fueron bacilíferos (que son los casos más infecciosos) con una tasa de 60; una prevalencia de 14'052,000 casos y como causa de muerte de 1'577,000 con una tasa de mortalidad de 24. La infección se está extendiendo principalmente en los países en desarrollo y se ha relacionado con la desnutrición, poco acceso a los servicios de salud, así como a bajos ingresos y a las malas condiciones de vida en los grandes centros urbanos (WHO 2007).

La incidencia de la Tuberculosis había ido descendiendo paulatinamente en las últimas décadas de forma que en E.U.A. la prevalencia en 1986 era sólo de 9.4 por 100,000 habitantes y se había conseguido un descenso anual del 5-6% que auguraba la erradicación de la enfermedad para comienzos del S. XXI. Sin embargo, para 1990 se estimó que cerca de 1/3 de la población mundial se había infectado (Wada, 2001; Seng et al., 2002). En años recientes se ha producido un aumento en la incidencia de la

tuberculosis, asociado con un aumento dramático de la resistencia a múltiples drogas y a la gran cantidad de infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH). La aparición del VIH/SIDA ha supuesto un resurgimiento excepcional de esta enfermedad en todo el mundo, y por ello anualmente aparecen más de 8 millones de nuevos casos de tuberculosis (Bradi et al., 2001). Por otro lado, el crecimiento del porcentaje de la inmunosupresión iatrogénica, ha incrementado rápidamente la incidencia de enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas (Falkinham, 1996; Horsburgh, 1996). Así mismo, se ha observado un incremento en el potencial patogénico de las especies de micobacterias que anteriormente eran consideradas como no patógenas (Smith 2003).

En algunos países la incidencia de tuberculosis llega a ser de 400 por cada 100,000 habitantes y aunque no existen datos globales sobre todos los tipos de tuberculosis, se estima que la incidencia es probablemente superior a 70 por cada 100,000 habitantes, aunque sin duda será mucho mayor en ciertas áreas y grupos de riesgo, (las clases más desfavorecidas y grupos de personas jóvenes en las etapas más productivas de su vida). La tuberculosis se ha declarado una emergencia global en el mundo por la Organización Mundial de la Salud y continúa siendo un problema de salud pública en México, donde está incluida dentro de las 20 principales causas de muerte (García et al., 2001).

En México, la tuberculosis ocupa el lugar número 15 como causa de mortalidad y de acuerdo al sistema de notificación semanal de enfermedades la tasa ha fluctuado entre 16 y 18 por cada 100,000 habitantes durante el periodo 1990-1994, con una mortalidad de 7,3 en 1990 y de 5.4 por cada 100,000 habitantes en 1994. La Organización Mundial de la Salud reporta que en México en el 2005 ocurrieron 2,293 defunciones por esta enfermedad con una tasa de mortalidad de 2 (WHO Report 2007).

En México para el 2005, se reportaron 15,249 casos nuevos de tuberculosis pulmonar confirmados por técnicas microbiológicas, con una tasa de incidencia de 14.33 casos por 100,000 habitantes (WHO 2007).

1.1.2 Agente causal

En el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* se han incluido tradicionalmente a las especies: *M. tuberculosis*, *M. Bovis*, *M. Bovis BCG*, *M. africanum* (con tres subtipos), y *M. microti* (Tiruvilumala y Reichman, 2002). Los estudios taxonómicos basados en las características fenotípicas, la relación de antígenos citoplásmicos solubles y la homología en su ADN indican claramente que son variantes de la misma especie (Mustafa et al., 1999). Recientemente se han incorporado a este complejo nuevas variantes que incluyen a *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y el bacilo *dassie* (Mostowy y Behr, 2005).

Mycobacterium tuberculosis es el principal agente causal de la tuberculosis humana (Tiruvilumala y Reichman 2002; Burgos y Pym 2002). Sin embargo, se han reportado continuamente casos asociados a *M. bovis* y esta zoonosis se ha convertido en un problema de salud pública, principalmente por su asociación con pacientes inmunosuprimidos por VIH (Cosivi et al., 1998; LoBue et al., 2003; Grange 2001; Thoen y LoBue, 2007).

Mycobacterium tuberculosis descubierta por Roberto Koch en 1882, es una bacteria aerobia, no esporulada, no capsulada e inmóvil que precisa de un tiempo muy prolongado (15-20 h) para su multiplicación y que puede sobrevivir con facilidad en el medio intracelular y necesita de 3-5 semanas para crecer en los medios de cultivo, (Who Report, 1993).

1.1.3 Epidemiología.

El bacilo de la tuberculosis se transporta mediante pequeñas partículas de menos de 10 μm , emitidas al estornudar, hablar o toser. Con la tos pueden emitirse unas 3,000 partículas potencialmente infecciosas, e igual número pueden eliminarse al hablar 5 min, y muchas más al estornudar, y cada una de estas partículas infecciosas suele contener una o pocas bacterias que pueden permanecer viables suspendidas en el aire durante varios minutos, permitiendo que el contagio se realice incluso en ausencia del individuo enfermo, especialmente si la habitación donde estuvo ha permanecido cerrada y sin luz solar, ya que *M. tuberculosis* es sensible a la luz ultravioleta (Burgos y Pym., 2002).

Aproximadamente una tercera parte de las personas que han estado en contacto continuo con un paciente bacilífero se infectarán, mientras que sólo lo harán el 5% de los que han entrado en contacto continuo con un paciente no bacilífero. Entre las personas infectadas, del 5 al 15% acabarán desarrollando una tuberculosis en su vida (Ashok Rattan et al., 1998). Es mayor el riesgo en los primeros 2 años que siguen al contacto y en especial durante el primer año, en el que más del 3% de los infectados desarrollarán la enfermedad. Este riesgo varía con la edad y es mayor en los más jóvenes. Casi la mitad de los niños menores de 6 meses desarrollan tuberculosis si han estado en contacto continuo con una persona bacilífera (Smith, 2002).

El hombre es el único reservorio de *M. tuberculosis*, aunque la enfermedad puede afectar a los primates y a otras especies de mamíferos que están en contacto con él (Berman et al., 1999). Cuando ocurren reinfecciones lo más probable es que los pacientes se reinfecten por cepas de *M. tuberculosis* diferentes de la que le causó la infección inicial (Gillman et al., 2001). La tuberculosis es una enfermedad infecciosa inusual porque transcurren largos períodos entre la infección y la aparición de la enfermedad, que pueden ser semanas, meses o años. La tuberculosis en otros órganos diferentes al pulmón ha sido observada por muchos años, pero no siempre es reconocida como tuberculosis, por lo cual le han dado muchos nombres, se han reportado múltiples sitios extrapulmonares como los ganglios linfáticos, el aparato urogenital y el sistema nervioso central, lo mismo que el tejido osteoarticular, la piel, el pericardio y las glándulas endocrinas (Doki, et al., 2002; Piersimoni et al., 1998).

Por otro lado, se sabe que *M. bovis* no sólo causa la tuberculosis en el ganado, sino que también es muy virulento para el hombre, y puede encontrarse en la leche no pasteurizada (y ocasionalmente en otros productos lácteos) de vacas tuberculosas (Rodríguez et al., 1995). Los microorganismos ingeridos probablemente atraviesan la mucosa de la faringe y el intestino (aunque sin lesión apreciable) y causan lesiones precoces en los ganglios linfáticos cervicales o en los ganglios mesentéricos. La diseminación que sigue a estas localizaciones afecta principalmente a los huesos y a las articulaciones. Cuando el microorganismo se inhala (por ej, por granjeros) puede causar tuberculosis pulmonar, que resulta indistinguible de la producida por *M. tuberculosis* (Wang et al., 1999).

1.1.4 Inmunopatología.

Histológicamente, el bacilo tuberculoso origina dos tipos de reacción: 1) Lesiones exudativas que se observan al comienzo de la infección, o en los individuos en los que las bacterias proliferan rápidamente sin encontrar gran resistencia por parte del huésped. La inflamación aguda o subaguda aparece con exudado o líquido y acumulación de leucocitos polimorfonucleares alrededor de las bacterias. 2) En los individuos enfermos que se vuelven alérgicos a la tuberculina aparecen lesiones productivas (granulomatosas). Los macrófagos sufren grandes modificaciones en contacto con el bacilo tuberculoso o con sus productos, y se disponen concéntricamente en forma de células epiteloides alargadas, para formar los tubérculos característicos de la enfermedad, y en el centro de los tubérculos algunas de estas células pueden fusionarse para formar una o más células gigantes, con docenas de núcleos dispuestos en su periferia y con bacilos vivos. Alrededor de las múltiples capas de células epiteloides hay una cubierta de leucocitos y fibroblastos proliferantes, lo cual conduce eventualmente a una fibrosis externa con el desarrollo posterior de una necrosis caseosa. En las lesiones iniciales, el bacilo tuberculoso se localiza primariamente en el interior de los macrófagos, en los que se multiplica por un tiempo. En las lesiones más evolucionadas se observan sólo bacilos extracelulares. (Davis et al., 1997).

1.1.5 Diagnóstico

La base de un tratamiento efectivo es el diagnóstico eficaz de la enfermedad y de manera importante, de su agente causal, para evitar o disminuir de manera importante la capacidad de contagio y con el esquema adecuado coadyuvar a la curación de los pacientes. El control de una enfermedad implica conocer y llevar a cabo de manera correcta todos los procesos para lograr esa meta; por lo que, si la tuberculosis continua siendo alta en su prevalencia, significa que una o varias de las técnicas aplicadas en su detección y/o control son deficientes.

El diagnóstico de la tuberculosis inicialmente se basaba únicamente en el análisis de los síntomas clínicos; la identificación del agente etiológico se inició relativamente hace poco. En su detección se han incorporado ensayos y técnicas tales como:

a) Detección directa del patógeno por microscopía y/o cultivo

Es importante que ante la sospecha clínica o por estudio de contactos de un caso, con baciloscopia positiva, se confirme con tinción de BAAR o con otro método de identificación del agente etiológico, ya que la baciloscopia tiene una sensibilidad menor al 50% y una especificidad del 80%, para demostrar el agente etiológico. A pesar de ello es muy frecuente que únicamente con el resultado positivo de baciloscopia se establezca el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, lo que además de no referir el tipo de especie involucrada, conlleva a un sesgo en la detección de la enfermedad.

El diagnóstico de laboratorio mediante el cultivo a través de métodos tradicionales requieren entre 6 a 8 semanas; este período de espera ocasiona que se complique y/o se agrave el cuadro clínico, en espera de los resultados de laboratorio, antes de dar una quimioterapia ó cuando se inicia con un tratamiento inespecífico con el afán de ir atacando la infección se corre el riesgo de implementar una terapia inapropiada, resultando en un incremento en la morbilidad, mortalidad y en la selección artificial de micobacterias resistentes a antibióticos en la comunidad.

b) Radiografías del tórax

La tuberculosis pulmonar lesiona tejidos que casi siempre son causa de anormalidades que se pueden observar en las placas radiográficas. En la tuberculosis primaria ocurre como un resultado de la infección reciente y se ve como una zona con condensación o infiltrado pulmonar, frecuentemente asociado con adenopatía hilar ipsilateral, llamada imagen de mancuerna. La imagen de atelectasia puede resultar de la compresión de las vías aéreas por crecimiento de los nódulos linfáticos, esta manifestación es más común en niños. Sí el proceso primario persiste, puede ocurrir la cavitación que se aprecia en las radiografías y se localizan más frecuentemente en el lóbulo superior del pulmón izquierdo. Por otro lado es difícil valorar radiográficamente si un paciente con tuberculosis es bacilífero, ya que una lesión endobronquial, que es altamente contagiosa, puede no estar asociada a hallazgos radiográficos y en los casos no recientes puede aparecer la presencia de nódulos densos con o sin calcificación visible, y se menciona a menudo como una imagen sospechosa únicamente, a pesar de

considerarse que las lesiones nodulares o fibróticas son altamente sospechosas de infección tuberculosa. Las imágenes no características se encuentran más en niños y en pacientes inmunocomprometidos (American Thoracic Society, 2000).

La tomografía axial computarizada muestra imágenes más confiables, pero por su alto costo y tecnología no está al alcance de la gran mayoría de pacientes en los países en vías de desarrollo.

c) Métodos serológicos

- Detección de componentes proteicos del patógeno con ayuda de anticuerpos específicos (ELISA)
- Detecciones específicas de anticuerpos (Ac), IgA, IgM e IgG dirigidos contra un patógeno dado y los cambios en su título correspondiente. En los países en desarrollo, una prueba serológica positiva para Ac, refleja exposición a una especie de *Mycobacterium* y no indica la enfermedad.
- Hemoaglutinación.
- Precipitación en geles
- Pruebas de aglutinación
- Detección de antígenos micobacterianos (ELISA) en fluidos corporales utilizando un inmunosensor piezoeléctrico

d) Diagnóstico molecular.

En vista de la prevalencia mundial de la tuberculosis, se han hecho esfuerzos para desarrollar técnicas más eficaces y rápidas para identificar y caracterizar al bacilo tuberculoso. Una mejora en el diagnóstico de la tuberculosis han sido las técnicas de genética molecular (Cheng et al., 2007). Diversos métodos de tipificación molecular han sido utilizados para diferenciar aislados del complejo tuberculoso los cuales incluyen los métodos basados en el ensayo de PCR (Mostrom et al., 2002; Barnes et al., 2003; Mathema et al. 2006). El principio específico de éste procedimiento está basado en la amplificación de fragmentos específicos de secuencias de ADN de *M. tuberculosis* que permiten la identificación de la micobacteria.

El esputo es la muestra clínica utilizada para la identificación de *Mycobacterium*,

sin embargo, la ruptura de células y la presencia de inhibidores son dos problemas que se presentan frecuentemente en el aislamiento de ADN (Vázquez-Marrufo y col., 2002) sobre todo en muestras clínicas complejas como el esputo por la presencia de inhibidores de la PCR que pueden ser coextraídos con el ADN bacteriano (Holland y col. 2000). Estos inconvenientes han sido abordados de distintas maneras, Jhingan (1992) introdujo el uso de xantogenato de potasio (XP) para la extracción de ADN de plantas debido a la característica que dicho compuesto tiene de formar xantatos de polisacáridos insolubles en agua, lo cual ayuda a la ruptura de la pared celular. Adicionalmente, el xantogenato de potasio se une a iones metálicos, por lo que tiene el potencial de inhibir las nucleasas. A la fecha, el xantogenato ha sido empleado para el aislamiento de ADN de cianobacterias (Tillet y Neilan, 2000), suelo (Henneberger y col., 2006) y raíces micorrizadas (Martin y Rygiiewicz, 2005); sin embargo, no existen reportes que propongan el uso del XP para el aislamiento de muestras clínicas.

Utilizando estas técnicas genéticomoleculares, se han encontrado secuencias que son específicas para el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMBT), pero no solamente para *M. tuberculosis*. La secuenciación del gen 16S de ARN ribosomal y del interespaciador entre los genes 16S y 23S, han confirmado que el complejo *M. tuberculosis* está representado por cuatro taxa que deben ser separados a nivel subespecífico o intraespecífico (Huys et al., 2000). Las técnicas de diagnóstico molecular han sido utilizadas en muchas de las etapas del diagnóstico de *M. tuberculosis*. El principal objetivo consiste en identificar los aislados de este microorganismo especialmente cuando las diferencias incluyen otras micobacterias, ya sea clínicamente o cuando se encuentra una tinción ácido alcohol resistente positiva.

Los métodos de tipificación molecular incluyen también los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de los elementos transponibles IS6110 (Krishnan et al., 2007) presentes en copias múltiples en el genoma que se ha establecido como el estándar de oro para la tipificación del complejo *M. tuberculosis*; las secuencias repetitivas polimórficas ricas en GC basadas en RFLP (Yang, et al., 2000; Kremer et al., 1999); Spacer Oligonucleotide typing (Spoligotyping) de los *loci* de repetidos directos (Legrand et al., 2001; Sola et al., 2003); número variable de repeticiones en

tándem (VNTR) (Neill et al., 2005) y Mycobacterial Interspersed repetitive Units typing (MIRUs) (Cavusoglu et al., 2007).

El elemento multicopia de inserción IS6110 es un miembro de la familia IS3 de elementos de inserción y está ampliamente distribuido a través del complejo de *M. tuberculosis*. Se han encontrado hasta 25 copias de este IS en el genoma de aislados clínicos de *M. tuberculosis*, aunque también se han identificado algunas cepas que no lo presentan. De acuerdo a algunos esquemas de identificación de RFLP's la distribución del elemento IS6110 en el genoma es al azar, sin embargo, en la cepa H37Rv, IS6110 esta restringido a aproximadamente dos tercios del genoma alrededor del *locus* DR (Repetido Directo), mientras que también se han encontrado inserciones particulares en puntos determinados dentro del *locus* DR (Fang et al., 1998). La región DR es un *locus* polimórfico en el genoma de *M. tuberculosis* que comprende un cluster de secuencias repetidas de 36 pares de bases (pb) separadas por secuencias espaciadoras de 36 a 41 pb. Una secuencia repetida seguida de una secuencia espaciadora se denomina como un repetido variable directo (DVR). El número de DVR varía de cepa a cepa lo cual permite que este *locus* se use como marcador genético para diferenciar cepas (Fang et al., 1998).

Aunque los estudios con VNTR frecuentemente usan *loci* VNTR designados como mycobacterial interspersed repeat units (MIRU) (Cowan et al., 2002; Supply et al., 2000, 2001) y repetidos exactos en tandem (ETR) (Frothingham and O'Connell, 1998), la diferenciación de las cepas de *M. tuberculosis* usando tanto MIRU como ETR puede ser menos efectiva que el análisis RFLP (Kremer et al., 2005; Scott et al., 2005; Sun et al., 2004), aun cuando Supply et al., en 2006 buscaron mejorar el poder discriminatorio con un nuevo formato de MIRU-VNTR; además no pueden ser usados como una herramienta epidemiológica de rutina en áreas donde ciertos genotipos son prevalentes (Yokohama et al., 2007).

Recientemente se desarrolló un ensayo de amplificación de ADN para la identificación de *M. tuberculosis* de aislados clínicos pulmonares, disponible comercialmente (COBAS MTB, ROCHE), sin embargo algunos estudios han demostrado que el ensayo de amplificación de IS6110 es más sensible que el ensayo COBAS MTB (Rimek et al., 2002).

1.1.6 Estimación de la variabilidad genética.

Para el estudio de los agentes causales de una enfermedad infecciosa y por lo tanto del Complejo *M. tuberculosis*, es importante saber no solo qué microorganismo esta involucrado sino que en la actualidad se requiere conocer también la relación filogenética y la diversidad dentro de una población afectada, ya que nos permite estudiar también la relación entre los contactos de los enfermos y se puede llegar a establecer si se trata de una nueva especie (Frieden et al., 1995). Las herramientas de estudio molecular nos ayudan a descubrir si un brote infeccioso está dado por una especie similar o idéntica. Dentro de estas nuevas técnicas de estudio de huellas genéticas se encuentran los siguientes ensayos: Unidades micobacterianas repetitivas interespaciadas (MIRU: mycobacterial interspersed repetitive units) que son elementos o complejos genómicos distribuidos a lo largo del genoma de las micobacterias y con la identificación y comparación de estos complejos, el ensayo ha demostrado su potencial como clave en estudios de epidemiología molecular tanto en la transmisión, como en las recaídas de la tuberculosis (Mazars 2001). La identificación genotípica rápida (ARDRA: amplified rDNA restriction analysis) y el RFLP permitieron no solo identificar variedades inter-especie, sino encontrar diferencias taxonómicas y de sensibilidad a la temperatura de amplificación (Mijs et al., 2002). Estas técnicas son eficaces pero relativamente complejas por la existencia en el procedimiento de múltiples pasos, que alargan el tiempo de trabajo, lo cual limita su uso (Linton, 1994). Además, requieren de la existencia de amplias bibliotecas que contengan información de la mayoría de las especies a estudiar (De Baere et al., 2002). Existen diferentes kits comerciales que proporcionan interesantes resultados, pero tienen el gran inconveniente de ser muy caros, requieren consultar y comparar resultados con Bancos genéticos de datos y pueden dar resultados falsos positivos, por lo que algunos autores han vuelto la vista a técnicas más sencillas como la PCR múltiple (mPCR) (Mokaddas 2007). Recientemente, nuevos desarrollos en genómica funcional y comparativa, usando microarreglos de ADN y bioinformática han mostrado más ventajas para el entendimiento de la variabilidad genética entre *M. tuberculosis*. Sin embargo, la resolución de tales métodos para la detección de variación cromosomal se limita a inserciones y deleciones (eliminaciones) de suficiente tamaño para ser detectadas por

los microarreglos. Estos métodos pueden presentar fallas para detectar pequeños eventos de inserción/delección y son similares para encontrar polimorfismos simples de los nucleótidos (SNPs). Generalmente todos estos métodos de tipificación molecular requieren de mucho tiempo, son muy laboriosos y/o de alto costo.

a) RAPD's

Otro método de análisis molecular disponible para la identificación de la diversidad en las cepas de los agentes patógenos es la utilización de PCR en el ensayo RAPD (Amplificación Aleatoria de Polimorfismos de ADN), que amplifica uno o varios fragmentos de ADN anónimos, que pueden ser usados como marcadores moleculares, por lo que se puede considerar como un sistema de PCR múltiple. Esta técnica tiene como ventaja el no requerir un conocimiento genético previo de las secuencias involucradas. Utiliza un solo oligonucleótido usualmente de 10 bases de largo de secuencia arbitraria como, iniciador para la Taq polimerasa, para amplificar dominios al azar de ADN purificado, produciendo huellas moleculares características de cada cepa particular en una reacción de PCR con baja astringencia. La sustitución, inserción o delección (eliminación) de una única base, altera la alineación del oligonucleótido, causando diferentes perfiles RAPD que pueden ser usados para estimar diversidad y divergencia de nucleótidos (Dautle et al., 2002) El análisis RAPD es rápido, barato, fácil de realizar y puede ser usado para la determinación de heterogeneidad genética basado en la diversidad de las secuencias de ADN (Bowditch et al., 1993; Caetano-Anolles, 1991; Welsh et al., 1990; Williams, 1990). Este tipo de ensayo genético molecular ha sido empleado exitosamente para la tipificación de *M. tuberculosis* (Harn et al., 1997; Linton et al., 1994; Richner et al., 1997; Tazi et al., 2004) demostrando que con la elaboración y análisis de dendogramas se puede llegar a establecer similitudes y/o diversidad entre la especie estudiada, presente en muestras de esputo de varios pacientes y de muestras obtenidas de tejidos de animales con tuberculosis (Singh et al., 2006). y de otras bacterias incluyendo *E. coli* (Chansiripornchai et al., 2001).

En localidades con baja incidencia de casos de tuberculosis pulmonar la utilización del ensayo RAPD demostró su utilidad, también lo hizo en poblaciones con una alta incidencia de *M. tuberculosis* (104 por 100,000 habitantes), en donde se esperaba que

no se encontraría una alta diversidad genética con marcadores tan generales, por la elevada transmisión del bacilo tuberculoso entre la población estudiada. Para su validación se comparó con el ensayo de MIRU, y los datos obtenidos con RAPD fue casi siempre de mayor variabilidad genética que con MIRU y sugieren que el ensayo RAPD permite detectar más mutaciones que la técnica MIRU que ha sido utilizada como una referencia conveniente desde que mostró su potencial para estudios de epidemiología molecular, específicamente en investigaciones de la estructura de *M. tuberculosis* (Mazars, 2001; Tazi, 2004).

Singh et al., (2006) observaron un alto grado de polimorfismo en 44 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el iniciador OPN-01. El dendograma mostró 4 grupos con estrecha relación genética entre ellos. Es importante señalar que encontraron grandes similitudes, que representan regiones conservadas del genoma, en diferentes aislados de esputo humano y de tejido de 2 animales (nodo linfático de bovino y de hígado de cerdo). El aislamiento en animales de *Mycobacterium tuberculosis* no es común y por su relación genética en dicho estudio los autores sugieren la posible transmisión de humanos a animales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo anualmente aparecen más de 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y aproximadamente unos 3 millones mueren por esta enfermedad, En México, la tuberculosis ocupa el lugar número 15 como causa de mortalidad y la tasa informada por el sistema de notificación semanal de enfermedades ha fluctuado entre 16 y 18 por 1000,000 habitantes durante el periodo 1990-1994, con una mortalidad de 7.3 por 1000,000 habitantes en 1990 y de 5.4 por 1000,000 habitantes en 1994.

En Michoacán se carece de estudios clínicos de las *micobacterias* que infectan a su población, a pesar de que anualmente son reportados más de 200 casos.

El Instituto Mexicano del Seguro Social en su Boletín Estadístico Anual de Mortalidad del 2000 (IMSS, 2000) consigna una tendencia a la baja en la mortalidad por tuberculosis pulmonar en el periodo de 1991 a 2000; sin embargo, la morbilidad atribuida a tuberculosis se ha incrementado según lo reportado por el Boletín Epidemiológico Anual. Este reporta un incremento en la tasa de incidencia de tuberculosis pulmonar para el estado de Michoacán del 11.29 por 100,000 derechohabientes en el año 2002 en el IMSS a nivel nacional y el IMSS Michoacán la tasa fue de 5.74 (IMSS, 2002), la Secretaría de Salud en Michoacán reportó que en el año 2002 se detectaron en todo Michoacán 298 nuevos casos de tuberculosis pulmonar; lo anterior se debe entre otros factores importantes, al igual que en otras regiones del país, al problema del VIH/SIDA, desnutrición, diabetes mellitus y la resistencia bacteriana a los fármacos. Nuestro Estado no escapa a esos problemas y es además un exportador importante a nivel nacional de mano de obra hacia los Estados Unidos de Norteamérica, siendo una fuente epidemiológica con mucha trascendencia para la transmisión del VIH/SIDA que puede asociarse a infección por micobacterias. Por lo que existe en nuestro estado una variedad de factores de riesgo para la infección por *M. tuberculosis* y es necesario identificar los casos, así como caracterizar el tipo de micobacteria para que a través de la correlación epidemiológica se establezca un programa efectivo en el control de la tuberculosis.

3. JUSTIFICACIÓN

La prueba de la tuberculina es muy inespecífica, ya que una prueba positiva indica que hubo una infección previa por alguna o algunas micobacterias del complejo de *M. tuberculosis*, pero no detecta cuál de todas y en países con alta prevalencia no demuestra la existencia de la enfermedad activa. Además, la reactividad aparece aproximadamente un mes después de la infección en el hombre, persistiendo durante muchos años y en ocasiones, durante toda la vida, por ello la frecuencia de personas reactivas entre la población aumenta acumulativamente con la edad. Aunado a esto, la capacidad de la piel para reaccionar puede desaparecer en edades avanzadas o debido a enfermedades agudas o graves, quizá a consecuencia de alteraciones circulatorias.

El diagnóstico de laboratorio a través de métodos tradicionales requieren aproximadamente de 4 a 6 semanas; este largo período de incubación, ocasiona que la enfermedad se complique y se agrave el cuadro clínico en espera de los resultados de laboratorio antes de dar una quimioterapia, ó con el afán de ir atacando la infección cuanto antes se corre el riesgo de implementar una terapia inapropiada, resultando en un incremento en la morbilidad, mortalidad y en la infectividad de la comunidad.

M. bovis pueden causar la tuberculosis pulmonar en humanos y es primordialmente un problema humano, ya que generalmente se tiende a subestimar la capacidad de esta especie para producir enfermedad o se da como un hecho que ha sido totalmente eliminada y por ende que ya no es posible que los seres humanos estén expuestos al agente. Otro factor importante es que muchos laboratorios de diagnóstico utilizan las pruebas serológicas y cutáneas que no pueden diferenciar estos organismos de *M. tuberculosis*, creando ineficiencias en los protocolos de control de la enfermedad puesto que no se detecta y/o no se ataca al microorganismo en los establos, o en los productos lácteos, de donde puede transmitirse fácilmente a la población rural. Utilizan además procedimientos que inhiben el crecimiento del bacilo bovino. Hay evidencias de que la infección por *M. bovis* puede persistir en la población de un país, incluso cuando la enfermedad ya ha sido erradicada de los animales domésticos productores de alimentos. Por otra parte, también se ha subestimado la presencia de la bacteria en la fauna silvestre, que puede ser una fuente de infección en animales de consumo

como el ganado. Además es muy factible que se reactiven las lesiones crónicas, con el avance de la edad o como resultado de la depresión del sistema inmunológico por el uso de medicamentos inmunosupresores o por la presencia de enfermedades que conduzcan a estados secundarios de inmunodeficiencia. La mayor amenaza por *M. bovis* para la salud humana continúa siendo la infección a través de animales para consumo especialmente en los países en desarrollo. En México se desconoce la magnitud del problema, ya que los esfuerzos que se hicieron en el pasado fueron aislados. Pocos veterinarios realizaban tuberculinizaciones, los animales positivos no se desechaban y el diagnóstico se limitaba a obtener muestras y teñirlas con la técnica de Ziehl Neelsen en busca de BAAR.

A través del análisis molecular, además de que se puede obtener un diagnóstico mucho más rápido (1 a 2 días), es posible determinar cuál *Mycobacterium* del complejo se encuentra en una muestra clínica. A pesar de los progresos epidemiológicos, sociológicos, quimioterapéuticos y operacionales se ha reducido la proporción de las defunciones y se han aliviado también los síntomas y la incapacitación de millones de personas al aumentar la cobertura de la población beneficiada. Sin embargo el panorama actual es muy desalentador por la aparición y diseminación de cepas multirresistentes a los fármacos antifímicos. Esto está provocando cambios fundamentales en la actitud hacia el problema y representa un reto difícil de resolver, aun para los países con mayores recursos destinados para la salud.

Actualmente, en México no se cuenta con programas adecuados para el control de la tuberculosis, además se carece de estudios epidemiológicos de tipificación genético-molecular. Existen pocos reportes en los que se evalúa la diversidad genética de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en México (García-García 2000a; Yang et al., 2001), lo cual dificulta un mejor entendimiento de los patrones de infección en la población mexicana. De ahí la importancia para realizar su identificación específica y la correlación epidemiológica en pro de contar con datos fidedignos del agente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Determinar las especies del Complejo *M. tuberculosis* y la diversidad genética de los aislados que se presentan en pacientes con manifestaciones clínicas de tuberculosis y reacción BAAR positiva, en la Ciudad de Morelia, Mich.

4.2. Objetivos específicos.

- Tipificar por técnicas genético-moleculares las especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas.
- Establecer la diversidad genético- molecular entre las cepas obtenidas.

5. ESTRATEGIA

Se obtuvieron muestras de esputo de pacientes con datos clínicos de tuberculosis, a estas muestras se les realizó BAAR y se cultivaron para obtener los aislados bacterianos. Tanto a las muestras de esputo como a los aislados bacterianos se les efectuó extracción de ADN genómico, posteriormente tipificación del CMTB mediante la amplificación por PCR de las secuencias de inserción (IS) y la determinación de variabilidad genética mediante Polimorfismos del ADN amplificado al azar (RAPD'S).

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Población de estudio y muestra

Se colectaron 46 muestras provenientes de pacientes del Estado de Michoacán que acudieron a la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica del Hospital General Regional N° 1 del IMSS y del Hospital General “Dr. Miguel Silva” durante 12 meses y cuya expectoración dio reacción BAAR positiva (bacilos ácido-alcohol resistentes), teñidos mediante la técnica de Ziehl-Neelsen.

6.2 Criterios de inclusión.

Se incluyeron muestras de pacientes con diagnóstico clínico o bacteriológico de tuberculosis de quienes se haya obtenido muestra bacteriológica para BAAR.

6.3 Criterios de exclusión

Muestras que se determine fueron manejadas de manera inadecuada, de acuerdo a los manuales de procedimientos.

6.4 Criterios de eliminación

Muestras que no estén identificadas o sin datos epidemiológicos del paciente.

6.5 Cepas de referencia

Las micobacterias de referencia que se usaron en este estudio se muestran en la Tabla 1

Tabla 1. Cepas bacterianas de referencia

ESPECIE	CEPA	REFERENCIA
<i>M. tuberculosis</i>	H37 Ra	ATCC 25177
<i>M. tuberculosis</i>	H37 Rv	ATCC 25618
<i>M. bovis</i>	BCG	ATCC 19015

6.6 Procesamiento de los Aislados Clínicos

Para obtener los aislados clínicos, las muestras de esputo se sembraron en medio de Lowestein-Jensen y fueron incubadas a 37 °C hasta la aparición de crecimiento bacteriano. Para esto se contó con el apoyo en cada una de las unidades hospitalarias, de personal capacitado para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en expectoración y tinción del BAAR. Las muestras de esputo tuvieron un procesamiento microbiológico de rutina en los laboratorios del IMSS y Hospital General para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes, tiñéndolas mediante la técnica de Ziehl-Neelsen de acuerdo al procedimiento estándar.

6.7 Extracción de ADN de alto peso molecular

6.7.1 Aislados clínicos y cepas de referencia

Se colocan 500 µl de suspensión de bacterias en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml al cual se agregó rápidamente 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl pH 8, 100mM; EDTA 20mM, NaCl 1.4M, SDS 2%). Se agitó en vórtex 5 minutos y se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo frío, agitando nuevamente 5 minutos en vórtex. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, se agregó el mismo volumen de isopropanol frío (-20° C) y se incubó 15 minutos a -20° C. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 250 µl de etanol 70% frío (v/v). Finalmente se permite que el exceso de humedad se evapore de la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en la menor cantidad posible de agua desionizada estéril (20 µl aproximadamente, dependiendo del tamaño de la pastilla). Para revisar la integridad del ADN obtenido se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en TAE 1X y se revisó bajo luz ultravioleta, de acuerdo a técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2000). El ADN aislado se almacenó a -20° C hasta su utilización.

6.7.2 De esputo

Se colocaron 400 µl de la muestra de esputo en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, del regulador de lisis adicionado con Xantogenato de potasio 50mM, a continuación se procedió como indica el punto 6.7.1

6.8 identificación del *Mycobacterium* presente

6.8.1 Iniciadores utilizados para la amplificación PCR.

Para identificar a *M. tuberculosis* presente en las muestras tanto clínicas como en las cepas de referencia se usaron 2 juegos de oligonucleótidos que delimitan el elemento de inserción de copias múltiples IS6110 y para identificar a *M. bovis* se usó un juego de oligonucleótidos reportado para la amplificación de un fragmento de ADN específico para *M. bovis* (Rodríguez et al., 1995). La secuencia de estos oligonucleótidos y la región que amplifican se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Iniciadores utilizados en las amplificaciones PCR

Clave	Región amplificada (tamaño)	Blanco	Secuencia	Referencia
HM1	IS6110	Complejo	5´CGTGAGGGCATCGAGGTGGC3´	Fidler et al.,
HM2	(245 pb)	<i>Mycobacterium tb</i>	5´GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3´	1993
SA1	IS6110	Complejo	5´CTGGCGGGTCGCTTCCACGA3´	Saboer et al.,
SA2	(375 pb)	<i>Mycobacterium tb</i>	5´TTCGACCGGCGGGACGTGCG3	1992
JB21	Fracción	<i>Mycobacterium</i>	5´-TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3´	Rodríguez et al.,
JB22	500 pb.	<i>bovis</i>	5´-CGTCCGCTGACCTCAAGAAC-3´	1995.
EUBAC				
16SR	16S	<i>Eubacterias</i>	5´-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-	
EUBAC			3´ 5´-GAG TTT GAT GGC TCA -3	
16SF				

6.8.2 Condiciones de amplificación de regiones específicas

El ADN blanco se amplificó usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2, siguiendo las siguientes condiciones. Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl

conteniendo 500 ng de ADN, regulador de reacción (10 mM de Tris-HCl, 2.5 mM de MgCl₂ y 50mM de KCl pH 8.3), 200 mM de cada deoxinucleosido trifosfato, 10 pmol de cada iniciador (Tabla 2) y 2.5 U de AmpliTaq DNA Polymerase (Invitrogene). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Perkin-Elmer, PCR System 2400) bajo las siguientes condiciones; un ciclo de 5 min a 95°C y 35 ciclos: 95°C por 1 min, 55°C por 30 seg y 72°C por 3 min. Finalmente se realizó una extensión a 72°C por 10 min. Se incluyeron controles negativos y positivos en todos los experimentos con ADN de cepas de referencia.

Para confirmar la amplificación, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en regulador TAE (Tris-acetato-EDTA) por 30 minutos a 80 voltios. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 0.5 mg/ml, fueron observados bajo la luz ultravioleta y fotografiados en un sistema de fotodocumentación (ChemiDoc de Bio-Rad).

6.9 Determinación de la variabilidad genética.

6.9.1 Ensayos de amplificación tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN).

Se preparó una mezcla de 25 µl con la siguiente composición: 5 µl de ADN (aproximadamente 25 ng), 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM de cada nucleótido (A, G, T, C), 0.7 µM de iniciador y 0.5 U de *Taq* ADN polimerasa recombinante y se desarrolló el siguiente programa de amplificación: 5 minutos a 94 °C, seguido por 40 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 36 °C y 2 minutos a 72 °C. Completados los 40 ciclos se realizó una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

TABLA 3. Iniciadores empleados en los ensayos RAPD.

Clave	Secuencia (5' → 3')	Referencia
Ecorapd 1252	GCGGAAATAG	1
Ecorapd 1254	CCGCAGCCAA	1
Ecorapd 1290	GTGGATGCGA	1

1. Tseng et al., 2001.

6.9.2 Análisis de Datos.

Para la determinación de los locus polimórficos, la diversidad genética media total (H_T), y el desequilibrio por ligamiento se usó el software PopGene ver 1.32 disponible en <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>, se calcularon todas las diversidades genéticas (corregidas y no corregidas), índices de distribución (evenness) y el índice de Shannon-Wiener (corregido y no corregido) con el paquete Genotype/Genodive ver 2.0 (Meirmans and Van Tienderen, 2004). Los grupos de linaje fueron obtenidos usando las bandas generadas en el ensayo RAPD y registradas como 0 cuando no hay banda y 1 cuando la banda esta presente. Estos resultados fueron usados para construir una matriz dicotómica, de la cual se generó un dendograma usando el software FreeTree (Hapl et al., 2001). Con este programa, las diferencias entre los resultados fueron calculadas utilizando los algoritmos Nei y Li, y fueron obtenidos grupos de linaje utilizando los criterios UPGMA. El análisis bootstrap fue realizado usando el mismo software con 1,000 réplicas. Para generar el dendograma se editaron los datos usando el programa de computo TreeView (Page 1996). El análisis principal de coordenadas se realizó con el programa GenAlEx ver 6.0 (Peakall y Smouse 2006).

7.- RESULTADOS.

7.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN de 46 aislados bacterianos (Fig. 1), y de 9 muestras de esputo (Fig. 2), obteniéndose en ambos casos buenos rendimientos y una buena calidad del ADN aislado, ya que se observó un material de alto peso molecular.

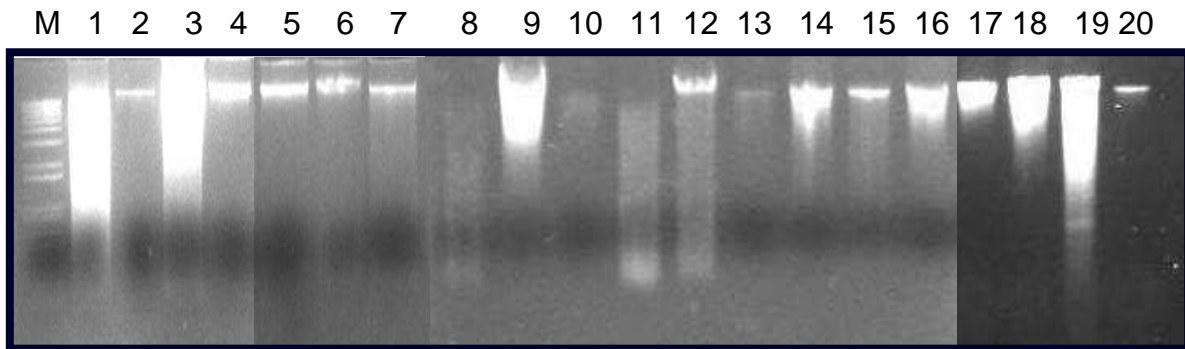


Figura. 1 ADN de aislados bacterianos. Gel de agarosa al 1% que muestra el ADN extraído de aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de esputo. Carriles: M: 1 Kb Plus DNA Ladder, 1-20, aislados bacterianos

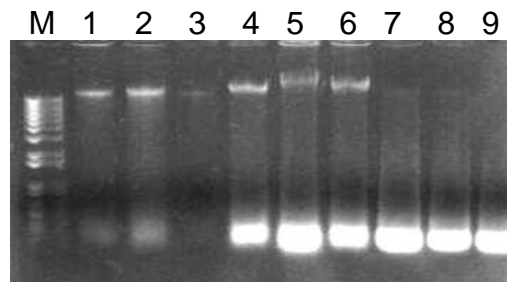


Figura. 2 ADN de esputo. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio que muestra el ADN total extraído de muestras de esputo. Carriles: M: 1 Kb Plus DNA Ladder, 1-9, muestras de esputo 1 a 9

Con la finalidad de comprobar que el ADN obtenido tenía la calidad necesaria para hacer ensayos de amplificación, se realizaron ensayos de PCR con las muestras clínicas utilizando iniciadores universales para el gen 16S de RNAr, para todos los aislados se obtuvo el fragmento esperado de aproximadamente 1,300 pb (Fig. 3)

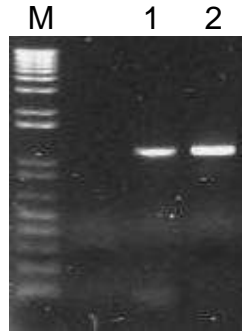


Figura. 3 PCR de ADN de aislado con iniciadores universales para bacterias. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra la amplificación de una región del gen 16S de RNAr de bacterias con iniciadores universales EUBAC 16S-R y EUBAC 16S-F. Carriles: M: 1 Kb Plus DNA Ladder 1) aislado 3, 2) aislado 10

7.2 Identificación de miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Una vez comprobado de que el ADN era de buena calidad y que sí se generaban productos de amplificación con los iniciadores universales, en un termociclador normal y uno rápido, se probaron dos juegos de iniciadores específicos para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, SA1 y SA2 y HM1 y HM2, para saber cuáles se podían usar con ADN de aislado y cuáles con ADN de esputo. Se obtuvo un fragmento de 375 pb con los iniciadores SA1 y SA2 y un fragmento de 245 pb con los iniciadores HM1 y HM2 con el ADN de aislado y solo se obtuvo amplificación con los iniciadores SA1 y SA2 con el ADN de esputo. Mostramos los productos del termociclador rápido (Fig. 4). Por lo tanto se decidió seguir trabajando solo con los iniciadores SA1 y SA2.

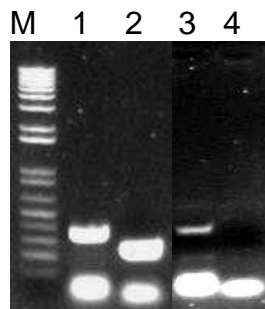


Figura. 4 PCR rápido de ADN de aislado y esputo con iniciadores específicos para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de obtenidos con ADN de: 1) cepa con iniciadores SA1 y SA2, 2) aislado con HM1 y HM2, 3) esputo con SA1 y SA2, 4) y 2) esputo con HM1 y HM2. Carril M: 1 Kb Plus DNA Ladder

Una vez probado lo anterior se realizó un ensayo de amplificación con los iniciadores SA1 y SA2 en las cepas de referencia (Fig. 5), muestras de expectoración (Fig. 6) y en las 46 muestras de aislados (Fig 7). Todas las muestras dieron el producto de amplificación esperado

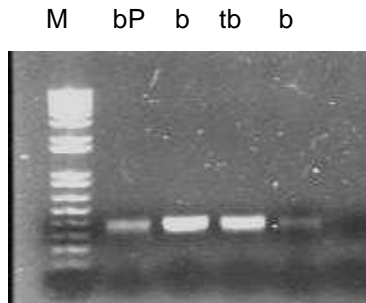


Figura. 5 PCR rápido de ADN de cepas de referencia con iniciadores SA1 y SA2. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de amplificación obtenidos con el ADN de cepas de referencia con los iniciadores SA1 y SA2. bP: *Mycobacterium bovis* Pasteur, b: *M. bovis*, tb: *M. tuberculosis*. CarrilM. M: 1 Kb Plus DNA Ladder

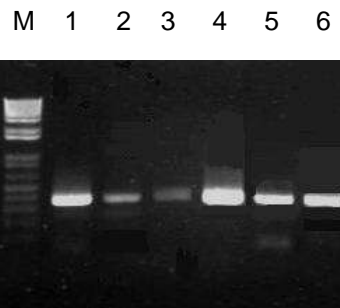


Figura. 6 PCR rápido de ADN de expectoración con iniciadores SA1 y SA2. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de amplificación obtenidos con el ADN de expectoración con los iniciadores SA1 y SA2. Carriles: M: 1 Kb Plus DNA Ladder, 1-6, expectoración 1 – 6

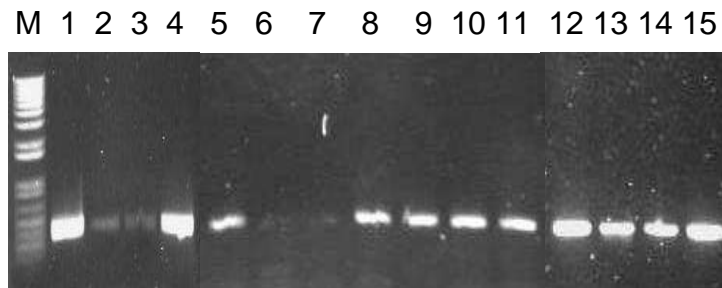


Figura. 7 PCR rápido de ADN de aislados con iniciadores SA1 y SA2. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de amplificación obtenidos con el ADN de aislados bacterianos con los iniciadores SA1 y SA2. Carriles: M: 1 Kb Plus DNA Ladder, 1-15, aislados 1 – 15

Para saber si *M. bovis* estaba presente en las muestras de aislado, se hicieron amplificaciones con los iniciadores JB21 y JB22, específicos para esta especie, solo la muestra 1 dio un fragmento del tamaño esperado (500 pb), lo que indica que se trata de *M. Bovis* (Fig. 8)

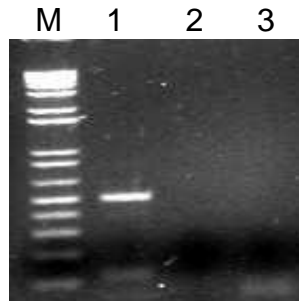


Figura. 8. Amplificación PCR con el ADN de aislados bacterianos con iniciadores específicos para *M. bovis*. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de amplificación de ADN de aislados bacterianos con los iniciadores JB21 y JB22. Carriles: M: 1 Kb Plus DNA Ladder, 1-3, amplificaciones con ADN de aislados 1 a 3.

El tiempo requerido para hacer la tipificación de un miembro del complejo *M. tuberculosis*, desde la toma de muestra (esputo), incluyendo la extracción del ADN y la amplificación PCR con iniciadores específicos fue de 6 horas.

7.3 Análisis de los polimorfismos de ADN amplificado al azar (RAPD)

Para determinar si los aislados identificados como *M. tuberculosis* presentaban polimorfismos genéticos, se realizaron ensayos RAPD utilizando los iniciadores Ecorapd 1252, Ecorapd 1254 y Ecorapd 1290. El ensayo con el primer 1252 produjo patrones de amplificación de 4 a 11 bandas con rangos de 480 a 3,460 pb (Fig. 9A). Con el iniciador 1254 se produjeron patrones de 3 a 7 bandas con rangos de 520 a 3,870 pb (Fig. 9B). Usando el iniciador 1290 de 2 a 7 bandas fueron generadas en todos los aislados, con tamaños de 535 a 4,300 pb (Fig. 9C).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46

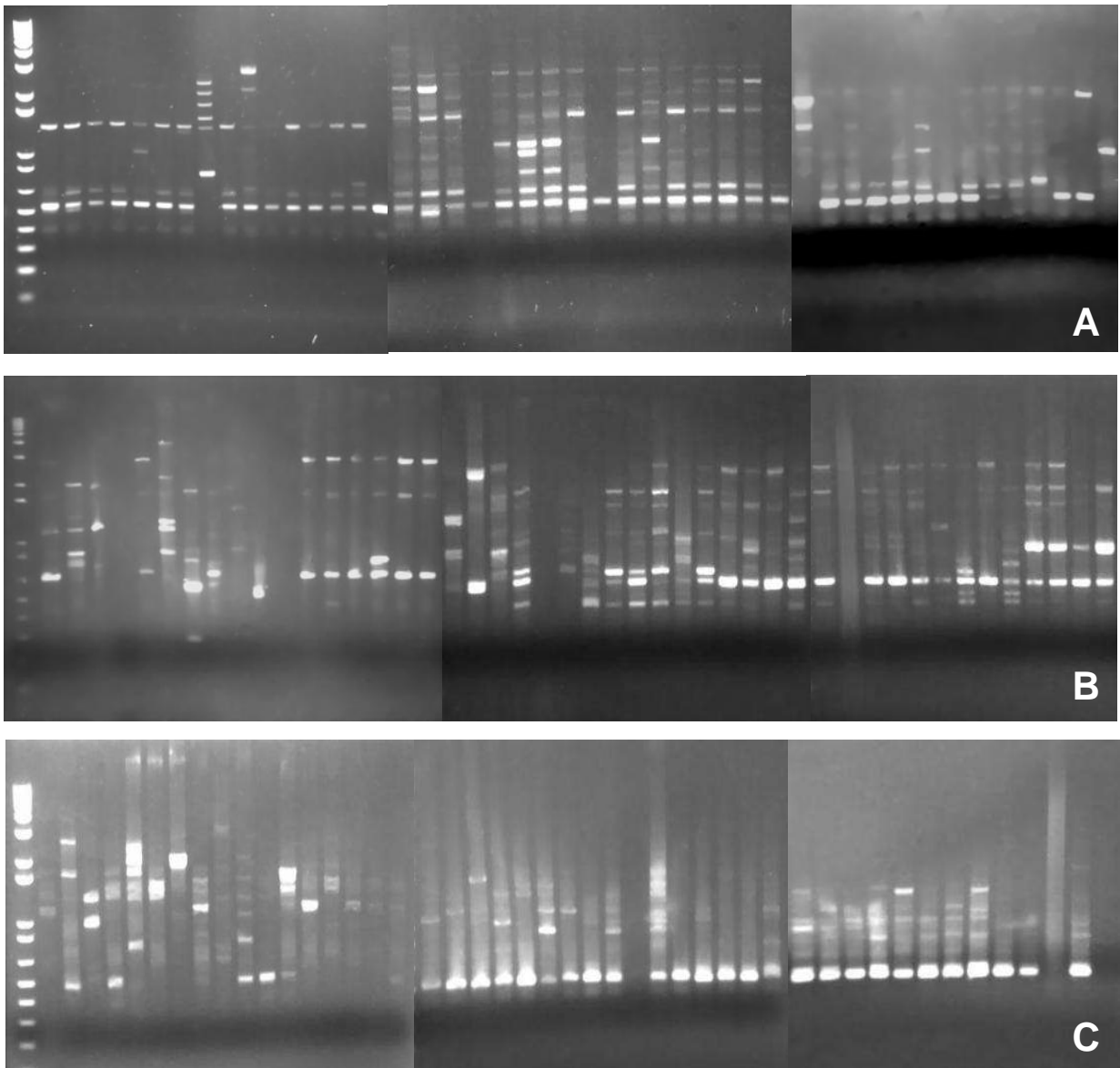


Figura 9. Ensayo RAPD de los aislados bacterianos. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra los patrones obtenidos utilizando los iniciadores A) Ecorapd 1252; B) Ecorapd 1254 y C) Ecorapd 1290. Carriles: M: 1 Kb Plus DNA Ladder; 1-46, aislados 1 al 46.

Los tres iniciadores empleados generaron un total de 34 locus todos los cuales fueron polimórficos, $P=100\%$ (Tabla 4). La diversidad media total H_T fue de 0.234, y el valor individual de h presentó un rango de 0.04 a 0.47. Los valores de diversidad genética corregida y sin corregir fueron de 0.98 y 0.96, respectivamente, con un índice de distribución (evenness) de 0.66 (Tabla 4). El índice corregido de Shannon-Wiener fue de 2.04. Todas las combinaciones posibles de alelos/locus mostraron desequilibrio de

ligamiento estadísticamente significativo, como se esperaba para una población clonal (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros de diversidad genética obtenidos mediante los datos RAPD.

Parámetro	Valor/rango
Locus Polimórficos (P)	100%
Diversidad genética media (H_T)	0.234
Rango de valores de diversidad genética (h) para locus individuales	0.04 (cinco loci)- 0.47 (un locus)
Número de combinaciones de alelos/locus con desequilibrio por ligamiento significativo (LD, $P < 0.050$)	224 (100%)
Diversidad Genética (div)	0.98
Diversidad Genética no corregida (diu)	0.96
Índice de distribución Eveness (eve):	0.66
Índice de Shannon-Wiener (shw):	1.50
Índice de Shannon-Wiener Corregido (shc)	2.04

P, H_T , h , y LD fueron determinados usando PopGene ver 1.2, los parámetros restantes se determinaron usando el programa Genotype/Genodive ver 2.0

Se construyó una matriz dicotómica usando los pesos de las bandas obtenidas con los tres iniciadores en el ensayo RAPD y con esta matriz se generó un patrón de agrupamiento (Fig. 10). Al realizar el dendograma empleando el criterio UPGMA el aislado 20 se separa del resto de aislados, los cuales forman cuatro clusters bien definidos. Dos de estos clusters se encuentran formados únicamente por dos aislados, el Cluster III por los aislados 28 y 8, y el Cluster IV por los aislados 11 y 32. El Cluster I se encuentra formado por 22 aislados y el Cluster II por 19. El aislado MVG01 tipificado como *M. bovis* aparece en el Cluster II.

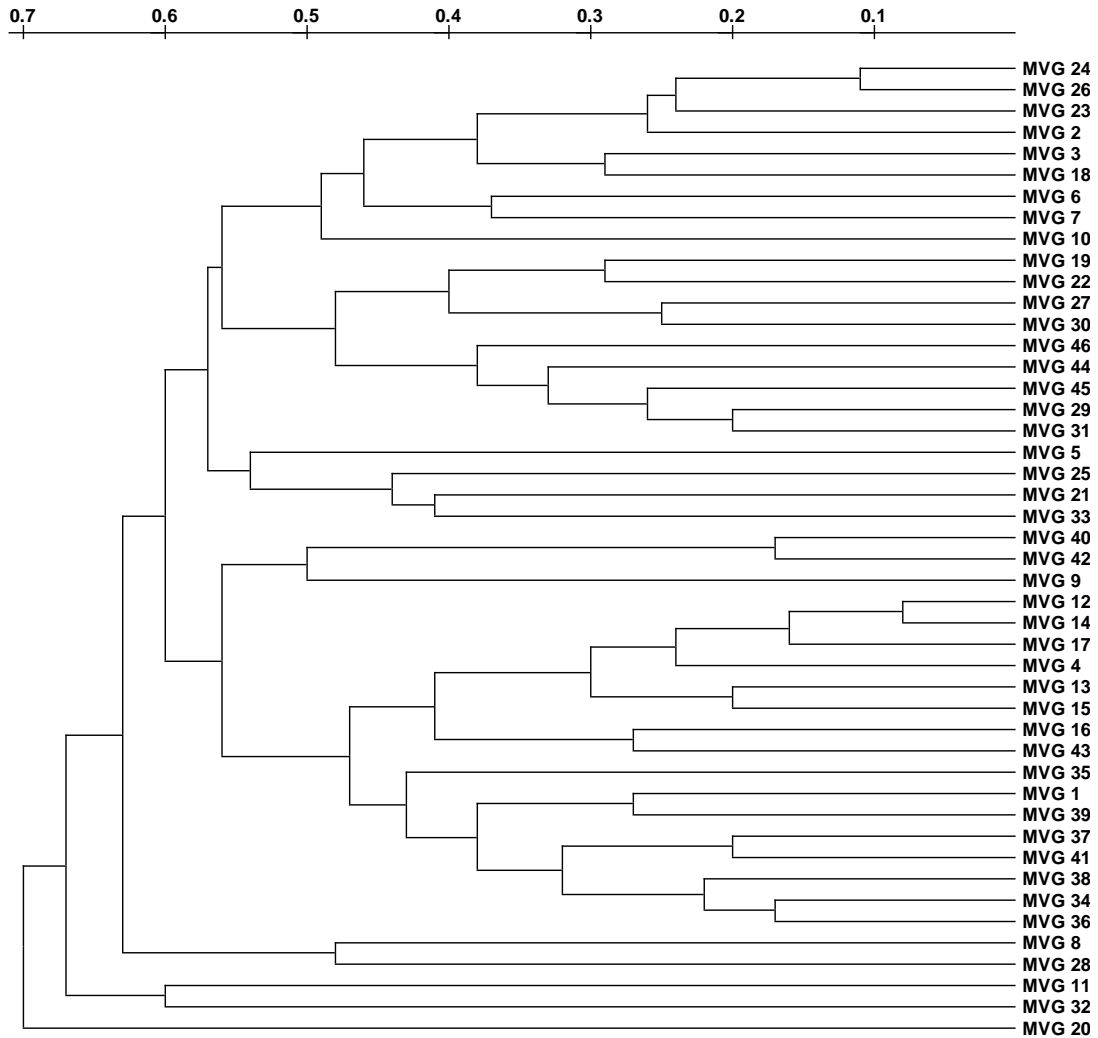


Figura 10. Dendrograma de *M. tuberculosis* spp

En el análisis de coordenadas principales realizado se generaron seis coordenadas principales (datos no mostrados) en el que las dos primeras coordenadas graficadas en la figura 11 explican el 47.2% de la variación entre los aislados y las tres primeras coordenadas explican el 64.5% de esta. El patrón de agrupamiento generado mediante el análisis de coordenadas principales presenta notables similitudes con el patrón generado mediante el criterio UPGMA. En este análisis se pueden observar cuatro grandes grupos acomodados en los cuatro cuadrantes generados por los ejes (Fig. 11). El grupo del cuadrante Q1 es el más heterogéneo en relación al agrupamiento UPGMA. Este cuadrante está constituido mayoritariamente por aislados que el criterio UPGMA agrupa en el Cluster I (Fig. 11) y tres aislados (16, 38 y 43) que se agrupan en

el Cluster II, además, aquí también se encuentra el aislado 32 del Cluster IV. En el cuadrante Q2 se encuentran principalmente aislados que mediante el criterio UPGMA se agrupan en el Cluster I, a excepción de los aislados 8 (Cluster III) y 20. El cuadrante Q3 también se encuentra conformado principalmente por aislados que el criterio UPGMA agrupa en el Cluster I, a excepción de los aislados 4 y 9, del Cluster II y el aislados 28 (Cluster III). Por último, el cuadrante Q4 muestra una correspondencia muy estrecha con el agrupamiento UPGMA, ya que a excepción del aislado 11 (Cluster IV) todos los aislados dentro de este se encuentran agrupados en el Cluster II mediante último criterio, incluido el aislado MVG01 tipificado como *M. bovis*.

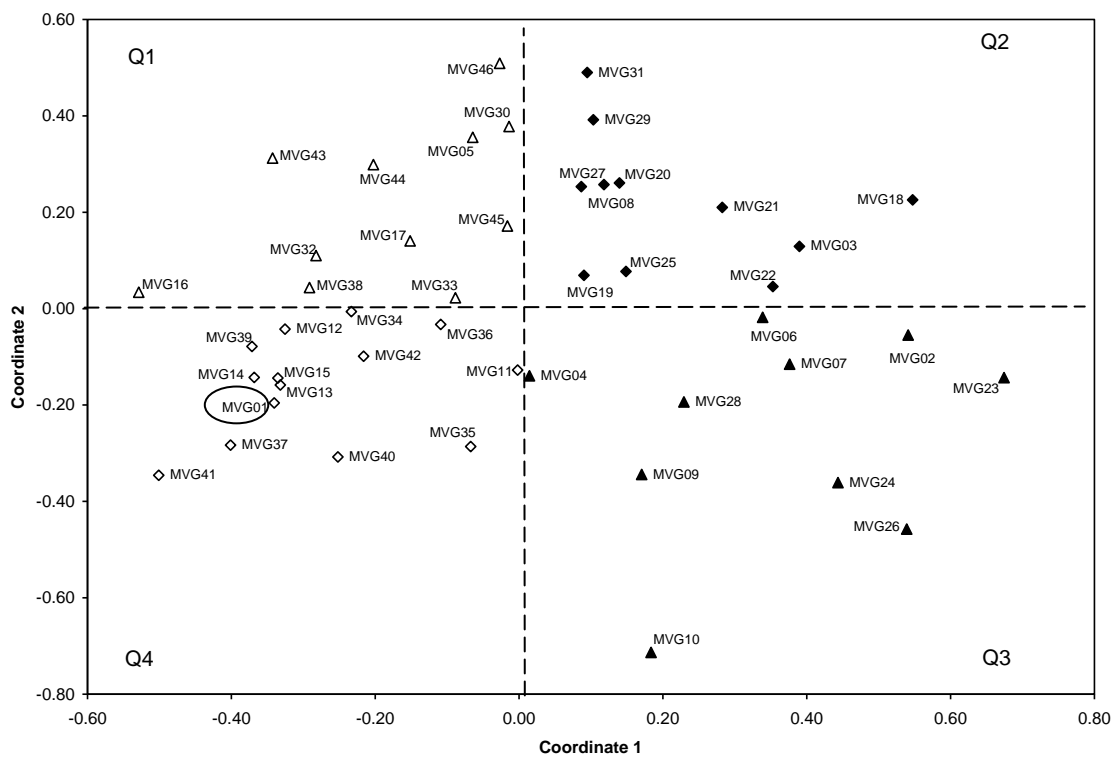


Figura 11. Análisis de coordenadas principales.

8. DISCUSIÓN

El diagnóstico de tuberculosis a partir del cultivo de las especies de *Mycobacterium* presentes en esputo, es un proceso difícil y tardado. Diversos estudios para la detección de bacterias patógenas a partir de muestras clínicas han mostrado que los métodos genético moleculares son los más convenientes, sin embargo, la ruptura de células y la presencia de inhibidores son dos problemas que se presentan frecuentemente en el aislamiento de ADN (Vázquez-Marrufo y col., 2002) sobre todo en muestras clínicas complejas como el esputo. En este trabajo se diseñó un protocolo barato y rápido que optimiza el rendimiento y pureza del ADN aislado a partir de muestras clínicas y con calidad para hacer amplificaciones PCR, encaminadas a la detección de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Se logró estandarizar el ensayo de tipificación con un termociclador rápido y se disminuyó el tiempo a 6 horas, desde la toma de muestra de esputo, incluyendo la extracción de ADN hasta la tipificación de la especie presente.

Dentro del territorio mexicano el único agente causal identificado como el responsable de la tuberculosis humana ha sido *M. tuberculosis* (García-García et al., 2000a, 2000b; Yang et al., 2001). De los 46 aislado analizados en el presente trabajo, el aislado MVG01 (2.1%) fue tipificado como *M. bovis* y el resto como *M. tuberculosis*. La tuberculosis provocada por *M. bovis* ha sido reportada en pacientes de origen mexicano que viven en Estados Unidos con porcentajes de 1 a 6.7% del total de casos estudiados (LoBue et al., 2003; CDCP 2005), siendo la población infantil especialmente susceptible. Estos casos han sido principalmente atribuidos al consumo de queso elaborado con leche contaminada (CDCP 2005) y *M. tuberculosis* ha sido aislada de quesos hechos en México (Harris 2007). Hasta donde sabemos, este es el primer aislado en el interior de México, lejos de la frontera con EU, en el que *M. bovis* es reportada en un caso de tuberculosis humana. El hecho de que en un número limitado de muestras se haya podido encontrar a *M. bovis*, indica que la tuberculosis zoonótica debe ser evaluada con mayor profundidad en el área de estudio y el resto del país y alerta sobre la importancia de revisar la calidad de la leche con la que se elaboran distintos productos lácteos.

En el presente estudio se evaluó la diversidad genética de los aislados de *M. tuberculosis* mediante el ensayo RAPD-PCR. Se ha documentado que en bacterias el uso de dos iniciadores para amplificación RAPD es suficiente para diferenciar entre individuos de una población clonal y que el uso de una mayor cantidad de iniciadores no incrementa de manera significativa el poder de diferenciación entre individuos (Hopkins and Hilton 2001). En el caso de *Staphylococcus aureus*, el uso de tres iniciadores en el ensayo RAPD permitió tasar sucesivamente la relación genética de aislados de diferentes hospederos (Reinoso et al. 2004). Así mismo, no obstante que en este trabajo se emplearon únicamente tres iniciadores RAPD, nuestros resultados son comparables con estudios en los que se han utilizado 8 (Korzekwa et al., 2006) o 10 iniciadores (Tazi et al., 2004). Los loci generados mediante el ensayo RAPD han mostrado ser altamente polimórficos en las poblaciones de *M. tuberculosis* ya que estudios previos han documentado un 100% de loci polimórficos generados mediante RAPD (Tazi et al., 2004; Korzekwa et al., 2006), este nivel de polimorfismo fue encontrado en el presente trabajo. El valor de la diversidad genética corregida fue de 0.98 que es mayor al reportado por Tazi et al., (2004), pero el valor no corregido de 0.96 cae dentro del rango de valores para distintas subpoblaciones analizadas por dichos autores, los cuales variaron entre 0.89 y 0.97. El valor de H_T de 0.23 obtenido en el presente estudio es menor al de 0.34 reportado para aislados provenientes de Polonia, en Europa (Korzekwa et al., 2006) y al del rango de 0.36-0.48 encontrado en subpoblaciones de Casablanca en Marruecos, África (Tazi et al., 2004). Aunque el rango de valores de h para locus individuales encontrado en el presente trabajo (0.04-0.47) es bastante semejante al reportado por Korzekwa et al., (2006) de 0.06-0.50. Es interesante que no obstante las variaciones en el número de individuos y poblaciones analizadas, así como las diferencias en el número de iniciadores empleados y en los métodos de análisis, nuestros resultados son, en lo general, similares a los reportados para otras poblaciones de *M. tuberculosis* que han sido analizadas mediante el ensayo RAPD.

El índice de Shannon-Wiener (también conocido como índice de Shannon y en algunos trabajos citado como índice de Shannon-Weaver) ha sido utilizado en el análisis de diversas comunidades microbianas de bacterias asociadas a la cavidad oral

y el tracto digestivo de humanos (Martin 2002). Dentro de una población, este es un índice de diversidad genotípica que combina richness (número de genotipos de la población) y evenness (la distribución de la población entre los distintos genotipos) (Arnaud-Haound et al., 2007). El valor de este índice es grande cuando cada individuo muestreado tiene un genotipo único. El índice de Shannon-Wiener es un parámetro que no ha sido determinado para otras poblaciones de *M. tuberculosis*, pero el valor de 2.04 obtenido en el presente trabajo para el índice corregido para poblaciones pequeñas es un valor similar al de 2.0 reportado para cepas de *E. coli* aisladas de heces de caballo y superior al de poblaciones provenientes de heces de vacas (0.67) y humanos (0.43) (Anderson et al., 2006). Aunque para *E. coli* de ambientes acuosos se ha reportado un índice de 5.39 (Byappanahalli et al., 2007). Para cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de humano y analizadas mediante RAPDs el valor reportado es de 0.56 y para cepas de heces de vaca de 0.36 (Reinoso et al., 2004).

Los índices de distribución (*evenness*) indican la distribución de los genotipos dentro de la población (Grünwald et al., 2003). Este parámetro tiene un valor de cero cuando la población tiene un solo genotipo y valor máximo de 1 cuando todos los genotipos encontrados se presentan con la misma frecuencia. El valor de evenness determinado para las cepas de *M. tuberculosis* aquí estudiadas indica que no todos los genotipos se presentan con la misma frecuencia, y que algunos genotipos son predominantes.

El desequilibrio de ligamiento ha sido documentado en *M. tuberculosis* empleando RAPDS (Tazi et al., 2004) y MIRU-VNTR loci (Supply et al., 2003; Tazi et al., 2004), sugiriendo una evolución clonal de dicha especie. Nuestros resultados de desequilibrio de ligamiento son congruentes con dichos antecedentes. No obstante, recientemente se ha documentado que en el genoma de *M. tuberculosis* puede haber “hot spots” en los cuales se realizan eventos de recombinación (Liu et al., 2006).

Nuestro dendograma muestra una mejor separación y definición de clusters que el generado para aislados de *M. tuberculosis* de la India (Singh et al., 2006) y un patrón de agrupamiento semejante al generado para aislados de Polonia (Korzekwa et al., 2006). Como en este último caso, en nuestro dendograma existen aislados (MVG20) que no se agrupan en ningún cluster, mostrando una composición genética única. También se

presenta el caso de los clusters III y IV, los cuales se encuentran formados por dos aislados y se observa que la gran mayoría de estos se agrupan en pocos clusters (I y II).

El análisis de coordenadas principales constituye otro método para evaluar las relaciones entre los aislados de *M. tuberculosis*. Esta herramienta del análisis multivariado ha sido empleada para evaluar de la diversidad genética en poblaciones bacterianas mediante el análisis de secuencias genéticas en *Staphylococcus aureus* (Jarraud et al., 2002), *Escherichia coli* (Chapman et al., 2006) y diversas especies del género *Streptococcus* (Täpp et al., 2003; Innings et al., 2005). En relación al análisis de coordenadas principales a datos derivados de un ensayo RAPD en poblaciones de bacterias patógenas de humano, este ha sido aplicado únicamente en el estudio de la diversidad en aislados de *S. aureus* (Reinoso et al., 2004). En el presente trabajo los 34 loci RAPD generados fueron reducidos a seis coordenadas principales y la diversidad fue evaluada graficando las dos primeras coordenadas. La distribución de los aislados de estudio mostró en general, congruencia con el patrón de agrupamiento generado mediante el criterio UPGMA. Estos resultados, muestran que el análisis de coordenadas principales constituye una herramienta adecuada para la evaluación de la diversidad genética en *M. tuberculosis*, la cual puede utilizarse en conjunto con los criterios de agrupamiento UPGMA y Neighbour-joining, comúnmente empleados en el análisis de diversidad genética intra e interpoblacional.

Se ha mencionado que una de las principales limitaciones del uso del ensayo RAPD son los problemas de reproducibilidad (Fritsch and Rieseberg 1996), ya que este puede ser afectado por la cantidad de cloruro de magnesio, la concentración de ADN y la relación iniciador: ADN, entre otros factores. En relación al uso del ensayo RAPD para el estudio de diversidad genética y la diferenciación entre aislados de *M. tuberculosis* las opiniones están divididas, hay autores que piensan que no representa ventajas útiles respecto a otros métodos de análisis, y hay otros que consideran que este tipo de análisis rivaliza con otras técnicas de análisis de diversidad genética (Tazi et al., 2002). Además de las ventajas de costo efectividad, es una técnica sencilla, por su rapidez y la baja cantidad de ADN necesario, la técnica RAPD posee otras características que le permiten seguir siendo una técnica útil para el análisis de

poblaciones locales de *M. tuberculosis*. Así, se ha documentado que los patrones de agrupamiento de aislados de *M. tuberculosis* generados mediante la técnica RAPD-PCR son congruentes con el agrupamiento generado mediante RFLP de la secuencia de inserción IS110, spoligotyping, el análisis de PCR-IS6110 (Rodríguez et al., 2000) y el SNPs (Tazi et al., 2002). También, dicha técnica permite la detección de más eventos de mutación que los datos MIRU-VNTR, ya que los patrones de amplificación generados son altamente polimórficos en *M. tuberculosis*, debido a que muestran la variabilidad sobre todo el genoma (Tazi et al., 2004). Además, en el análisis de diversidad genética de *M. tuberculosis*, el ensayo RAPD se ha combinado exitosamente con técnicas de análisis genómico con un gran poder discriminatorio como los microarreglos (Diaz et al., 2006).

Aunque nuestros resultados indican que los aislados estudiados representan una población clonal en la cual se presenta una considerable variación genética, estamos concientes que es indispensable realizar en el área de estudio un análisis sobre una población más amplia con un mayor número de aislados empleando otros marcadores moleculares como MIRU-VNTR y la spoligotipificación con la finalidad de tener una mejor descripción de la dinámica de infección y la estructura de la población local de *M. tuberculosis*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- American Thoracic Society. 2000. Diagnostic Standards and Classification Of Tuberculosis In Adults And Children Am. J. Respir. Crit. Care Med., Volume 161, Number 4, April 2000, 1376-1395
- Anderson, M.A., Whitlock, J.E., Harwood V.J. 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6914-6922.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C.M., Alberto, F., and Serrao, E.A. 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. Mol. Ecol. 16: 5115-5139.
- Ashok Rattan, Awdhesh Kalia, and Nishat Ahmad. 1998. Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives. Emerging Infectious Diseases. Vol.4 No. 2, 1-24.
- Barnes, P.F., Cave, M.D. 2003. Current Concepts: Molecular Epidemiology of Tuberculosis. New Eng. J. Med. 349:1149-1156.
- Bermann, J.S., Yuoh G., Fish G. and Woods G.L. 1999. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. Journal of Clinical Microbiology. 37: 1419-1425.
- Bowditch B.M., Albright D.G., Williams J.G., Braun M.J. 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. Methos Enzymol. 224: 294-309
- Bradi M., Ehrlich R., Wood R., Pulerwitz T., and Maartens G. 2001. Association between tuberculosis and HIV disease progression in a high tuberculosis prevalence area. Journals Tuberc lung Dis. 5(3): 225-32.
- Burgos, M. V., Pym, A.S. 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis. Eur. Respir. J. 20 (Suppl. 36): 54s-65s.
- Byappanahalli, M.N., Whitman, R.L., Shively, D.A., Ferguson, J., Ishii, S., Sadowsky, M.J. 2007. Population structure of *Cladophora*-borne *Escherichia coli* in nearshore water of Lake Michigan. Water Research 41: 3649-3654.
- Caetano-Anolles, G., Bassam B.J., and Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis. Plant Mol. Bio. Rep. 9:294-307
- Cavusoglu, C., Karatas E., and Soyler, I. 2007. Genotyping of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) analysis Mikrobiyol Bul, Jul 2007; 41(3): 385-93.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDCP). 2005. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*- New York City, 2001-2004. Morb Mortal Wkly Rep. 54: 605- 608.
- Chansiripornchai N; Ramasoota P; Sasipreeyajan J; Svenson S B. 2001. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Veterinary microbiology 80(1):75-83.

- Chapman, T.A., Wu, X.Y., Barchia, I., Bettelheim, K.A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., Chin, J.J.C. 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4782-4795.
- Cheng, X., Zhang J., Yang, L., Xu, X., Liu, J., Yu, W., Su, M., Hao, X. 2007. A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Microbiol. Methods.* 70:301–305.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, S.R.A., Huchzermeyer, H.F.A.K., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *M. bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 59–70.
- Cowan, L.S., Mosher, L., Diem, L., Massey, J.P., and Crawford, J.T. 2002. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium Tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 40:1592-1602.
- Dautle, M.P., Ulrich, R.L., and Hughes, T.A. 2002. Typing and Subtyping of 83 Clinical Isolates Purified from Surgically Implanted Silicone Feeding Tubes by Random Amplified Polymorphic DNA Amplification *J. Clin. Microbiol.*, 40: 414 - 421.
- Davis D. B., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S., Wood W. B. 1997. *Tratado de Microbiología* Editorial Salvat, p.868-895.
- De Baere, T., Claeys, G., Swinne D., Verschraegen, G., Muylaert, A., Massonet, C., and Vaneechoutte, M. 2002. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2). *BMC Microbiol*, Jul 2002; 2: 21. El estudio genético requiere de amplias bibliotecas
- Diaz, R., Siddiqi, N., Rubin, E.J. 2006. Detecting genetic variability among different *Mycobacterium tuberculosis* strains using DNA microarrays technology. *Tuberculosis.* 86: 314-318.
- Doki M, Boji I, Miki D, Mladenovi L, Begovi V, Kupresanin S, Mirovi V, and Dimitrijevi J. 2002. Multiorgan tuberculosis. *Journals*, 59 (3): 317-24.
- Esteban, J., Fernández-Roblas, R., Ortiz, A., and García-Cía, J. I. 2006. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae*: usefulness of randomly amplified polymorphic DNA analysis to assess the clonality of the isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 677-679.
- Falkinham, J.O. 1996 Epidemiology of infection by nontuberculous *Mycobacteria*. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:177-215.
- Fang Z., Morrison N., Watt B., Doig C., and Forbes K. J. 1998 IS6110 Transposition and Evolutionary Scenario of the Direct Repeat Locus in a Group of Closely Related *Mycobacterium tuberculosis* Strains *J Bacteriol.* ; 180(8): 2102–2109.
- Fidler HM et al. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* DNA in tissue affected by sarcoidosis. *British medical journal*, 306:546-9.
- Frieden, T.R., Fujiwara, P.I., Washko, R.M., and Hamburg, M.A. 1995. Tuberculosis in New York City — Turning the Tide. *N Engl J Med.* 333(4):229-233.

- Fritsch, P., and Reiseberg, L.H. 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. *In: Molecular genetic approaches in conservation. Edited by T.B. Smith and R.K. Wayne. Oxford University Press. pp. 54-73.*
- Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144:1189-1196
- García-García ML, Cifuentes-Osornio J, Jiménez-Corona ME, Ponce de León A, Jiménez Corona A, M Bobadilla del Valle, M Palacios Martínez, Canales G, Sanginés A, Jaramillo V, Martínez Gamboa A, Balandrano S, Valdespino Gómez JL, and Small P. 2001. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Orizaba, Veracruz. Implications for the tuberculosis prevention and control program. *Journals Invest Clinical* 53(4): 315-23.
- García-García, M., Palacios-Martínez, M., Ponce de León, A., Jiménez-Corona, M.E., Jiménez-Corona, A., Balandrano-Campos, S., Olivera-Díaz, H., Valdespino-Gómez. J.L., Small, P.M. 2000a. The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4: 12-17.
- García-García, M.L., Jiménez-Corona, M.E., Ponce de León, A., Jiménez-Corona, A., Palacios-Martínez, M., Balandrano-Campos, S., Ferreyra-Reyes, L., Juárez-Sandino, L., Sifuentes-Osornio, J., Olivera-Díaz, H., Valdespino-Gómez, .JL., Small, P.M. 2000b. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in southern Mexico. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4 (Suppl. 2): S168-S170.
- Gillman, L.M., Gunton, J., Turenne, C.Y., Wolfe, J., and Kabani, A.M. 2001. Identification of *Mycobacterium* Species by Multiple Fluorescence PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 3085-3091.
- Glawischnig, W., Steineck, T., and Spersger, J. 2006. Infections caused by *Mycobacterium avium*, subspecies *avium*, *hominissuis*, and *paratuberculosis* in free-ranging red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in Austria, 2001-2004. *J Wildl Dis.* 42: 724-731.
- Grange, J.M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2):71-7. Review.
- Grünwald, N.J., Goodwin, S.B., Milgroom, M.G., and Fry, W.E. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology.* 93(6): 738-746.
- Hapl, V., Pavlicek, A., Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting –based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 731-735.
- Harn, H.J., Shen, K.L., Ho, L.I., Yu, K.W., Liu, G.C., Yueh, K.C., Lee, J.H. 1997. Evidence of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei City, Taiwan. *J. Clin. Pathol.* 50: 505–508.
- Harris, N.B., Payeur, J., Bravo, D., Osorio, R., Stuber, T., Farrel, D., Paulson, D., Treviso, S., Mikolon, A., Rodriguez-Lainz, A., Cernek-Hoskins, S., Rast, R., Ginsberg, M., Kinde, H. 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating from Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1025-1028.

- Henneberger, R., Moissl, C., Amann, T., Rudolph, C., and Huber, R. 2006. New Insights into the Lifestyle of the Cold-Loving SM1 Euryarchaeon: Natural Growth as a Monospecies Biofilm in the Subsurface. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 192 - 199.
- Holland, M.S., Kennedy, F.A. and Holland, R.E. 2000 Companion animals as reservoirs of *eaeA+* *Escherichia coli*. *J Vet Diagn Invest.* 12: 78 – 80.
- Hopkins, K.L., and Hilton, A.C. 2001. Use of multiple primers in RAPD analysis of clonal organisms provides limited improvement in discrimination. *Biotechniques* 30: 1262-1264.
- Horsburgh C.J. 1996. Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin. Respir. Infect.* 11:244-251.
- Huys, G., Rigouts, L., Chemlal, K., Portaels, F., Swings, J. 2000. Evaluation of Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis for Inter- and Intraspecific Differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *M. ulcerans*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3675-3680
- IMSS 2000. Boletín Estadístico Anual de Mortalidad.:c43
- IMSS 2002. Boletín Epidemiológico Anual.:c10.
- IMSS 2003. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica.. III:13.
- Innings, A., Krabbe, M., Ullber, M., Herrmann, B. 2005. Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *rnpB* gene. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5983-5991.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and Immunity* 70: 631-641.
- Jhingan A. 1992 A novel technology for DNA isolation. *Methods Mol Cell Biol.* 1992;3:15–22.
- Korzekwa, K., Polok, K., and Zielinski, R. 2006. Application of DNA markers to estimate genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. 55(1): 19-24.
- Kremer, K., Van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P. W. M., Martín, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakrus, M.A., Musser, J.M. and Van Embden, J.D.A. 1999. 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.*, Aug 1999; 37: 2607 – 2618.
- Kremer, K., Arnold, C., Cataldi, A., Gutiérrez, M.C., Haas, W.H., Panaiotov, S., Skuce, R.A., Supply, P., van der Zanden, A.G.M., van Soolingen, D. 2005. Discriminatory Power and Reproducibility of Novel DNA Typing Methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *J. Clin. Microbiol.* 43:5628–5638.
- Krishnan, M.Y., Radhakrishnan, I., Joseph, B.V., Madhavi Latha, G.K., Ajay Kumar, R. and Mundayoor, S. 2007. Combined use of Amplified Fragment Length Polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, South India.. *BMC Infect Dis*, Jan; 7: 86.
- Legrand, E., Filliol, I., Sola, C. and Rastogi, N. 2001. MYCOBACTERIOLOGY AND AEROBIC ACTINOMYCETES: Use of Spoligotyping To Study the Evolution of the Direct Repeat Locus by IS6110 Transposition in *Mycobacterium tuberculosis*.. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1595 - 1599.

- Linton, C.J., Jalal, H., Leeming, J.P., Millar, M.R. 1994. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2169-2174.
- Liu, X., Gutacker, M.M., Musser, J.M., and Fu, Y.X. 2006. Evidence for recombination in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 188: 8169-8177.
- LoBue, P.A., Betacourt, W., Peter, C., and Moser, K. S. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7: 180-185.
- Martin, A.P. 2002. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (8): 3673-3682.
- Martin, K.J., and Rygielwicz, P. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Biol.* 5:28, doi:10.1186/1471-2180-5-28.
- Mathema, B., Kurepina, N.E., Bifani, P.J., and Kreiswirth, B. N. 2006. Molecular epidemiology of Tuberculosis: current insights. *Clin. Microb Rev.* 19(4): 658-685.
- Matsiota-Bernard, P., Zinzendorf, N., Onody, C., and Guenounou, M. 2000. Comparison of clarithromycin-sensitive and clarithromycin-resistant *Mycobacterium avium* strains isolated from AIDS patients during therapy regimens including clarithromycin. *J. Infect.* 40: 49-54.
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A. L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C. & Supply, P. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1901–1906.
- Meirmans, P.G., and Van Tienderen, P.H. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes.* 4: 792-794.
- Mijs W., de Haas P., Rossau R., Van Der Laan T., Rigouts L., Portaels F., and van Soolingen D. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and "*M. avium* subsp. *hominissuis*" for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(5):1505-1518.
- Milian- Suazo, F., Salman, M.D., Black, W.C. 4th, Triantis, J.M., Ramirez, C., Payeur, J.B., Torres, M.C. 2000. Molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Mexico. *American Journal of Veterinary Research.* 61: 90-95.
- Mokaddas, E. and Ahmad, S. 2007. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from non-tuberculous mycobacteria. *Jpn J Infect Dis*, May 2007; 60(2-3): 140-144.
- Mostowy, S., and Behr, M.A. 2005. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in Chest Medicine.* 26: 207-216.
- Mostrom, P., Gordon, M., Sola, C., Ridell, M., Rastogi, N. 2002. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 694-704
- Mustafa A.S., Aba A.T.I and Chugh T.D. 1999. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria by multiplex polymerase chain reactions. *Infection and immunity.* Vol. 1; 1; 61-70.

- Neill, S.D., RA Skuce, R.A. and Pollock, J.M. Tuberculosis--new light from an old window. 2005. *J. Appl Microbiol*, 98(6): 1261-9.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Peakall, R., and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes.* 6: 288-295.
- Piersimoni, C., Callegaro, A., Scarparo, C., Penati, V., Nista, D., Bomigia, S., Lacchini, C., Scagnelli, M., Santini, G. and De Sio, G. 1998. Comparative evaluation of the new Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* Direct test and the semiautomated AbboTT LCX *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 36: 3601-3604.
- Rattan, A. Kalia, A. and Ahmad, N. 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerging Infectious Diseases.* Vol.4 No. 2, 1-24.
- Ramasoota, P., Pitaksajakul, P., Phatihattakorn, W., Pransujarit, V., Boonyasopun, J. 2006. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Thailand and its evolutionary implication. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 37 : 136-147.
- Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., DiRenzo, M., Calzolari, A., and Bogni, C. 2004. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiol. Res.* 159: 245-255.
- Richner, S.M., Meiring, J., and Kirby, R. 1997. A study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in the eastern province of South Africa using random amplified polymorphic DNA profiling. *Electrophoresis.* 18(9): 1570-6.
- Rimek D, Tyagi S, and Kappe R, 2002. Performance of an IS6110-Based PCR Assay and the COBAS AMPLICOR MTB PCR System for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA in Human Lymph Node Samples. *J Clin Microbiol.* 40(8): 3089–3092.
- Rodríguez, J.G., Mejía, G.A., del Portillo, P., Patarroyo, M.E., and Murillo, L.A. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology.* 141: 2131-2138.
- Rodríguez, J.C., Royo, G., and Rodríguez-Valera, F. 2000. Application of four molecular techniques for typing outbreak-associated *Mycobacterium tuberculosis* strains. *APMIS.* 108: 231-236.
- Sabor, S.A., Johnson, N.M., McFadden, J. 1992. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet.* 339:1012-5.
- Sambrook, J. and Russell, D. 2000. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Seng R, Gustafson P, Gomes VF, Vieira CS, Rabna P, Larsen O, Larouzé B, Norberg R, Lisse IN, and Samb B. 2002 Community study of the relative impact of *HIV-1* and *HIV-2* on intrathoracic tuberculosis. *Journals AIDS;* 16(7): 1059-66.
- Singh, J.P.N., Verma, R., and Chaudhuri, P. 2006. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains in India. *J. Vet. Sci.* 7: 181-187.

- Scott, A.N., Menzies, D., Tannenbaum, T.N., Thibert, L., Kozak, R., Joseph, L., Schwartzman, K., and Behr, M.A. 2005. Sensitivities and Specificities of Spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing Methods for Studying Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 89 - 94.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol. Rev.* 16 (3):463-496.
- Smith, J.S. 2002. Childhood tuberculosis: out of control?. *Journals curr Opin Pulm Med.* 8 (3):178-82.
- Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Locht, C., Supply, P., and Rastogi, N. 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics.. *Infect Genet Evol.* 3(2): 125-33.
- Sun, Y.J., Lee, A.S.G., Ta Ng, S., Ravindran, S., Kremer, K., Bellamy, R., Wong, S.Y., Van Soolingen, D., Supply, P., and Paton, N.I. 2004. MYCOBACTERIOLOGY AND AEROBIC ACTINOMYCETES: Characterization of Ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by Multiple Genetic Markers and Proposal of Genotyping Strategy. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 5058 - 5064.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology.* 36:762–771. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Van Soolingen, D., and Locht, C. 2001. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3563 - 3571.
- Supply, P., Warren, R.M., Lesjean, S., van Der Spuy, G.D., Lewis, L.A., Tibayrenc, M., van Helden P.D., and Locht, C. 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol. Microbiol.* 47: 529–538.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, Van Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4498–4510.
- Täpp, J., Tholleson, M., and Hermann, B. 2003. Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene, *rnpB*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1861-1871.
- Tazi, L., Kreiswirth, B., Carriere, C., and Tibayrenc, M. 2002. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and its relevance to the surveillance and control of TB: an e-debate. *Infection, Genetics and Evolution.* 2: 153-158.
- Tazi, L., El Baghdadi, J., Lesjean, S., Locht, C., Supply, P., Tibayrenc, M., Banuls, A.L. 2004. Genetic Diversity and Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, a Moroccan City with high incidence of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 461-466.

- Thoen, C.O. and LoBue, P.A. 2007. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: forgotten, but not gone. *Lancet*. 369 (9569): 1236-1238.
- Tillet, D. y Neilan, B.A., 2000. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *J. Phycol.* 36, 251-258
- Tiruvilumala, P., and Reichman, L. B. 2002. Tuberculosis. *Annual Review of Public Health*. 23: 403-426.
- Tiwari, T.S., Ray, B., Jost, K.C. Jr, Rathod, M.K., Zhang, Y., Brown-Elliot, B.A., Hendricks, K., and Wallace, R.J. Jr. 2003. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. *Clin. Infect. Dis.* 36: 954-962.
- Tseng, C., E. Ting, D. Johnson, M. Saluta, y R. Dunst. 2001. Use of RAPD fingerprinting for differentiating *E. coli* isolates from human and animal sources. *Life Sci. News* 7:10-11.
- Van Soolingen, D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Int. Med.* 249: 1-26.
- Vázquez-Marrufo, G., Vazquez Garcidueñas, M.S., Olalde- Portugal, V. 2002. DNA isolation from forest soil suitable for PCR assay of fungal and plant rRNA genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 379-390.
- Vrioni, G., Levidiotou, S., Matsiota-Bernard, P., and Marinis, E. 2004. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates presenting various drug susceptibility from Greece using three DNA typing methods. *J. Infect.* 48: 253-262.
- Wada, M. 2001. Effectiveness and problems of PZA-containing 6-month regimen for the treatment of new pulmonary tuberculosis patients. *Journals.* 76: 33-43.
- Wada, T., Maeda, S., Hase, A. and Kobayashi, K. 2007 Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J. Med. Microbiol.* 56: 1052 – 1057.
- Wang, S.X., and Tay L.. 1999. Evaluation of three nucleic acid amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: 1932-1934.
- Wayne, L.G., and Sramek, H.A. 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:1-25.
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- World Health Organization Report 1993. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing.
- World Health Organization Report 2004. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO/HTM/TB/2004.331
- World Health Organization Report 2005. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.. Geneva, World Health Organization. WHO/HTM/TB/2005.349.

- World Health Organization . 2007.Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. WHO Report 2007. Geneva:WHO:191-192.
- Yang, Z.H., Rendon, A., Flores, A., Ijaz, K., Llaca, J., Eisenach, K.D., Bates, J.H, Villareal, A., Cave, M.D. 2001. A clinical-based molecular epidemiology study of tuberculosis in Monterrey, Mexico. Int. J. Tuberc Lung Dis. 5: 313-320.
- Zhang, Q., Kennon, R., Koza, M.A., Hulten, K., and Clarridge III, J.E. 2002. Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis. J. Clin. Microbiol. 40: 1134-1139.