

# MARCADORES GENÉTICOS EN LA CARACTERIZACIÓN MICOBACTERIANA

## GENETIC MARKERS IN THE MYCOBACTERIAL CHARACTERIZATION

Perla Mónica Martínez-Cruz,<sup>1,2</sup> Romalda Vásquez-Gutiérrez,<sup>1</sup>  
María del Pilar Gabriel-De la Torre<sup>1</sup> Lucía Martínez-Martínez<sup>1\*</sup>

Fecha de recepción: 01 de diciembre de 2016  
Fecha de aceptación: 17 de octubre de 2017

**Resumen** - Los métodos alternativos de identificación provienen del desarrollo de técnicas moleculares basadas en la identificación y análisis de los ácidos nucleicos. Estos métodos han dado un gran impulso a la investigación epidemiológica de la tuberculosis humana, al proporcionar herramientas que permiten identificar, comparar y trazar los patrones genómicos de cepas obtenidas en distintas poblaciones. La presente revisión tiene como objetivo dar un panorama de las posibilidades que hay en materia de diagnóstico e identificación de organismos altamente patógenos, como son las micobacterias, permitiendo de esta manera una mayor rapidez en el establecimiento del tratamiento para disminuir los índices de mortalidad por TB. El presente trabajo se desarrolló a través de compilar información bibliográfica relacionada con el tema, permitiendo correlacionar el resultado de varios autores expertos en la materia.

**Abstract** - The alternative methods of taxonomic identification come from the development of molecular techniques based on the identification and analysis of nucleic acids. These methods have given a great impulse to the epidemiological investigation of human tuberculosis by providing tools that allow identifying, to compare and obtain the genomic pattern of strains from different populations. The aim of the present review is to provide an overview of the possibilities for diagnosis and identification of highly pathogenic organisms, such as mycobacteria, thus allowing faster treatment establishment to reduce mortality rates by TB. The present work was developed through the compilation of bibliographical information related to the subject, allowing correlating the information of several expert authors.

▼  
**Palabras clave:**

Micobacteria, marcador genético, hsp65, rpoB, 16S rRNA.

▼  
**Keywords:**

Mycobacteria, genetic marker, hsp65, rpoB, 16S rRNA.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación, Facultad de Medicina UNAM-UABJO.

<sup>2</sup> División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Oaxaca.

Correo electrónico: lumartin1969@hotmail.com

## Introducción

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la tuberculosis (TB) como una enfermedad reemergente. De acuerdo con datos de la misma organización, la tercera parte de la población mundial se encuentra afectada por este padecimiento. En 2015 se registraron 10.4 millones de casos nuevos, de los cuales 5.9 (56%) son hombres, 3.5 (34%) mujeres y 1.0 (10%) niños; 1.2 (11%) millones del total de dichas incidencias corresponden a personas con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Los países con mayor presencia de TB se localizan en los continentes africano y asiático; en lo que respecta al americano, Brasil es donde se presenta un mayor registro. México pertenece al grupo de países con menor incidencia: 0-24.9 casos por cada 100 000 habitantes (OMS, 2016). En nuestra nación, la TB está ubicada en el número 17 entre las causas de muerte y el primero como causa de muerte por un solo agente infeccioso (Morán Aceves, Peña, Gallegos, Flores M., Montoya, Figueroa, Villa y Sánchez, 2000).

El microorganismo causante de la TB es un bacilo Gram positivo, perteneciente al orden *Actinomycetales*, de la familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium*. Aunque, en general, se hace referencia a *Mycobacterium tuberculosis* como el agente etiológico de TB, a la fecha se han descrito nueve especies de este género con la capacidad de infectar al humano, a las que en conjunto se les denomina Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), a éste pertenecen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* y *M. orygis* (Huard, Lazzarini, Butler, Van Soolingen y Ho, 2003).

La vía de diseminación de estos microorganismos es directa, ya que emplean como medio de transporte las gotitas de Pflüger expelidas durante el estornudo o tos del portador. El conducto de entrada es el aparato respiratorio, incubándose -en primer lugar- a nivel pulmonar pudiendo diseminarse y establecerse, posteriormente, en otros órganos, incluyendo el sistema nervioso central. Este mecanismo de infección

se relaciona directamente con el hecho de que entre 80 y 85% de casos de TB sean de tipo pulmonar; otros tipos que se han descrito son meníngea, intestinal, renal, ósea, ganglionar o cutánea (Romero Cabello, 2007).

Es importante mencionar que existen infecciones llamadas micobacteriosis, causadas por micobacterias no tuberculosas, las cuales pueden actuar como patógenos bajo ciertas condiciones (Sauret y Hernández-Flix, 1990), cuya incidencia ha ido en aumento progresivo en pacientes inmunocomprometidos por causas diversas, como desnutrición y, en particular, en aquellos infectados con HIV (Mederos, Rodríguez, Blanco, et al., 2003).

## Técnicas de diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones micobacterianas se basa en la observación al microscopio de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) con tinción de Ziehl-Neelsen y el aislamiento por cultivo, seguido de identificación bioquímica. La sensibilidad de la baciloscopía varía entre 30 y 80%, depende tanto del aislamiento en cultivo como de los métodos de recuperación utilizados y de la población evaluada (Sommers y McClatchy, 1983); en general, se considera que la baciloscopía tiene un límite de detección del orden de 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> microorganismos por mililitro de muestra (Kent y Kubica, 1985). Por otra parte, debido al prolongado tiempo de replicación de las micobacterias, las técnicas de aislamiento basadas en el cultivo requieren de tres a ocho semanas y su sensibilidad (70-90%) es baja cuando se analizan muestras biológicas que contienen un número pequeño de microorganismos (Eisenach, Cave y Crawford, 1993).

La microscopía directa no permite distinguir entre *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y las micobacterias no tuberculosas (MNT), la mayoría de las cuales son resistentes a antifímicos (American Thoracic Society, 1990). La identificación de especies por cultivo requiere, aun empleando métodos radiométricos, de tres a cuatro semanas para obtener el resultado (American Thoracic Society, 2000); identificarlas es

especialmente importante en aquellas regiones en donde la prevalencia de infección por MNT es elevada, como en el noroeste de México (Morán *et al.*, 2000), ya que en enfermedades ocasionadas por ellas se requiere de tratamientos diferentes, por lo tanto, es de suma importancia iniciar un tratamiento específico en forma oportuna y rápida.

Las limitaciones de los métodos tradicionales de laboratorio para la detección e identificación de micobacterias han obligado a implementar nuevas estrategias para disminuir el tiempo necesario para examinar las muestras remitidas al laboratorio clínico.

Las pruebas rápidas y directas que detectan ácidos nucleicos resultan atractivas para el diagnóstico de la TB en laboratorio (Eisenach *et al.*, 1993). Se han utilizado sondas de ácidos nucleicos para localizar micobacterias en cultivo, pero carecen de sensibilidad cuando se utilizan en la detección directa en muestras biológicas (Lebrun, Espinasse, Poveda, Levy-Frebault, 1992), dependiendo del método de extracción del material genético y el tipo de muestra.

Actualmente, las técnicas moleculares permiten reconocer micobacterias a nivel de especie en aquellas muestras donde los métodos de cultivo y otros procesos convencionales de detección son negativos. Se está haciendo extensivo el uso de procedimientos de amplificación de genes, tanto para la identificación del bacilo tuberculoso a partir de cultivos y muestras clínicas, como para la detección molecular de resistencia a drogas. Así, se tiene la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con gran sensibilidad, que en condiciones óptimas puede detectar de 1 a 10 microorganismos. Con los métodos disponibles de extracción de DNA es posible ahora identificar micobacterias a partir de cualquier muestra biológica (Barrón, Monteghirfo y Rivera, 2006).

La PCR es una técnica de Biología molecular que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de DNA, localizada por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La técnica puede realizarse en tan sólo 24 a 48

horas (Altamirano, Kelly, Wong, Bessuille, Black y Smith, 1992) y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de DNA micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de TB y con resultados negativos en la tinción de Ziehl-Neelsen o el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas y en enfermos con cuadros atípicos asociados con la infección por el HIV o con la inmunosupresión por trasplante (Popper, Winter y Höfler, 1994; Saboor, Johnson y McFadden, 1992). La amplificación de secuencias específicas de DNA micobacteriano mediante PCR se ha realizado a partir de cultivos y directamente de muestras biológicas (Cormican, Barry, Gannon, Flynn, 1992; Nolte, Metchock, McGowan, Edwards, Okwumabua, Thurmond, Plikaytis y Shinnick, 1993).

### **Genoma de *Mycobacterium tuberculosis***

Anteriormente se consideró que el genoma de Mtb era estable y carecía de polimorfismos. Estudios realizados a mediados de la década de 1990 mostraron el descubrimiento de sitios monomórficos y polimórficos en el genoma de la bacteria, que se puede dividir posiblemente en tres grupos, llamados polimorfismo de nucleótido sencillo (del inglés SNPs), polimorfismo de secuencia extensa (LSPs) y polimorfismo de secuencias repetitivas. Cuando este último fue sometido a una caracterización posterior, se revelaron dos clases de DNA: 1) Elementos de DNA transponibles o repeticiones dispersas, tales como secuencias de inserción (IS) y 2) Repeticiones cortas en tándem; éstas se clasifican, a su vez, en repeticiones polimórficas en tándem (MPTR), las cuales son básicamente múltiples repeticiones de 10 pares de bases (pb) que se separan por unidades intercaladas de 5 pb y se encuentran en diferentes posiciones en el genoma de Mtb, y repeticiones cortas en tándem (STR), conteniendo 49 repeticiones de 36 pb cada una, separadas por secuencias cortas de DNA de 41 pb, llamado DNA espaciador (Desikan y Narayanan, 2015).



En 1998, Cole *et al.* publicaron la secuencia completa del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, conformado por alrededor de 4.5 millones de pares de bases, rico en G-C (65.6%), y en el que abunda el DNA repetitivo, particularmente en secuencias de inserción, nuevas familias multigénicas y genes housekeeping duplicados. Muchas de las secuencias de inserción se localizan en regiones intergénicas o no codificantes (Cole *et al.*, 1998). Este conocimiento permitió su comparación con las secuencias correspondientes al resto de las especies del CMTB, concluyendo que existe una elevada homología entre ellos, independientemente de sus características bioquímicas o fenotípicas (Huard *et al.*, 2003). La homología de los genomas de las especies del CMTB permite el uso de ciertas regiones como marcadores genéticos en la identificación molecular en un probable caso de TB.

## Marcadores genéticos

### IS6110

La técnica de PCR IS6110 es la que presenta mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Mtb*. El IS6110 es un elemento genético de inserción que genéricamente se denomina IS, del inglés *insertion sequence*; éste representa secuencias de DNA

dispersas en los genomas bacterianos con actividad de transposición. La secuencia IS6110 sólo es detectable en genomas bacterianos del complejo *Mtb* y tiene la estabilidad necesaria para ser utilizada como herramienta de diagnóstico (Barrón *et al.*, 2006).

El IS6110 -descrito por primera vez por Thierry, Cave, Eisenach, Crawford, Bates, Gicquel y Guesdon- es un elemento de inserción micobacteriano que se ha utilizado sistemáticamente como marcador genético para la tipificación de especies de *Mtb* (Thierry *et al.*, 1990), originalmente descubierto en especies de *Escherichia coli* y *Shigella* (Desikan y Narayanan, 2015).

Las secuencias de inserción son secuencias repetidas útiles en la evolución genética de los microorganismos (Nghiem, Nguyen, Nguyen, Bich y Nong, 2015). El análisis del genoma de *Mtb* generó el hallazgo de 16 copias de la IS6110, seis copias correspondientes a IS1081, así como 32 secuencias de inserción distintas, algunas de las cuales pertenecen a las familias IS3 e IS256 (Cole *et al.*, 1998). El IS6110 es un fragmento de 1355 pb que se encuentra inserto en un arreglo de 36 pb, denominado regiones repetidas directas (DR) (Roychowdhury, Mandal y Bhattacharya, 2015).

Las secuencias de inserción son elementos inestables en el genoma de *Mycobacterium*, lo que queda demostrado por el número variable de copias

encontrado en las distintas cepas del microorganismo. Lo anterior ha llevado a proponer la clasificación de las cepas de *Mtb* como de "alto número de copias" cuando presentan más de siete de estas secuencias repetidas y de "bajo número de copias" al presentar una cantidad menor a siete (Roychowdhury *et al.*, 2015). La secuenciación del genoma de cepas identificadas en regiones específicas confirma la presencia de tales repeticiones, aunque en número variable (Park, Kang, Yoo, Lee, Roh, Kim, Ryooa, 2014; Millán-Lou, Otal, Monforte, Vitoria, Revillo, Martín y Samper, 2015; Feyisa, Haeili, Zahednamazi Mosavari, Taheri, Hamzehloo, Zamani y Feizabadi, 2016).

Es importante mencionar que IS6110 es una secuencia exclusiva de las especies que forman el complejo *M. tuberculosis* (CMTB), por lo que puede ser empleada como un marcador específico para distinguir a las especies del complejo en métodos de diagnóstico (Sposito Campanerut, Ghiraldi, Leite, Hirata, Hirata, Siqueira y Fressatti, 2014; Sinha *et al.*, 2016; Roychowdhury *et al.*, 2015). Por otro lado, IS1081 ha sido empleada para ayudar en la diferenciación de cepas de *M. bovis* (Nghiem *et al.*, 2015).

El polimorfismo que presenta esta secuencia ha sido empleado para identificar las distintas cepas del CMTB que se han descrito hasta la actualidad. La variabilidad de IS6110 se aprovecha para la genotipificación de *Mtb* mediante el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) (Zaczek, Brzostek, Wojtasik, Dziadek y Sajduda, 2013; Phyu, Wah, Jong, Go-Eun y Chulhun, 2016; Nghiem *et al.*, 2015). Los patrones de restricción obtenidos del análisis del material genético de las cepas aisladas de un sitio en particular se pueden comparar con una base de datos ya existente, la cual es administrada por el Instituto Pasteur.<sup>1</sup> De esta forma es posible saber si la cepa examinada ya fue identificada previamente; en caso contrario, puede ingresarse el nuevo patrón de restricción correspondiente a una nueva cepa encontrada. Estudios epidemiológicos emplean esta comparación para determinar la presencia o no de

cepas específicas en países o ciudades (Zheng, Zhao, Zhu, Li, Sun, Feng, *et al.*, 2014).

Dada la variabilidad que pueden presentar estas secuencias de inserción, se ha propuesto que la modificación en el patrón de restricción de una cepa particular se relaciona con su evolución; de esta forma, se plantea que la organización de estas secuencias varía no sólo con el tiempo, sino también con el estadio o fase de la infección. Se ha calculado que aproximadamente cada 3.2 años ocurre un cambio en el patrón de restricción, en tanto que se ha sugerido que durante la fase inicial de la infección ocurre con mayor frecuencia una variación en la secuencia, más que en los estadios más avanzados (Phyu *et al.*, 2016). Se ha sugerido que entre más alto es el número de copias de IS6110 presente en la cepa, más se eleva la capacidad de generar ventajas evolutivas como resistencia a drogas, virulencia y eficiencia en la transmisión (Zheng *et al.*, 2014; Roychowdhury *et al.*, 2015). Tal es el caso de la cepa Beijing, conocida por ser de las más resistentes; se han descrito hasta 21 copias de esta secuencia en su genoma (Zheng *et al.*, 2014).

Aunque IS6110 ha sido por muchos años un buen indicador de la presencia de cepas de *Mtb*, tiene una limitante, y es que aquellos microorganismos cuyo genoma presenta menos de seis copias de la secuencia de inserción son difíciles de analizar mediante RFLP, ya que no se observan los fragmentos de restricción esperados, por lo que el análisis debe complementarse con otros métodos, como Unidades Repetitivas Intercaladas micobacteriana-Número Variable de Repeticiones en Tándem (MIRU-VNTR, por sus siglas en inglés) o DR (Zheng *et al.*, 2014). Por otro lado, la identificación con IS6110 es suficiente para genotipificar una cepa, lo que no ocurre con las MIRU-VNTR. Se ha observado que, en general, hay una discrepancia entre los resultados, siendo IS6110 el más confiable (Zheng *et al.*, 2014; Jonsson, Hoffner, Berggren, Bruchfeld, Ghebremichael, Pennhag y Groenheit, 2014; Gholoobi Masoudi, Meshkat y Meshkat, 2014; Brossier, Sola, Millot, Jarlier, Veziris

<sup>1</sup>pasteur\_guadeloupe.fr:8081/SITVIT\_ONLINE/

y Sougakoffa, 2014). Thabet, Karboul, Dekhil y Mardassi propusieron una nueva técnica basada en la amplificación de IS6110 mediante PCR, con la cual es posible amplificar tanto el extremo 3' como 5' de estas secuencias, con lo que se facilita la identificación de polimorfismos en la secuencia de inserción (Thabet et al., 2014).

### **Gen rpoB**

El rpoB es un gen unicopia de 723 pb que contiene cuatro regiones conservadas y tres regiones variables (Kim, Lee, Lyu, Kim, Bai, Kim, Chae, Kim, Cha y Kook, 1999). Se encuentran polimorfismos en su secuencia, especialmente en el codón 531, el cual se ha asociado con la resistencia a la rifampicina. Kim et al., 1999, obtuvieron la secuencia completa del gen rpoB en 44 especies de micobacterias. Al amplificar un fragmento de 306 pb, localizado en una región muy conservada del gen, determinaron que las especies pertenecientes al CMTB presentaron secuencias idénticas, en tanto que otros aislados mostraron 93.1% de homología con especies de micobacterias no patógenas. Este resultado demostró que rpoB es un marcador específico de identificación para las especies que conforman el CMTB (Kim et al., 1999).

En seguimiento al estudio sobre rpoB, este mismo equipo publicó en 2004 el resultado de la amplificación mediante PCR dúplex de dos fragmentos específicos de este gen para micobacterias tuberculosas y no tuberculosas, de 235 pb y 136 pb, respectivamente. La publicación muestra la presencia de uno solo de estos fragmentos en cada caso, según el grupo al que pertenezca la especie evaluada (Kim, Hong, Lee, Yun, Kim, Park, Bai y Kook, 2004). Con esto se demostró que rpoB contiene secuencias muy conservadas entre todas las especies de *Mycobacterium*, pero que al mismo tiempo incluye secuencias específicas que permiten identificar las especies que conforman el CMTB, aun en aislados clínicos.

Por otro lado, se ha empleado rpoB -junto con otros genes como hsp65 y 16S rRNA- para detectar especies

de micobacterias, especialmente las del CMTB (Huang, Chen, Hu, Chiou, Huang, Hsu, Lu y Shen, 2012), así como en el diagnóstico diferencial de especies del complejo *M. avium* (Kim, Shin, Lee y Koh, 2013; Jang, Koh, Huh, Kim, Jeon, Ki y Lee, 2014).

En 2003, Adékambi y Drancourt reportaron el uso de la secuencia total de rpoB para identificar especies de *Mycobacterium* de crecimiento rápido, pertenecientes a los grupos *Mycobacterium chelonae-abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium smegmatis*, las cuales provocan padecimientos de las vías aéreas, piel y órganos blandos, por lo que su correcta caracterización favorece la administración del tratamiento, al conocerse su susceptibilidad a los antibióticos.

Recientemente se le ha utilizado, junto con hsp65, en la identificación de especies no tuberculosas de micobacterias (Phelippeau Aboubaker, Musso y Drancourt, 2015; Gingeras, Ghandour, Wang, Berno, Small, Drobniewski, Alland, Desmond, Holodniy y Drenkow, 1998; Nie, Duan, Huang, Lu y Chu, 2015). Incluso se ha logrado reconocer nuevas especies de micobacterias o la incorporación de algunas ya existentes en la filogenia de este género.

### **Gen gyrB**

El gyrB es un gen de 2028 pb que codifica para la subunidad  $\beta$  de la DNA girasa (topoisomerasa II), una enzima distribuida universalmente y esencial para la replicación bacteriana. Al igual que rpoB, la secuencia de gyrB es muy conservada entre las especies del CMTB, la homología es prácticamente de 100%, existiendo en ciertas ocasiones diferencias de un solo nucleótido entre algunas especies. Lo anterior fue demostrado al amplificar mediante PCR un fragmento de 1020 pb sobre DNA proveniente de cultivos de especies de micobacterias no tuberculosas y tuberculosas, observándose la amplificación únicamente en este último grupo bacteriano. Resultados similares se obtuvieron de aislados a partir de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con TB (Kasai, Ezaki y



Harayama, 2000; Niemann, Harmsen, Sch-Gerdes y Richter, 2000), lo que no deja duda de la utilidad de *gyrB* en la determinación de la presencia de especies del CMTB.

Tras la amplificación del fragmento de 1020 pb, Kasai, Niemann y sus colegas investigadores examinaron los patrones de restricción obtenidos con *RsaI* y *TaqI* para las especies pertenecientes al CMTB y aquellas que no se encuentran en este grupo. Observaron el mismo patrón de bandas para aquellas del CMTB, lo que les llevó a ratificar la homología de esta secuencia entre las especies y a concluir que serían indistinguibles por este medio. Sin embargo, Chimara, Ferrazoli y Leao reportaron observar patrones de restricción distintos para el CMTB, al efectuar una mejor separación mediante electroforesis de los fragmentos obtenidos tras la restricción con las mismas enzimas. Utilizando el software GelComparII identificaron la presencia de un número mayor de fragmentos con patrones distintos para cada especie, resultados que les permitieron proponer su metodología como un medio efectivo para reconocer las especies pertenecientes al CMTB a través de *gyrB* (Chimara et al., 2004).

El procedimiento antes descrito ya ha sido empleado con éxito en la determinación del agente causal de casos de TB; por ejemplo, en Alemania se identificó a *M. caprae* como responsable de TB meníngea en humanos. El análisis del patrón de restricción obtenido sobre el producto de la amplificación del fragmento de 1020 pb de *gyrB*, previamente usado por Niemann, Kasai y Chimara, permitió, en primer lugar, descartar la presencia de un miembro del CMTB y, posteriormente, ubicar a la especie responsable del caso (Hansena, Seilera, Rumpfa, Krafta, Dlaskea, Abele-Hornb y Muellges, 2012).

Este conocimiento se ha aplicado no sólo al diagnóstico en humanos, sino también en animales. En Italia se ha dado seguimiento a la prevalencia de TB entre jabalíes, que originalmente se atribuía a *M. bovis*. Sin embargo, el estudio realizado en 2014 empleando la técnica arriba descrita develó que existe un nuevo

agente causal en esta población: *M. microti* (Boniotti, Gaffuri, Gelmetti, Tagliabue, Chiari, Mangeli, et al., 2014).

### **Gen *hsp65***

El gen *hsp65* está constituido por 1380 pb y su secuencia es muy conservada entre las especies de *Mycobacterium* (tuberculosas y no tuberculosas), lo que se ha confirmado mediante la amplificación del gen por PCR empleando los mismos oligonucleótidos. No obstante, los patrones de restricción obtenidos para esta secuencia son diversos para las especies no tuberculosas, en tanto que las pertenecientes al CMTB generan los mismos fragmentos de restricción (Plikaytis, Plikaytis, Yakrus, Butler, Woodley, Silcox, y Shinnick, 1992; Telenti, Marchesi, Balz, Bally, Botrger y Bodmer, 1993; Ringuet, Akoua-Koffi, Honore, Varnerot, Vincent, Berche, Gailard y Pierre-Audigier, 1999). Esta evidencia permite considerar a *hsp65* como un buen marcador de identificación de especies del CMTB, así como un elemento útil en el diagnóstico de padecimientos provocados por especies no pertenecientes a él.

Se ha observado que la secuenciación de este gen permite distinguir entre especies del género *Mycobacterium* en 99.1%. Dai, Chen y Lauzardo comunicaron la creación de una base de datos de acceso público que contiene información filogenética para identificar especies del género *Mycobacterium* a partir del gen *hsp65*. En esta base de datos se incluye 99.3% de todas las especies de *Mycobacterium* (Dai et al., 2011).

En el GeneBank de los institutos nacionales de Salud de Estados Unidos se encuentran registradas las secuencias de *hsp65* de especies no pertenecientes al CMTB, por ejemplo *M. marinum*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. avium*. Conocerlas facilita el diagnóstico de infecciones causadas por alguna de estas especies y, con ello, la determinación y administración del tratamiento correcto (Lau, Curreem, Ngan, Yeung, Yuen y Woo, 2011; Mendes, Magdinier, Cardoso, Pais, Cezar, Dias, 2013; Gunaydin, Yanik, Eroglu, Sanic, Ceyhan, Erturan y Durmas, 2013; Hoza, Mfinanga, Rodloff, Moser y König, 2016).

La importancia del conocimiento de la secuencia de hsp65 es tal, que se torna indispensable contemplarla entre los genes principales que describen e identifican a las especies de micobacterias junto con otros genes como rpoB y 16S rRNA, por citar algunos (Dias, De Souza, Ohnishi, Watanabe, Ohtsuka, Matsushima *et al.*, 2012). Estudios en los que se emplea el análisis de restricción de estos tres genes han demostrado 100% de concordancia en la identificación de Mtb (Huang *et al.*, 2012).

Kim *et al.*, (1999) han demostrado la efectividad del gen hsp65 en la identificación de diversas cepas de Mycobacterium a partir de muestras clínicas en las que existen múltiples especies bacterianas. Las técnicas empleadas han sido PCR dúplex, análisis de restricción y PCR en tiempo real, confirmando en todos los casos la utilidad de hsp65 para determinar la presencia de miembros del CMTB y de otras especies de micobacterias (Mun, Kim, Oh, Kim, Park, Bai, Do, Cha, Kook y Kim, 2007; Kim, Park, Lee, Kim, Cha, Kook, Kim, Joo, Lee y Jim, 2008; Kim, Lee, Lee, Shim, Lim *et al.*, 2010). Otro estudio que apoya la especificidad de la secuencia de hsp65 en especies de micobacterias es el reportado por Varma, Garima, Pathak, Dhar, Narang, Bhatnagar y Bose, quienes lograron la amplificación de 300 pb de este gen, únicamente en cepas micobacterianas y no en otras especies bacterianas (Varma *et al.*, 2013).

Recientemente se ha incrementado el número de casos de infecciones provocadas por micobacterias pertenecientes al complejo *M. avium*, lo que ha motivado la generación de métodos de diagnóstico eficaces. Hay reportes de varios países en los que ya se están probando metodologías que comprenden la secuenciación, amplificación o restricción de hsp65, solo o en junto con otros genes, como parte de este diagnóstico diferencial (Bensi, Panunto y Ramos, 2013; Kim *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2013; Macente, Fujimura Barreto, Dias, Cosmo, Rodrigues, Hiroyuki, Dominguez y Fressatti, 2013; Jang *et al.*, 2014).

## Gen 16S rRNA ribosomal (16S) y Región Intergénica 16S-23S (ITS)

La comparación de la secuencia de los genes ribosomales (rRNA) es una poderosa herramienta para deducir las relaciones filogenéticas y evolutivas entre bacterias, archaeobacterias y organismos eucarióticos. Estas secuencias se han obtenido por métodos que incluyen oligonucleótidos, secuenciación de clonas, secuenciación directa del RNA usando transcriptasa reversa y secuenciación de material amplificado por PCR.

La taxonomía basada en el gen 16S rRNA es la más ampliamente usada y comprendida hoy en día, pero todavía no ha alcanzado su máximo potencial porque numerosos microorganismos pertenecen a taxones que aún no han sido caracterizados; además, múltiples secuencias que podrían ser clasificadas aún permanecen sin ser incluidas (McDonald, Price, Goodrich, Nawrocki, De Santis, Probst, Andersen, Knight y Hugenholtz, 2012).

Varios genes ribosomales (rRNA) y espaciadores transcritos internos (ITS) se han utilizado en la identificación bacteriana basada en PCR, tales como 16S, 23S rRNA, 5S rRNA y SSU rRNA (Olsen, Lane, Giovannoni, Pace y Stahl, 1986; Ree y Zimmermann, 1990). La identificación basada en PCR utiliza los genes ribosomales, ya que juegan un papel importante en el organismo vivo y tienen estabilidad funcional a lo largo de la evolución, debido a la rara variación en sus secuencias a través de millones de años, lo cual los hace ideales para ser utilizados en identificación y propósitos taxonómicos (Awad, Ouda, El-Refy, El-Feky, Mosa y Helmy, 2015).

Numerosos genes ribosomales, ITS, hsp65, rpoB, gyrB, groEL y recA han sido probados como marcadores en identificación bacteriana (Case, Boucher, Dahllöf, Holmström, Doolittle y Kjelleberg, 2007). Sin embargo, el 16S rRNA es el gen ribosomal más ampliamente usado en la identificación bacteriana, debido a varias razones: está presente en casi todas las familias bacterianas, tiene estabilidad funcional y evolutiva,



su longitud es alrededor de 1500:1550 pb, la cual es suficiente para propósitos taxonómicos y conveniente para la amplificación; asimismo, este gen contiene regiones conservadas y regiones variables, y en muchos casos la bacteria presenta múltiples copias en su genoma y a veces diferencias de secuencias que pueden ser utilizadas para distinguir especies cercanamente relacionadas (Han, 2006; Block y Ouellette, 2012).

Las micobacterias, por ejemplo, se pueden clasificar como de crecimiento rápido (<7 días) o de crecimiento lento (> 7 días) (García-Agudo y García-Martos, 2011). Las primeras comúnmente tienen dos copias idénticas de los genes 16S rRNA, mientras que las segundas sólo presentan una copia (Reischl, Feldmann, Naumann, Gaugler, Ninet, Hirschel y Emler, 1998).

La región ITS ha mostrado particular utilidad en la asignación taxonómica de micobacterias, debido a que es mucho menos conservada en comparación con el gen 16S rRNA y muestra potencial para producir más alto grado de polimorfismo genético (Gray, Kong, Jelfs, Sintchenko y Chen, 2014).

## Regiones de diferenciación (RD)

Los genomas de las especies que conforman el CMTB comparten una homología de 99.9%. Estudios de comparación genómica han identificado más de 140 genes cuya presencia es facultativa y que podrían conferir diferencias en fenotipo y virulencia entre las especies del CMTB. Muchos de estos genes se localizan en las denominadas regiones de diferencia (RD) cromosomales (Gordon, Brosch, Billault, Garnier, Eiglmeier y Cole, 1999; Pym, Brodin, Brosch, Huerre y Cole, 2002), de las cuales se describieron inicialmente 16 (RD1-RD16), cifra que ha aumentado hasta 68 (Behr, Wilson, Gill, Salamon, Schoolnik, Rane y Small, 1999; Sharifipour Farnia, Mozafari, Irani y Velayati, 2016). El análisis de las secuencias genómicas de *M. tuberculosis*, *M. microti* y *M. bovis* ha confirmado la delección de algunas de estas regiones polimórficas en las últimas dos especies como un mecanismo de

variabilidad genética entre los miembros del CMTB (Mostowy, Onipede, Gagneux, Niemann, Kremer, Desmond, et al., 2004).

Al ser las regiones de mayor polimorfismo en el CMTB, se les ha propuesto como marcadores genéticos en la identificación de las especies del complejo y, más aún, en la identificación de subgrupos dentro de cada especie. Por ejemplo, Mostowy et al. resumen en su publicación diversos reportes que identifican tres grupos de *M. africanum* en función de las RD: el grupo 1, en el que RD7, RD8, RD9 y RD10 se encuentran presentes; el grupo 2, en el que RD9 se encuentra deletada, en tanto que el resto de las RD están presentes; y el grupo 3, en que las cuatro RD en mención se encuentran ausentes (Mostowy et al., 2004). Dos años más tarde, Warren et al. demostraron que mediante PCR multiplex y empleando las RD1, RD4, RD9 y RD12 era posible diferenciar entre *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG, estableciendo patrones de amplificación para cada caso. *M. tuberculosis* tiene a las cuatro RD estudiadas, *M. canettii* carece de RD12, *M. caprae* no cuenta con RD9, *M. bovis* sólo presenta RD1 y *M. bovis* BCG no muestra ninguna de las cuatro RD (Warren et al., 2006). Estos reportes indican que las RD pudieran emplearse como buenos marcadores genéticos en la diferenciación de las especies del CMTB.

Por otro lado, pese a que no se ha dilucidado la función de estas regiones para el bacilo, se les ha asociado fuertemente con el grado de virulencia que presenta cada especie del CMTB. El caso específico de RD1 (9.8 kb) ha llamado la atención, ya que se ha descrito su ausencia en cepas empleadas como vacuna contra TB, elaboradas a partir de *M. bovis* BCG y *M. microti* (Pym et al., 2002; Parkash, Singh y Pai, 2009; Kim, 2013). Por su parte, Lewis, Liao, Guinn, Hickey, Smith, Behr y Sherman probaron que la delección de RD1 en H37Rv disminuyó considerablemente su virulencia al infectar monocitos y macrófagos, sugiriendo el papel de RD1 en la regulación de genes esenciales para la virulencia del bacilo (Lewis et

al., 2003). Posteriormente, se reportó una mutación en RD2 relacionada con una atenuación mayor en la cepa empleada para vacunación, lo que fue probado por Kozak, Alexander, Liao, Sherman y Behr, al realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando la cepa H37Rv a la que se había deletado RD2 (Kozak *et al.*, 2011). La relación que se ha establecido entre las RD y la virulencia de las cepas de CMTB ha llevado a considerarlos como blancos de vacunas contra TB.

También se ha sugerido el empleo de las RD en el diagnóstico de TB, específicamente para asegurar que se está identificando a un miembro del CMTB como agente causal y no a *M. bovis* BCG (Behr *et al.*, 1999). El grupo de Wang en 2011 sugirió el uso de RD2 y RD11 para este fin, por su capacidad para inducir la respuesta inmune.

## Conclusiones

La homología de los genomas de las especies del CMTB permite el uso de ciertas regiones como marcadores genéticos en la identificación de la micobacteria en un probable caso de TB, con lo que posibilita un diagnóstico más rápido y preciso de la enfermedad, además de que contribuye al pronto tratamiento.

Los marcadores genéticos como los abordados en la presente revisión han sido de gran utilidad en la identificación micobacteriana a nivel mundial, específicamente para reconocer a las especies dado su nivel de conservación entre ellas dentro de este complejo micobacteriano.

Las RD evidencian que son responsables de la variabilidad entre los genomas de las especies del CMTB y que a pesar de representar un pequeño porcentaje del genoma, pudieran tener un papel muy importante en la identidad de cada una de las especies de este complejo. Aunque no se ha determinado su función y su importancia en la biología del bacilo, los resultados muestran que son relevantes en la virulencia de cada especie.

Aún no hay un único gen blanco que indique ser suficientemente discriminatorio para la determinación

de especies en todas las micobacterias de rápido crecimiento, de lento crecimiento y las no tuberculosas.

La habilidad de diferentes tecnologías para distinguir con cierta precisión especies cercanamente relacionadas se mantiene incierta, pero la metodología y herramientas moleculares están permitiendo coadyuvar en las técnicas fenotípicas para determinar la posición taxonómica de las distintas especies de micobacterias, sobre todo las de interés en salud pública.

Lo anterior nos lleva a proponer más estudios para determinar la diversidad, así como el análisis filogenético de los aislados dentro de estas poblaciones, mediante la obtención de secuencias de distintos marcadores genéticos, ya que están aumentando las infecciones por micobacterias atípicas; es decir, micobacterias no tuberculosas.

## Referencias

- Adékambi, T., Colson, P. y Drancourt, M. (2003). rpoB-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 41(12), 5699-5708.
- Altamirano, M., Kelly, M.T., Wong, A., Bessuille, E. T., Black, W.A., Smith, J. A. (1992). Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30(8), 2173-2176.
- Dunlap N., E., Bass, J., Fujiwara, P., Hopewell, P., Horsburgh C., R., Salfinger, M., Simone, P. M. (2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(4), 1376-1395.
- Awad, M., Ouda, O., El-Refy, A., El-Feky, F. A., Mosa, K. A. y Helmy, M. (2015). FN-Identify: Novel Restriction Enzymes-Based Method for Bacterial Identification in Absence of Genome Sequencing. *Advances in Bioinformatics*, 1-14.

- Barrón, H., Monteghirfo, M., Rivera, N. (2006). Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. *An Fac Med Lima*, 67(1), 11-18.
- Bensi E., P., Panunto P., C. y Ramos M. C. (2013). Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. *Clinics*, 68(2), 179-183.
- Behr M., A, Wilson M., A., Gill W., P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S. y Small, P. M. (1999). Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science* 284(5419), 1520-1523.
- Block M., G. y Oullette, A. (2012). Genetic identification of eleven aquatic bacteria using the 16S rDNA gene. *J Res Across Disc.*, 1-46.
- Boniotti M., B., Gaffuri, A., Gelmetti, D., Tagliabue, S., Chiari, M., Mangeli, A., et al. (2014). Detection and Molecular Characterization of *Mycobacterium microti* Isolates in Wild Boar from Northern Italy. *J Clin Microbiol*, 52(8), 2834-2843.
- Brossier, F., Sola, C., Millot, G., Jarlier, V., Veziris, N. y Sougakoffa, W. (2014). Comparison of a Semiautomated Commercial Repetitive-SequenceBased PCR Method with Spoligotyping, 24-Locus Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing, and Restriction Fragment Length Polymorphism-Based Analysis of IS6110 for *Mycobacterium tuberculosis* Typing. *J Clin Microbiol*, 52(11), 4082-4086.
- Case R., J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F. y Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microb*, 73(1), 278-288.
- Chimara, E., Ferrazoli, L. y Leao S., C. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* Complex Differentiation Using gyrB Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(7), 745-748.
- Cole S., T., Brosch, J., Parkhill, T., Garnier, C., Churcher, D., Harris S., V., Gordon, et al. (1998). Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. *Nature*, 393(6685), 537-544.
- Cormican M., G., Barry, T., Gannon, F. y Flynn, J. (1992). Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. *J Clin Pathol*, (45), 601-604.
- Dai, J., Chen, Y. y Lauzardo, M. (2011). Web-Accessible Database of hsp65 Sequences from *Mycobacterium* Reference Strains. *J Clin Microbiol*, 49(6), 2296-2303.
- Desikan, S. y Narayanan, S. (2015). Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* (141), 761-774.
- Dias C., C., De Souza C., P., Ohnishi, H., Watanabe, T., Ohtsuka, K., Matsushima, S., et al. (2012). First Isolation of *Mycobacterium kyorinense* from Clinical Specimens in Brazil. *J Clin Microbiol*, 50(7), 2477-2478.
- Eisenach K., D., Cave M., D. y Crawford J., T. (1993). PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. En Persing D., H., Smith, F., Tenover, C. y White, J. (eds.), *Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications* (pp. 191-196). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Feyisa S., G., Haeili, M., Zahednamazi Mosavari, N., Taheri M., M., Hamzehloo, G., Zamani, S. y Feizabadi M., M. (2016). Molecular characterization of

*Mycobacterium tuberculosis* isolates from Tehran, Iran by restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Rev Soc Bras Med Trop*, 49(2), 204-210.

García-Agudo, L. y García-Martos, P. (2011). Clinical significance and antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria. *Sci Against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv.*, 363-377.

Gholoobi, A., Masoudi-Kazemabad, A., Meshkat, M. y Meshkat, Z. (2014). Comparison of Culture and PCR Methods for Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Different Clinical Specimens. *Jundishapur J Microbiol*, 7(2), e 8939.

Gingeras T., R., Ghandour, G., Wang, E., Berno, A., Small P., M., Drobniewski, F., Alland, D., Desmond, E., Holodniy, M. y Drenkow, J. (1998). Simultaneous Genotyping and Species Identification Using Hybridization Pattern Recognition Analysis of Generic *Mycobacterium* DNA Arrays. *Genome Research*, 435-448.

Gordon S., V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K. y Cole, S. T. (1999). Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microb*, 32(3), 643-655.

Gray T. J., Kong, F., Jelfs, P., Sintchenko, V. y Chen A., C. (2014). Improved identification of Rapidly Growing Mycobacteria by a 16S.23S Internal Transcribed Spacer Region PCR and Capillary Gel Electrophoresis. *PLoS ONE*, 9(7), 1-8.

Gunaydin, M., Yanik, K., Eroglu, C., Sanic, A., Ceyhan, I., Erturan, Z. y Durmas, R. (2013). Distribution of Nontuberculous Mycobacteria strains. *Ann of Clin Microb Antimicrob*, (12), 33.

Han X., Y. (2006). Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. En *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (pp. 323-332). NY: Springer.

Hansena, N., Seilera, C., Rumpfa, J., Krafta, P., Dlaskea, H., Abele-Hornb y Muellges, W. (2012). Human Tuberculous Meningitis Caused by *Mycobacterium caprae*. *Case Rep Neurol*, (4), 54-60.

Hoza A. S., Mfinanga S., G., Rodloff A., C., Moser, I. y König, B. (2016). Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern, Tanzania: public health and diagnostic implications for control programmes. *BMC Res Notes*, 9, 109.

Huang C., C., Chen, J. H., Hu, S. T., Chiou C., S., Huang, W. C., Hsu, J. Y., Lu, J. J. y Shen, G. (2012). Combined rpoB duplex PCR and hsp65 PCR restriction fragment length polymorphism with capillary electrophoresis as an effective algorithm for identification of Mycobacterial species from clinical isolates. *BMC Microbiology*, (12), 137.

Huard R. C., Lazzarini, L. C., Butler, W. R., Van Soolingen, D. y Ho, J. L. (2003). PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the Mycobacterium tuberculosis Complex on the Basis of Genomic Deletions. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1637-1650.

Jang, M. A., Koh, W. J., Huh H., J., Kim S., Y., Jeon, K., Ki C., S. y Lee N., Y. (2014). Distribution of Nontuberculous Mycobacteria by Multigene Sequence Based Typing and Clinical Significance of Isolated Strains. *J Clin Microbiol*, 52(4), 1207-1212.

Jonsson, J., Hoffner, S., Berggren, I., Bruchfeld, J., Ghebremichael, S., Pennhag, A. y Groenheit, R. (2014). Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011. *PLoS ONE*, 9(4), e 95159.

- Kasai, H., Ezaki, T. y Harayama, S. (2000). Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their gyrB Sequences. *J Clin Microbiol*, 38(1), 301-308.
- Kent, P. T. y Kubica, G. P. (1985). *Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory*. Atlanta: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control.
- Kim B., J., Lee S., H., Lyu M., A., Kim S., J., Bai G., H., Kim S., J., Chae, G., T., Kim E., C., Cha, Y. y Kook, Y. (1999). Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (rpoB). *J. Clinical Microbiology*, 37(6), 1714-1720.
- Kim B., J., Hong S., K., Lee K., H., Yun Y., J., Kim E., C., Park Y., G., Bai G., H. y Kook Y., H. (2004). Differential Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria by Duplex PCR Assay Using the RNA Polymerase Gene (rpoB). *J Clin Microbiol*, 42(3), 1308-1312.
- Kim B., J., Park J., H., Lee S., A., Kim, H., Cha C., Y., Kook Y., H., Kim, E., Joo, S., Lee, J. y Jim, J. (2008). Differentiation of Mycobacteria in Sputa by Duplex Polymerase Chain Reaction for Mycobacterial hsp65 Gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, (62), 193-198.
- Kim, K., Lee, H., Lee M., K., Lee S., A., Shim T., S., Lim S., Y. et al. (2010). Development and Application of Multiprobe Real-Time PCR Method Targeting the hsp65 Gene for Differentiation of Mycobacterium Species from Isolates and Sputum Specimens. *J Clin Microbiol*, 48(9), 3073-3080.
- Kim S., Y., Shin S., J., Lee N., Y. y Koh W., J. (2013). First Case of Pulmonary Disease Caused by a *Mycobacterium avium* Complex Strain of Presumed Veterinary Origin in an Adult Human Patient. *J Clin Microbiol*, 51(6), 1993-1995.
- Kim, Y., Choi, Y., Jeon B., Y., Jin, H., Cho, S. y Lee, H. (2003). A Simple and Efficient Multiplex PCR Assay for the Identification of Mycobacterium Genus and *Mycobacterium tuberculosis* Complex to the Species Level. *Yonsei Med J.*, 54(5), 1220-1226.
- Kozak R., A., Alexander D., C., Liao, R., Sherman D., R. y Behr M., A. (2011). Region of Difference 2 Contributes to Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 79(1), 59-66.
- Lau S., K., Curreem S., O., Ngan A., H., Yeung C., K., Yuen K., Y. y Woo P., C. (2011). First Report of Disseminated Mycobacterium Skin Infections in Two Liver Transplant Recipients and Rapid Diagnosis by hsp65 Gene Sequencing. *J Clin Microbiol*, 49(11), 3733-3738.
- Lebrun, L., Espinasse, F., Poveda, J. D., Levy-Frebault, V. V. (1992). Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of Mycobacteria. *J Clin Microbiol*, (30), 2476-2478.
- Lewis K., N., Liao, R., Guinn, K., M., Hickey M., J., Smith, S., Behr, M. y Sherman D., R. (2003). Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *J Infect Dis.*, 187(1), 117-123.
- Macente, S., Fujimura L., C., Barreto S., A., Dias S., V., Cosmo M., L., Rodrigues M., N., Hiroyuki, M., Dominguez C., R. y Fressatti C., R. (2013). Evaluation of hsp65 Nested PCR-Restriction Analysis (PRA) for Diagnosing Tuberculosis in a High Burden Country. *BioMed Research International*, 1-6.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., De Santis, T. Z., Probst, A., Andersen, G., Knight,

- R., y Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, (6), 610-618.
- Millán-Lou, M. I., Otal, I., Monforte, M. L., Vitoria, M. A., Revillo, M. J., Martín, C. y Samper S. (2015). In vivo IS6110 profile changes in a *Mycobacterium tuberculosis* strain as determined by tracking over 14 years. *J Clin Microbiol*, (53), 2359 -2361.
- Mederos C., L. M., Rodríguez D., F., Blanco, G. F. et al. (2003). Micobacteriosis diseminada asociada al complejo *Mycobacterium avium*-intracellulare (MAI) en paciente infectado con el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Cubana Med Trop*, 55(2), 126-128.
- Mendes C., A., Magdinier G., H., Cardoso O., M., Pais R., J., Cezar C., P., Dias C., C. E., et al. (2013). Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(4), 457-462.
- Morán M., M. C., Aceves, H. D., Peña, M. P. M., Gallegos A., M. P., Flores M., S. E., Montoya, F. H., Figuera, L., Villa Manzanares, L. y Sánchez, J. (2000). Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Rev Panam Salud Pública*, 7(6), 389-394.
- Mostowy, S., Onipede, A., Gagneux, S., Niemann, S., Kremer, K., Desmond E., P. et al, (2004). Genomic Analysis Distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol*, 42(8), 3594-3599.
- Mun H., S., Kim H., J., Oh E., J., Kim, H., Park Y., G., Bai G., H., Do, J., Cha C., Y., Kook, Y. y Kim, B. (2007). Direct application of Aall PCR restriction fragment length polymorphism analysis (Aall PRA) targeting 644 bp heat shock protein 65 (hsp65) gene to sputum samples. *Microbiol Immunol* (51), 105-110.
- Nghiem M., N., Nguyen B., V., Nguyen S., T., Bich V., T. T y Nong, H. V. (2015). A simple, Single Triplex PCR of IS6110, IS1081, and 23S Ribosomal DNA Targets, Developed for Rapid Detection and Discrimination of *Mycobacterium* from Clinical Samples. *J Microbiol Biotechnol*, 25(5), 745-752.
- Nie, W., Duan, H., Huang, H., Lu, Y. y Chu, N. (2015). Species Identification and Clarithromycin Susceptibility Testing of 278 Clinical Nontuberculosis *Mycobacteria* isolates. *BioMed Research International*, 1-7.
- Niemann, S., Harmsen, D., Sch-Gerdes, S. R. y Richter, E. (2000). Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by gyrB DNA Sequence Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*, 38(9), 3231-3234.
- Nolte, F. S., Metchock, B., McGowan, J. E., Edwards, A., Okwumabua, O., Thurmond, C., Plikaytis, B. y Shinnick, T. (1993). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* (31), 1777-1782.
- Olsen G., J., Lane D., J., Giovannoni S., J., Pace, N. R. y Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann Rev Microbiol*, (40), 337-365.
- Organización Mundial de la Salud. *Global tuberculosis report 2016*.
- Park, Y. K., Kang, H., Yoo, H., Lee, S. H., Roh, H., Kim, H. J., Ryooa, S. (2014). Whole-Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Korean Strain KIT87190. *Genome Announ*, 2(5), 01103-14.



- Parkash, O., Singh B., P. y Pai M. (2009). Regions of Differences Encoded Antigens as Targets for Immunodiagnosis of Tuberculosis in Humans Scandinavian. *J Immunol*, (70), 345-357.
- Phelippeau, M., Aboubaker, O. D., Musso, D. y Drancourt, M. (2015). Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in French Polynesia. *J Clin Microbiol*, (53), 3798-3804.
- Phyu, W. E., Wah, W. A., Jong, S. L., Go-Eun, C., Chulhun, L. C. (2016). Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: A Review of Frequently Used Methods. *J Korean Med Sci* (31), 1673-1683.
- Plikaytis, B. B., Plikaytis, B. D., Yakus, M. A., Butler, W. R., Woodley, C. L., Silcox, V. A. y Shinnick, T. M. (1992). Differentiation of Slowly Growing Mycobacterium Species, Including *Mycobacterium tuberculosis*, by Gene Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*, 30(7), 1815-1822.
- Popper, H. H., Winter, E. y Höfler, G. (1994). DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*, (101), 738-741.
- Pym A., S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. y Cole, S. T. (2002). Loss of RD1 Contributed to the Attenuation of the Live Tuberculosis Vaccines *Mycobacterium Bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*, 46(3), 709-717.
- Ree H. K. y Zimmermann, R. A. (1990). Organization and expression of the 16S, 23S and 5S ribosomal RNA genes from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Researched*, 18(15), 4471-4478.
- Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler B., J., Ninet, B., Hirschel, B., Emler, S. (1998). 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, (36), 1761-1764.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gailard, J. L. y Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 37(3), 852-857.
- Romero C., R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. 3ª edición. México: Editorial Medicapamericana.
- Roychowdhury, T., Mandal, S. y Bhattacharya, A. (2015). Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, (5), 12567.
- Saboor, S. A., Johnson, N. M. y McFadden, J. (1992). Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet*, 339(8800), 1012-1015.
- Sharifipour, E., Farnia, P., Mozafari, M., Irani, S. y Velayati A., A. (2016). Deletion of region of difference 181 in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *International J Mycobacteriology*, (5), 238-5239.
- Sauret, J. y Hernández-Flix, S. (1990). Tratamiento actual de las micobacteriosis. *Med Clí.*, 95(2), 64-66.
- Sinha, P., Gupta A, Prakash P, Anupurba S, Tripathi R, Srivastava, G. N. (2016). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. *BMC Infectious Diseases*, (16),123.

Sommers, H. M. y McClatchy, J. K. (1983). *Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses*. Washington, D. C.: Am Soc for Microbiol.

Sposito F., L. E., Campanerut P., A. Z., Ghiraldi, L. D., Leite, C. Q. F, Hirata, M. H., Hirata R., D. C., Siqueira, V. y Fressatti, R. (2014). Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Braz J Microbiol*, 45(3), 841-843.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Botrger, E. C. y Bodmer, T. (1993). Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J Microbiol*, 31(2), 175-178.

Thabet, S., Karboul, A., Dekhil, N. y Mardassi, H. (2014). IS6110-50 30 FP: an automated typing approach for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains simultaneously targeting and resolving IS6110 50 and 30 polymorphisms. *Intl J Infec Dis* (29), 211-218.

Thierry, D., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Crawford, J. T., Bates, J. H., Gicquel, B., Guesdon, J. L. (1990). IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nuc Acids Res*, 18(1), 188.

Varma-Basil, M., Garima, K., Pathak, R., Dhar, D. S., Narang, A., Bhatnagar, A. y Bose, M. (2013). Development of a Novel PCR Restriction Analysis of the hsp65 Gene as a Rapid Method to Screen for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria in High-Burden Countries. *J Clin Microbiol* 51(4), 1165-1170.

Wang, S., Chen, J., Zhang, Y., Diao, N., Zhang, S., Wu, J. y Zhang, W. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* Region of Difference (RD) 2 Antigen Rv1985c and RD11 Antigen Rv3425 Have the Promising Potential

to Distinguish Patients with Active Tuberculosis from *M. bovis* BCG-Vaccinated Individuals. *Clin Vacc Immunol: CVI*, 20(1), 69-76.

Wallace, R. Jr, O'Brien, R., Glassroth, J., Raleigh, J. y Dutt, A. (1990). Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*, 142(4), 940-953.

Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., De Kock, M., Gutiérrez, M. C., Chege, G. K., Victor, T. C., Hoal, E. G., Van Helden, P. D. (2006). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10(7), 818-822.

Żaczek, A., Brzostek, A., Wojtasik, A., Dziadek, J. y Sajduda, A. (2013). Genotyping of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Based on IS6110 and MIRU-VNTR Polymorphisms. *BioMed Research International*, ID 865197. doi:10.1155/2013/865197

Zheng, C., Zhao, Y., Zhu, G., Li, S., Sun, H., Feng, Q., et al. (2014). Differentiating Spoligotyped Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Sichuan in China. *BioMed Research International*, ID 763204.

