Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la X^a Región de Chile

Marcos Mancilla E., Alexis Martínez H., Christian Palavecino B., Germán Rehren S.,
Pedro Lucero L., Gloria León R. y Ana-M Zárrega O.

Universidad Austral de Chile,
Valdivia, Chile

Facultad de Ciencias, Instituto de
Bioquímica (MME, AMH, CPB, GRS,
GLR, AZO)

Hospital Clínico Regional
Valdivia, Chile

Laboratorio Central (PLL)

Financiamiento: FONDEFD021111

Recibido: 17 noviembre 2005

Aceptado: 23 abril 2006

Correspondencia a:

Ana María Zárrega O.
anamariazarrega@uach.cl

Genetic variants of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients of the Xth Region of Chile

The emergence of new virulent and drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* has forced researchers to focus on the worldwide geographical distribution of the genetics variants of this pathogen. *Mycobacterium bovis*, a close related pathogen, contributes with human tuberculosis and therefore, it is particularly important in countries with significant bovine tuberculosis prevalence. Spoligotyping is currently one of the most widely used strategies for genotyping members of the *M. tuberculosis* complex. In this work, of a total of 41 isolates, 25 were from different patients from the Xth Region from Chile. These isolates formed 15 clusters of spoligotypes. Twenty four percent of the spoligotypes corresponded to the worldwide distributed spoligotype 53 (SpolDB4). A significant number of spoligotypes were identical to profiles found in Brazil followed by Argentina and Spain. Although the patients where from rural areas, no cases of zoonosis were observed. To establish the geographical distribution, persistence and routes of dissemination of the pathogen, a greater number of epidemiologically relevant isolates are being analyzed using the MIRUs-VNTRs.

Key words: Tuberculosis, genotyping, spoligotyping, *Mycobacterium tuberculosis*, epidemiology.

Palabras claves: Tuberculosis, genotipificación, espiligotipificación, *Mycobacterium tuberculosis*, epidemiología.

Introducción

La tuberculosis es considerada una enfermedad re-emergente a nivel mundial debido al aumento en la prevalencia de variantes genéticas con resistencia a fármacos¹⁻³, así como al incremento de pacientes con infección por VIH/SIDA que desarrollan tuberculosis³⁻⁶. La OMS estima que un tercio de la población mundial está infectada, presentándose entre 8 y 10 millones de nuevos casos por año⁷.

El agente etiológico es *Mycobacterium tuberculosis*, miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, al cual pertenecen además *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*. *Mycobacterium africanum* produce la tuberculosis humana en África, *M. microti* la tuberculosis en ratas silvestres y *M. canetti* también es capaz de producir la tuberculosis en humanos⁸. La especie *M. bovis* ha sido subdividida recientemente en *M. bovis* subsp. *bovis*, resistente a pirazinamida (PZA) y *M. bovis* subsp. *caprae*, sensible a PZA⁹⁻¹¹.

Mycobacterium bovis infecta al bovino y a una variedad de animales domésticos y silvestres. En el hombre, la infección por *M. bovis* se produce vía in-

gestión de productos crudos contaminados como la leche, o por inhalación de gotas en suspensión. En consecuencia, la población más expuesta es los agricultores y personal de mataderos y frigoríficos. La única forma de distinguir la tuberculosis bovina de la humana causada por *M. tuberculosis*, es mediante el cultivo y tipificación bacteriana, ya que ambas patologías no se pueden diferenciar clínica ni radiológicamente. A estas especies se suman al menos otras sesenta micobacterias oportunistas, no tuberculosas, capaces de causar enfermedades en humanos¹².

En Chile, la incidencia de tuberculosis humana en el año 2004 fue de 16 casos por 100.000 habitantes, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud¹³, observándose en los últimos años una disminución en el coeficiente de declinación de la tasa de morbilidad¹⁴. Para entrar en una etapa avanzada de saneamiento se requiere de la identificación de las variantes genéticas de *M. tuberculosis* prevalentes en el país, cuya distribución a la fecha es desconocida. De esta forma será posible dilucidar las condiciones de permanencia y disseminación del patógeno, así como detectar el surgimiento de cepas multi-resistentes a los fármacos

antituberculosos. En el ámbito clínico, el conocimiento de las variantes genéticas también es útil, ya que permite identificar brotes, infecciones exógenas, recaídas o fracasos de tratamiento, además de problemas de contaminación en el laboratorio.

Se han descrito diferentes marcadores genéticos de utilidad para el estudio del polimorfismo genético de aislados de *M. tuberculosis*. Entre éstos, la secuencia de inserción IS6110 ha sido una de las más utilizadas, por encontrarse en un número variable de copias entre las cepas de una misma especie. Sin embargo, la ausencia de este elemento en algunas variantes de *M. tuberculosis*, sumado a la complicación técnica de este procedimiento, cuestionan su utilidad como marcador para estudios genéticos moleculares^{15,16}.

La técnica de *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*), basada en la presencia o ausencia de alguna de las 43 secuencias espaciadoras localizadas en la región de las repeticiones directas (DR) de *M. tuberculosis*¹⁷⁻¹⁹, es utilizada en el mundo como herramienta en investigaciones epidemiológicas y desarrollo de programas de prevención. Este procedimiento es ventajoso por cuanto permite rastrear y comparar rápidamente el genotipo con los existentes en la base de datos internacional SpolDB3²⁰.

El objetivo de este trabajo se centró en la identificación de los perfiles de espoligotipos de cepas chilenas de *M. tuberculosis* aisladas en la Xª Región geográfico-administrativa.

Material y Método

Aislados de micobacterias: Se analizó un total de 41 aislados clínicos de *M. tuberculosis*, provenientes del Laboratorio Central del Hospital Clínico Regional Valdivia. Estos aislados se obtuvieron a partir de esputo de 25 pacientes, cultivados en medio Löwenstein-Jensen.

Extracción de ADN genómico micobacteriano: La extracción de ADN genómico de *M. tuberculosis*, se realizó en base al protocolo descrito anteriormente^{21,22}. Brevemente, las bacterias fueron lisadas en tampón conteniendo lisozima/proteinasa K/SDS seguido de una extracción orgánica, precipitación y lavado con etanol. El ADN finalmente se resuspendió en agua estéril y se almacenó a -20 °C.

Identificación por RPC IS6110: Los ADNs extraídos fueron identificados utilizando el *Mycobacterium PCR kit*®, que incluye los reactivos necesarios para amplificar la secuencia IS6110 (BIOSONDA S.A., Chile, <http://www.biosonda.cl>). Los ciclos de amplificación incluyen una denaturación inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 1

min, apareamiento a 50 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C por 7 min. El producto de RPC esperado es de 181 pares de bases.

Spoligotyping: Las secuencias espaciadoras, presentes en el locus DR de cada aislado, se amplificaron por RPC utilizando los partidores biotinilados DRa (5'-GGTTTGGGTCTGACGAC) y DRb (5'-CCGAGA GGGGACGAAAC), incluidos en el sistema de *spoligotyping* (ISOGEN. Holanda, <http://www.isogen.nl>) y 10 ng del ADN genómico purificado, siguiendo las instrucciones del proveedor. Los productos fueron capturados por hibridación reversa sobre membrana de nylon conteniendo, inmovilizados, los oligonucleótidos correspondientes a cada secuencia espaciadora presente en el locus DR. La señal de hibridación se detectó por quimioluminiscencia, según las instrucciones del fabricante (*DNA Detector*® <http://www.kpl.com>).

Análisis de datos: Previo a la comparación con los perfiles de la base internacional de datos SpolDB3²⁰, cada espoligotipo fue convertido al formato "octal", basado en el protocolo descrito por Dale et al (2001)²³. El análisis de los perfiles de espoligotipos se realizó utilizando el programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica, <http://www.applied-maths.com>). Para el análisis de "clustering" se aplicó el método de UPGM^{24,25}. Finalmente, los datos fueron convertidos a código binario para la comparación en SpolDB3 y en SpolDB4²⁶.

Controles: En el *spoligotyping* y en el análisis de los datos se incluyeron dos cepas de referencia: *M. tuberculosis* H37Rv, que se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 20, 21 y del 33 al 36; *M. bovis* BCG, caracterizada por la ausencia de los espaciadores 39 a 43^{15,18}.

Resultados

Las cepas incluidas en este estudio provinieron principalmente de pacientes varones, sobre 30 años de edad, vírgenes al tratamiento. Cada cepa mostró una morfología y crecimiento concordante con *M. tuberculosis*. Todas fueron ácido alcohol resistentes y formaron colonias no cromogénicas, visibles después de 4 a 6 semanas de incubación. Además, todos los aislados fueron caracterizados por RPC, generando el fragmento de 181 pares de bases, correspondiente al producto de amplificación de IS6110.

El perfil genético de cada cepa fue determinado utilizando la técnica de *spoligotyping*. La cepa certificada de *M. tuberculosis*, H37Rv, utilizada como control, presentó el perfil esperado, caracterizado por la ausencia de los espaciadores 20, 21 y del 33 al 36. Como control se utilizó además, la cepa certificada BCG, la cual presentó el perfil concordante con el de

Tabla 1. Distribución geográfica de espilogotipos

Grupos (cluster) SpolDB4	Perfil de spoligotyping (octal)	Frecuencia (%)	Localización nacional	Distribución geográfica internacional ^a
2.353 **	776177600000000	8	Valdivia	E.U.A.
106	776177400000171	4	Valdivia	BRA, ESP
1.277 *	77777207760771	8	La Unión	ARG, BRA, E.U.A.
42	77777607760771	4	Valdivia	ARG, BRA, EUR, E.U.A.
20	67777607760771	4	Valdivia	BRA, EUR, E.U.A.
60	77777607760731	4	Valdivia	BRA, ESP
194	677737607760731	4	La Unión	BRA, E.U.A.
33	776177607760771	8	Panguipulli, Valdivia	ARG, CHIL, ESP
211	776137607760771	4	Valdivia	AUS, E.U.A.
st10 (ND)	766137607760771	4	Valdivia	ND
291	77777677760771	4	Valdivia	ARG, BRA, ASI
37	77773777760771	8	Panguipulli, Valdivia	AFR, EUR, E.U.A.
53	77777777760771	24	Valdivia, Futrono	AFR, ARG, ASI, AUS, BRA, EUR, E.U.A.
1.560 *	70377777760771	4	La Unión	POL, BGD, FRA
2	000000004020771	8	Panguipulli	ARG, BRA, E.U.A.

Los espilogotipos se identificaron utilizando las bases de datos SpolDB3 (perfiles ST1 al 817) y SpolDB4 (perfiles T1277, ST1560 y ST2353).

* **1.277**: Argentina (n = 2), Brasil (n = 2) y E.U.A. (n = 1). **1.560**: Bangladesh (n = 4), Francia (n = 1) y Polonia (n = 1).

** **2.353**: Nueva York (n = 1) (comparado con 54.000 aislados de la base de datos SITVIT1).

&: <http://unstats.un.org/unsd/methods/m49/m49alpha.htm>. Código ISO-ALPHA 3- Naciones Unidas donde: AFR: África. ARG: Argentina. ASI: Asia. AUS: Australia. BGD: Bangladesh. BRA: Brasil. CHIL: Chile. ESP: España. EUR: Europa. FRA: Francia. POL: Polonia. ND: Perfil no encontrado en bases de datos.

*M. bovis*²⁶, caracterizado por la ausencia de los espaciadores 39 al 43 (Figura 1, panel B).

El análisis de *spoligotyping* arrojó, del total de 41 aislados analizados, un total de 15 grupos (*clusters*) con perfiles de espilogotipos diferentes. El perfil encontrado con mayor frecuencia correspondió al espilogotipo 53 (Tabla 1). Este perfil es de amplia distribución internacional, encontrándose en Argentina, Brasil, E.U.A., Europa, África, Asia y Australia. Destaca un número importante de perfiles idénticos a los encontrados en Europa (Nº 106, 42, 20, 60, 33, 37, 53, 1560) y E.U.A. (ST 1277, 42, 20, 194, 211, 37 y 2). Las cepas chilenas comparten además, los espilogotipos 1277, 42, 291, 53, 2, 106, 20, 60, 194 con cepas de Brasil y los perfiles 1277, 42, 33, 291, 53 y 2 con Argentina, (Tabla 1). El perfil nombrado internamente con el código st10 no mostró identidad con los perfiles registrados en SpolDB3 ni en SpolDB4, designándose como ND (no determinado) (Figura 1, panel A).

Discusión

La implementación de procedimientos rápidos, sen-

sibles y específicos para la identificación de *M. tuberculosis* y sus variantes genéticas, es clave para entrar en una etapa de erradicación y adecuada vigilancia de la enfermedad. En este estudio se presentan los perfiles genéticos de espilogotipos de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en la Xª Región de Chile.

La técnica de *spoligotyping* ha sido ampliamente utilizada en el concierto internacional para apoyar programas epidemiológicos en tuberculosis humana^{17,23}. Una ventaja importante de esta metodología es que permite analizar, de manera simultánea, un número importante de cepas. Una segunda ventaja es la disponibilidad de las bases de datos internacionales, SpolDB3 y SpolDB4^{17,25}, las cuales contienen la colección más completa y actualizada de los espilogotipos de *M. tuberculosis* encontrados en distintos países. A la fecha, SpolDB3 registra 11.708 perfiles de espilogotipos, de los cuales 817 son compartidos y representativos de 90 países¹⁷. Comparativamente, SpolDB4 incluye 39.295 perfiles representativos de 141 países, de los cuales 1.939 son compartidos²⁵. Una de las cepas de mayor distribución mundial es la perteneciente a la familia Beijing, asociada a resistencia a fármacos anti tuberculosis e importantes brotes de tuberculosis²⁷.

Figura 1. Espoligotipos de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en el Hospital Clínico Regional Valdivia. Los perfiles de espoligotipos se compararon en base a las secuencias espaciadoras compartidas. **Panel A:** dendrograma. **Panel B:** perfiles de espoligotipos. **Panel C:** antecedentes epidemiológicos.

En este estudio no se encontraron perfiles de espoligotipos concordantes con los perfiles generados por cepas de la familia Beijing.

La variante genética de *M. tuberculosis* encontrada con mayor frecuencia en este trabajo (24%), correspondió al espoligotipo internacional 53. Esta cepa se ha encontrado en Argentina, Brasil, África, Asia, Australia y Europa. Un número importante de las cepas encontradas en la Xª Región comparten perfiles idénticos con cepas encontradas en Brasil y Argentina²⁸

(Figura 1, Tabla 1). El análisis comparativo de los octales muestra además, que de los 15 *clusters* identificados, 8 corresponden al perfil que caracteriza a las cepas de la familia latinoamericana LAM. Éstas presentan la numeración “6 0” en posición 7 y 8 respectivamente, de los 15 dígitos correspondientes al octal.

En el plano mundial, 3,1% de los casos de tuberculosis en humanos son causados por *M. bovis*³¹. Se ha informado de una relación directa entre la infección de *M. bovis* en el ganado y el desarrollo de la enfermedad

en la población humana³¹. Recientemente, se detectó 35 casos de zoonosis en pacientes de Nueva York, E.U.A., debidos al consumo de queso fresco proveniente de México³². En Chile no se registran casos de zoonosis. Sin embargo, la prevalencia de tuberculosis bovina, medida en rebaños lecheros, con al menos un animal reaccionante, alcanza al 56% en las regiones Vª y Región Metropolitana, mientras que en las regiones VIIIª a Xª, esta frecuencia descende a 5,11% (Dr. Alejandro Rivera, Servicio Agrícola y Ganadero, SAG). En consecuencia, estos registros indican la necesidad de mantener una vigilancia permanente de zoonosis. Según se observa en la Figura 1, en este trabajo no se encontraron perfiles coincidentes con *M. bovis*.

El perfil asignado en este trabajo con el código st10 es nuevo, ya que a la fecha no muestra identidad con perfiles descritos en la base de datos internacional. Estas cepas se caracterizan por presentar sólo los espaciadores 1 al 8 y 12 al 20. Resultados en progreso en nuestro laboratorio, utilizando los marcadores genéticos para multilocus, MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repeat Units*)²⁹, entregarán una visión más precisa respecto al número y tipo de variantes genéticas de *M. tuberculosis*. La ventaja de estas secuencias deriva de su alta estabilidad en el genoma, con una variabilidad estimada en seis años³⁰.

Actualmente, el programa nacional de control de tuberculosis humana en Chile ha logrado posicionarnos entre los países que tienen controlada esta patología. Sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes a fármacos anti-tuberculosos y de mayor virulencia, así como el aumento en el desplazamiento y en la edad promedio de la población, exigen la incorporación de técnicas moleculares que otorguen mayor sensibilidad y poder discriminatorio. Esto involucra además, la aplicación de estrategias adecuadas para el registro y trazabilidad de las muestras, lo que permitirá asociar cada perfil genético de *M. tuberculosis* a una localidad geográfica determinada. De esta forma será posible

establecer los nichos de permanencia y rutas de diseminación del patógeno.

Agradecimientos

A Christophe Sola y Nalin Rastogi del Instituto Pasteur, sede Guadalupe, por el análisis de los resultados en las bases de datos SpolDB3 y SpolDB4 y revisión crítica del texto. A Patricio Bórquez, Jefe del Laboratorio Central del Hospital Clínico Regional Valdivia, por su contribución al inicio de esta investigación. A Francisco Saldías por su apoyo al desarrollo de este trabajo.

Resumen

La aparición de nuevas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de mayor virulencia y que presentan resistencia a los fármacos antituberculosos ha orientado la investigación al registro de la distribución geográfica mundial de las distintas variantes genéticas del patógeno. *Mycobacterium bovis*, un patógeno estrechamente relacionado, contribuye con la tuberculosis en humanos y por tanto, es de importancia en países que presentan alta prevalencia de tuberculosis animal. El análisis de espigotipos es actualmente la estrategia más utilizada para tipificar genéticamente los miembros del complejo *M. tuberculosis*. En este trabajo, 25 aislados de un total de 41, provenientes de distintos pacientes de la Xª Región de Chile, formaron 15 grupos de espigotipos. Un 24% correspondió al espigotipo 53, de amplia distribución mundial. Un número importante de perfiles fueron idénticos a los encontrados en Brasil, seguido de Argentina y España. Aunque los pacientes eran de zonas rurales, no se detectó casos de zoonosis. Para establecer en forma más precisa el número y tipo de variantes genéticas presentes en nuestro país, nuestro laboratorio ha iniciado el análisis de un mayor número de cepas caracterizadas epidemiológicamente con técnicas más sensibles como MIRUS-VNTR.

Referencias

- 1.- Kennedy N, Gillespie S H, Saruni A O, Kisyombe G, McNerney R, Ngowi F I, et al. Polymerase chain reaction for assessing treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1994; 170: 713-6.
- 2.- Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 195-209.
- 3.- Farmer P. Social inequalities and emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 259-69.
- 4.- Pitchenik A E, Burr J, Laufer M, Miller G, Cacciatore R, Bigler W J, et al. Outbreaks of drug-resistant tuberculosis at AIDS centre. *Lancet* 1990; 336: 440-1.
- 5.- Daborn C J, Grange J M. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br Vet J* 1993; 149: 405-17.
- 6.- Small P M, Shafer R W, Hopewell P C, Singh S P, Murphy M J, Desmond E, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 1137-44.
- 7.- OMS. World Health Organization Global Tuberculosis Programme Fact sheet 104. Geneva Switzerland 2004; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> [Accedido el 02 de diciembre 2005]
- 8.- Cole S T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2002; 148: 2919-28.
- 9.- Aranaz A, Liebana E, Gómez-Mampaso E, Galán J C, Cousins D, Ortega A, et al.

- Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol 1999; 49 Pt 3: 1263-73.
- 10.- Cousins D V, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53: 1305-14.
 - 11.- Kent L, McHugh T D, Billington O, Dale J W, Gillespie S H. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. J Clin Microbiol 1995; 33: 2290-3.
 - 12.- Heifets L. Mycobacterial infections other than tuberculosis and leprosy (Infections caused by nontuberculous Mycobacteria-NTM). Sem Resp Crit Care Med 2004; 25: 283-96.
 - 13.- WHO. TB country profile. 2004.
 - 14.- Zúñiga M. Situación de la tuberculosis en Chile-2002 y su posible evolución. Rev Chil Enf Respir 2003; 19: 179-91.
 - 15.- Fleischmann R D, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol 2002; 184: 5479-90.
 - 16.- Lok K H, Benjamin W H Jr, Kimerling M E, Pruitt V, Lathan M, Razeq J, et al. Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without IS6110 insertions. Emerg Infect Dis 2002; 8: 1310-3.
 - 17.- Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Domínguez L, Vidal D, Domingo M, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 2734-40.
 - 18.- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-14.
 - 19.- Puustinen K, Marjamäki M, Rastogi N, Sola C, Filliol I, Ruutu P, et al. Characterization of Finnish *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping. J Clin Microbiol 2003; 41: 1525-8.
 - 20.- Filliol I, Driscoll J R, van Soolingen D, Kreiswirth B N, Kremer K, Valetudie G, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. J Clin Microbiol 2003; 41: 1963-70.
 - 21.- Hermans P W, van Soolingen D, Dale J W, Schuitema A R, McAdam R A, Catty D, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1990; 28: 2051-8.
 - 22.- van Embden J D, Cave M D, Crawford J T, Dale J W, Eisenach K D, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31: 406-9.
 - 23.- Dale J W, Brittain D, Cataldi A A, Cousins D, Crawford J T, Driscoll J, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5: 216-9.
 - 24.- Sola C, Horgen L, Devallois A, Rastogi N. Combined numerical analysis based on the molecular description of *Mycobacterium tuberculosis* by four repetitive sequence-based DNA typing systems. Res Microbiol 1998; 149: 349-60.
 - 25.- Sola C, Horgen L, Maisetti J, Devallois A, Goh K S, Rastogi N. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 1122-4.
 - 26.- Liens B, Sola C, Brudey K, Rastogi N, SpolDB4-Consortium. in 26th Annual Congress of the European Society for Mycobacteriology 31 Abstract Book. (Istanbul, Turkey, June 26th-29th 2005).
 - 27.- Jou R, Chiang C Y, Huang W L. Distribution of the Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J Clin Microbiol 2005; 43: 95-100.
 - 28.- Glynn J R, Whiteley J, Bifani P J, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis 2002; 8: 843-9.
 - 29.- Sola C, Filliol I, Legrand E, Mokrousov I, Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. J Mol Evol 2001; 53: 680-9.
 - 30.- Savine E, Robin M, Warren R, van der Spuy G, Beyers N, van Helden P, Loch C, et al. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 4561-6.
 - 31.- Cosivi O, Grange J M, Daborn C J, Raviglione M C, Fujikura T, Cousins D, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis 1998; 4: 59-70.
 - 32.- Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*-New York City, 2001-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005; 52: 605-8.