

Artigo Original

Deteção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas por reação em cadeia da polimerase utilizando primers baseados na região intergênica *plcB-plcC* *,**

Hermides Pinto Júnior¹, Claudia Giuliano Bica², Moisés Palaci³, Reynaldo Dietze⁴, Luiz Augusto Basso⁵, Diógenes Santiago Santos⁶

Resumo

Objetivo: Desenvolver um sistema para o diagnóstico molecular da tuberculose por reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction* (PCR), pela construção de *primers* baseados na diferença da organização de uma região intergênica da fosfolipase (*phospholipase*) C (região *plcB-plcC*), que diferencia *Mycobacterium tuberculosis* das outras micobactérias. **Métodos:** Um produto de PCR com o tamanho esperado (432 pb) foi obtido somente de *M. tuberculosis* e *M. africanum*. Um total de 33 isolados micobacterianos e 273 amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose foram examinados. Estes foram submetidos ao estudo comparativo da técnica de PCR contra o cultivo. **Resultados:** Os dados mostraram 93,8% de exatidão para PCR contra o cultivo ($p < 0,0001$), 93,1% de sensibilidade (IC: 88,7-96,0) e especificidade de 96,4% (IC: 96,1-99,4). O valor de Kappa foi de 0,82, demonstrando um alinhamento perfeito para a verificação do grau de concordância entre os testes. **Conclusões:** O uso da região *plcB-plcC* para a amplificação por PCR é mostrado como uma ferramenta importante e de confiança para o diagnóstico específico de tuberculose nas amostras clínicas analisadas.

Descritores: Reação em cadeia da polimerase; Diagnóstico; Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*.

* Trabalho realizado no Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

1. Diretor de Projetos e Desenvolvimento do Amplicon, Porto Alegre (RS) Brasil.

2. Professora Assistente da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – FFFCMPA – Porto Alegre (RS) Brasil.

3. Professor Adjunto de Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES – Espírito Santo (ES) Brasil.

4. Coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES – Espírito Santo (ES) Brasil.

5. Doutor em Ciências na área de Enzimologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

6. Doutor em Ciências na área de Biologia Molecular. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

Endereço para correspondência: Luiz Augusto Basso. Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681. TecnoPUC, Prédio 92 A, Partenon, CEP 90619-000, CP 1429, Porto Alegre, RS, Brasil.

Tel 55 51 3320-3629. Fax 55 51 3320-3629. E-mail: luiz.basso@pucrs.br/diogenes@pucrs.br

Recebido para publicação em 16/5/2006. Aprovado, após revisão, em 28/11/2006.

** The full-text English version of this article is available from: www.jornaldepneumologia.com.br

Introdução

O diagnóstico rápido e preciso é importante elemento das medidas globais de saúde, no controle da tuberculose (TB). Além disso, como 90% dos casos de TB ocorrem em países em desenvolvimento,⁽¹⁾ uma ferramenta custo-efetiva para o diagnóstico da TB que pudesse ser usada rotineiramente seria de grande benefício. Diversos métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction* (PCR), a análise por enzimas de restrição, do inglês *restriction enzyme analysis* (REA),⁽²⁾ ensaios comerciais de DNA,⁽³⁾ tecnologias de seqüenciamento baseadas na PCR,⁽⁴⁾ e, mais recentemente, ensaios de PCR em tempo real,⁽⁵⁾ foram desenvolvidos para utilização na identificação de micobactérias. Uma deficiência do método PCR-REA consiste na sua incapacidade em distinguir as pequenas diferenças no tamanho das bandas entre algumas espécies de micobactérias,⁽²⁾ ao passo que a maior desvantagem dos ensaios comerciais é seu alto custo. Ademais, relatou-se que um teste comercial de amplificação direta desenhado para a detecção diagnóstica *in vitro* do rRNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* pode produzir resultados falso-positivos para *M. tuberculosis* em pacientes portadores de AIDS infectados pelo *M. kansasii* ou *M. avium*, bem como em pacientes HIV-negativos portadores de doença pulmonar crônica causada pelo *M. avium*.⁽⁶⁾ Outro teste comercial demonstrou tão baixa sensibilidade para espécimes negativos à baciloscopia que a agência norte-americana Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*) aprovou-o tão somente para a detecção direta do *M. tuberculosis* em espécimes respiratórios positivos pela pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes.^(7,8) Além do mais, o teste da reação em cadeia da ligase não demonstrou nível suficiente de acurácia com espécimes negativos à baciloscopia para garantir seu uso rotineiramente.⁽⁹⁾ Embora o uso de seqüenciamento de ácidos nucleicos seja altamente preciso, é trabalhoso e requer equipamento dispendioso. Por isso, vários laboratórios usam métodos *in-house* para a detecção do *M. tuberculosis*. Estes ensaios têm como alvo uma ampla variedade de ácidos nucleicos, tais como a seqüência (IS)6110, genes que codificam o ácido ribonucleico ribossomal, antígenos 65-kDa, e o gene 65 da proteína de choque térmico.

⁽⁸⁾ Em tais ensaios *in-house*, a IS6110 é provavelmente o alvo mais amplamente usado na detecção molecular do *M. tuberculosis*.^(7,10) Entretanto, foram encontradas cepas do *M. tuberculosis* que não contêm IS6110,^(5,11,12) e homólogos IS6110 foram encontrados em *M. fortuitum*, complexo *M. avium-M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, e isolados clínicos *M. chelonae*,^(13,14) bem como em *M. bovis*.⁽¹⁵⁾ De acordo com dados da Organização Pan-Americana de Saúde e Organização Mundial de Saúde, 7000 casos novo de TB humana causada pelo *M. bovis* são notificados na América do Sul a cada ano.⁽¹⁶⁾ A diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* é particularmente importante, já que este último é resistente à pirazinamida, uma droga comumente usada no tratamento da TB.⁽¹⁷⁾ Porém, metodologias atuais têm falhado na distinção entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* em virtude de sua falta de resolução,⁽¹⁸⁾ bem como da falta de pessoal habilitado nos laboratórios, além de os reagentes requeridos serem relativamente dispendiosos.^(19,20)

Após a realização de experimentos de hibridização comparativa, descobriu-se que onze regiões presentes no *M. tuberculosis* H37Rv estavam ausentes em uma ou mais cepas virulentas do *M. bovis*⁽²¹⁾; entre elas, o *cluster* de três genes fosfolipase C (*plcA*, *plcB*, e *plcC*).⁽²¹⁾

Assim, tentamos desenvolver um método rápido, de baixo custo, e direto, de PCR baseado na amplificação de um fragmento de DNA, incluindo a região intergênica *plcB-plcC* para a detecção do *M. tuberculosis*, o que permitirá que o *M. tuberculosis* possa ser diferenciado do *M. bovis* em amostras clínicas.

Métodos

Um total de 33 isolados de micobactérias e 273 amostras clínicas foram testados. Todas as cepas de micobactérias (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. abscessus*, *M. aichiense*, *M. avium*, *M. asiaticum*, *M. aurum*, *M. chitae*, *M. chubuense*, *M. duvalii*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mageritense*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum*, *M. parafortuitum*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triviale*, *M. vaccae*, e *M. xenopi*) foram identi-

ficadas mediante cultura convencional e testes bioquímicos no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada em Micobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). As amostras clínicas foram obtidas em pacientes tratados no Hospital Sanatório Partenon (Porto Alegre, Brasil) ou Centro de Doenças Infecciosas do Espírito Santo (Vitória, Brasil). Foram coletados espécimes de escarro do trato respiratório dos pacientes. Uma alíquota foi inoculada em meio de cultivo de Löwenstein-Jensen, e 200 µl foram usados para a purificação do DNA e amplificação da PCR. Todos os isolados clínicos deste estudo foram identificados com base em técnicas convencionais, incluindo a determinação de características microbiológicas e testes bioquímicos.

As cepas de micobactérias e amostras clínicas foram inativadas a 95 °C por 10 min. O DNA foi extraído utilizando-se o QIAamp Tissue DNA Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado (10 µl) foi adicionado a 40 µl de mistura reagente contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 1,0 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), e 0,2 mM dNTPs (Invitrogen Life Technologies), junto com 10 pmol de cada um dos primers BC3 (5'-TCGACGGCAGAAAGCGTGCC-3') e BC5 (5'-GCGGCTCAATGCGCTCCG-3'). Os primers BC3 (complementos de bases 200266 a 200285) e BC5 (bases 200679 a 200697), que se baseiam na seqüência H37Rv do *M. tuberculosis* (EMBL, número de acesso BX842579), amplificaram um fragmento de DNA 432-bp compreendendo o 3' terminal do gene *plcB*, a região intergênica, e o 5' terminal do gene *plcC*. A amplificação pela PCR foi realizada como se segue: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 65 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s; e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2% w/v) e corados com brometo de etídeo. As amostras clínicas também foram amplificadas com primers específicos para os genes GH20 e PC04 de β-globina humana,⁽²²⁾ a fim de detectar amostras inibidoras.

O seqüenciamento direto de fragmentos de PCR foi realizado em um laboratório comercial (CATG, Porto Alegre, Brasil) utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator kit (PE Applied Biosystems, Foster

City, CA, EUA), e o produto foi analisado com um seqüenciador de DNA ABI 3700. Os primers de amplificação PCR também foram usados como primers de seqüenciamento, geralmente conseguindo-se pelo menos uma base de sobreposição de duas direções para cada um. O programa FASTA⁽²³⁾ foi usado para comparar a seqüência amplificada com a seqüência de DNA do banco de dados GenBank.

Os dados coletados foram analisados utilizando-se o software SPSS (versão 1.0 para Windows). O cálculo do qui-quadrado de Pearson foi usado para avaliar as relações entre variáveis categóricas, e os dados foram interpretados por meio da tabela Kappa.

Resultados

A fim de otimizar o PCR, testamos amplificações com diferentes concentrações de MgCl₂ (1,5-2,5 mM). A melhor eficiência de amplificação foi alcançada com MgCl₂ a uma concentração de 2 mM. Observou-se um produto 432-bp forte, sem fragmentos inespecíficos e sem primer dimers abundantes. Foi obtido um produto PCR de tamanho esperado para o *M. tuberculosis* e *M. africanum*. A ausência de qualquer produto PCR observado para *M. bovis* (Figura 1) foi particularmente encorajadora. Além disso, não se observou nenhuma amplificação usando DNA de outros organismos, tais como humanos, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Staphylococcus aureus*. Quando testamos amplificação com MgCl₂ com concentração de 2,5 mM, uma fraca banda 445-bp foi amplificada com *M. marinum*, enquanto todas as outras cepas de micobactérias testadas resultaram ou em produtos PCR com tamanhos diferentes dos esperados ou em nenhum produto PCR observável (dados não mostrados). Todas as demais amplificações foram então realizadas com 2 mM MgCl₂. O fragmento de DNA 432-bp foi isolado e seqüenciado. Descobriu-se que era idêntico à seqüência de nucleotídeos 200266-200697 do *M. tuberculosis* H37Rv depositado no GenBank (BX842579).

Das 273 amostras clínicas analisadas por PCR (Tabela 1), 93,8% estavam de acordo com os resultados da cultura (p < 0,001). Apenas 2 das 55 amostras negativas de cultura foram identificadas como positivas na PCR. Entretanto, 15 das 203 amostras positivas de cultura foram identificadas como negativas na PCR. Comparando-se

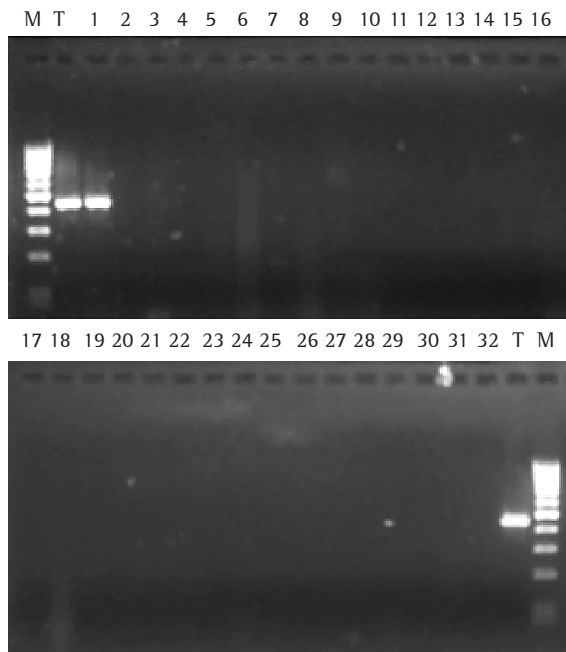


Figura 1 – Análise de cepas de micobactérias por PCR utilizando primers BC3-BC5 – Faixas: M, 100-bp escada DNA (Invitrogen); T, *M. tuberculosis* H37Rv; 1, *M. africanum*; 2, *M. bovis*; 3, *M. abscessus*; 4, *M. aichiense*; 5, *M. avium*; 6, *M. asiaticum*; 7, *M. aurum*; 8, *M. chitae*; 9, *M. chubuense*; 10, *M. duvalii*; 11, *M. flavescens*; 12, *M. fortuitum*; 13, *M. gastri*; 14, *M. gordonae*; 15, *M. intracellulare*; 16, *M. kansasii*; 17, *M. lentiflavum*; 18, *M. mageritense*; 19, *M. marinum*; 20, *M. neoaurum*; 21, *M. nonchromogenicum*; 22, *M. parafortuitum*; 23, *M. peregrinum*; 24, *M. porcinum*; 25, *M. scrofulaceum*; 26, *M. simiae*; 27, *M. smegmatis*; 28, *M. szulgai*; 29, *M. triviale*; 30, *M. vaccae*; 31, *M. xenopi*; e 32, água.

Tabela 1 – Comparação entre os resultados da PCR* e de cultura para amostras clínicas.

	Resultados de cultura		Total
	Positivos	Negativos	
PCR positiva	203	2	205
PCR negativa	15	53	68
Total	218	55	273

*PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase).

os resultados da PCR com os da cultura, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, e valor preditivo negativo foram, respectivamente, 93,1% (IC: 88,7-96,0), 96,4% (IC: 96,1-99,4), 99% (IC: 96,1-99,8), e 77,9% (IC: 65,9-86,7). O valor

de Kappa (0,82) mostrou que houve concordância quase perfeita entre os dois testes. Estes resultados são favoravelmente comparáveis aos compilados em recente revisão da literatura.⁽⁸⁾

Discussão

A rápida identificação do *M. tuberculosis* é crucial para a otimização da recuperação do paciente. A identificação de espécies pode levar várias semanas para ser completada, e durante esse tempo o paciente pode receber agentes antimicrobianos inapropriados. Isto é particularmente preocupante se o paciente estiver infectado pelo *M. bovis* ao invés de pelo *M. tuberculosis*, já que o *M. bovis* é resistente à pirazinamida, uma droga antituberculose de primeira linha.⁽¹⁹⁾ No presente estudo, desenhamos e testamos os primers BC3 e BC5, que diferenciam o *M. tuberculosis* do *M. bovis*. O fragmento genômico denominado *mtp40* foi testado como alvo espécie-específico de DNA para a identificação do *M. tuberculosis*.⁽²⁴⁾ Porém, a seqüência *mtp40* mostrou-se ausente em algumas cepas de *M. tuberculosis*.^(18,25)

O interessante é que a seqüência *mtp40* revelou-se parte do gene *plcA*.⁽²⁵⁾ No presente estudo, usamos primers ladeando a junção do 3' terminal do gene *plcB* e 5' terminal do gene *plcC*. Além disso, nossas tentativas em amplificar um fragmento de DNA compreendendo o 3' terminal do gene *plcA*, a região intergênica, bem como um compreendendo o 5' terminal do gene *plcB*, falharam (dados não mostrados).

A ausência de qualquer produto PCR observado para *M. bovis* era esperada, já que a deleção dos três genes codificadores de *plc* (*plcA*, *plcB*, e *plcC*) no *M. bovis* (cepas virulentas e cepas BCG) já havia sido relatada por alguns autores.⁽²¹⁾

Nosso ensaio PCR não pode diferenciar o *M. tuberculosis* do *M. Africanum*; porém, ambos são susceptíveis aos mesmos agentes quimioterápicos. Alguns autores⁽²⁶⁾ desenvolveram um método, baseado na PCR, para diferenciar as sub-espécies do complexo *M. tuberculosis*, com base nas deleções genômicas. Sete pares de primers foram usados a fim de construir a tipagem PCR do complexo do *M. tuberculosis*. No entanto, os autores descobriram que seu método era incapaz de diferenciar o *M. tuberculosis* do *M. africanum*. O método de PCR descrito no presente estudo também foi incapaz de diferenciar

o *M. tuberculosis* do *M. africanum*. Porém, usamos apenas um par de primers, e a interpretação dos resultados foi direta. Ensaio PCR em tempo real para a detecção, diferenciação, e quantificação do *M. tuberculosis* foram desenvolvidos recentemente.⁽⁵⁾ No entanto, nenhum deles consegue diferenciar o *M. tuberculosis* do *M. africanum* ou do *M. bovis*.

Os resultados de PCR estão de acordo com os dados da cultura, exceto pelas 15 amostras que foram identificadas como negativas na PCR e positivas em cultura (dentre as 203 amostras de cultura positiva) e as 2 amostras que foram identificadas como positivas na PCR e negativas em cultura (dentre as 55 amostras de cultura negativa). No caso dos falso-negativos, a sensibilidade pode ter aumentado pelo fato de mais de uma amostra ter sido coletada de cada paciente.⁽¹⁰⁾ Em contrapartida, os falso-positivos podem ser atribuíveis à inclusão de pacientes paucibacilares que apresentaram sintomas indicando infecção por TB.

Dentro do complexo *M. tuberculosis*, genes codificadores de *plc* bacterianos foram relatados como exercendo um papel na patogênese de muitas bactérias. Variações genéticas (inserções e deleções IS6110) foram observadas nas regiões *plcA-plcB-plcC* e *plcD*.^(27,28) Foram observadas inserções IS6110 nas posições *plcC* 19849 e 19668 do *M. tuberculosis*,⁽²⁷⁾ bem como nas posições 19589, 19645, e 19848.⁽²⁹⁾ Estes achados indicam que este domínio é uma região de integração preferencial, definida como domínio cromossômico <500-bp.⁽²⁷⁾ Um grupo de autores⁽³⁰⁾ relatou que, no *M. tuberculosis*, há uma frequência mais alta de inserção e deleção IS6110 na *gene plcD* do que nos genes *plcA*, *plcB*, e *plcC*. Todavia, estas alterações não afetaram a análise das amostras clínicas estudadas. O par de primers BC3/BC5 amplificou um fragmento 432-bp do *plcB-plcC* na posição 19384-19403 (GenBank, número de acesso Z83860). Portanto, está fora do domínio dos cromossomas.

Descrevemos aqui um método de PCR baseado na amplificação da seqüência intergênica *plcB-plcC*. Esta seqüência parece ser um alvo promissor para utilização na diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* em amostras clínicas.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Hospital Partenon (Porto Alegre, Brasil) e a Philip Noel Suffys,

respectivamente, por fornecerem algumas das amostras clínicas e cepas de micobactérias usadas neste estudo. Este estudo recebeu apoio financeiro na forma de fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ministério da Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT; processo no. 62.00555/01-4 PADCT III/MILÊNIO), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), e Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX; processo no. 661028/1998-4).

Referências

1. Schroeder EK, de Souza N, Santos DS, Blanchard JS, Basso LA. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002;3(3):197-225.
2. Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1094-104.
3. Wang SX, Tay L. Evaluation of three nucleic acid amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1932-4.
4. Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):400-6.
5. Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Cichero P, et al. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4565-72.
6. Jorgensen JH, Salinas JR, Paxson R, Magnon K, Patterson JE, Patterson TF. False-positive Gen-Probe direct *Mycobacterium tuberculosis* amplification test results for patients with pulmonary *M. kansasii* and *M. avium* infections. *J Clin Microbiol*. 1999;37(1):175-8.
7. Eing BR, Becker A, Sohns A, Ringelmann R. Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(7):2023-9.
8. Kaul KL. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: impact on patient care. *Clin Chem*. 2001;47(8):1553-8.
9. Garrino MG, Glupczynski Y, Degraux J, Nizet H, Delmée M. Evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Human Samples. *J Clin Microbiol*. 1999;37(1):229-32.
10. Rodrigues VF, Queiroz-Mello FC, Ribeiro MO, Fonseca L, Kritski AL, Rossetti ML, et al. Detection of *Mycobacterium avium* in blood samples of patients with AIDS by using PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2297-9.
11. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex

- indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(18):9869-74.
12. Agasino CB, Ponce de Leon A, Jasmer RM, Small PM. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. *Int J Tuberc and Lung Dis*. 1998;2(6):518-20.
 13. Kent L, McHugh TD, Billington O, Dale JW, Gillespie SH. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp.? *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2290-3.
 14. McHugh TD, Newport LE, Gillespie SH. IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1997;35(7):1769-71.
 15. Plikaytis BB, Eisenach KD, Crawford JT, Shinnick TM. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. *Mol Cell Probes*. 1991;5(3):215-9.
 16. Pan American Health Organization. Health conditions in the Americas, 1992 edition. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization; 1992.
 17. Kataria Y P. Observations on human infection with *Mycobacterium bovis*. *Tubercle*. 1969;50(1):14-21.
 18. Weil A, Plikaytis BB, Butler WR, Woodley CL, Shinnick TM. The *mtp40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2309-11.
 19. Niemann S, Richter E, Rüsç-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):152-7.
 20. Caws M, Drobniowski FA. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;(953):138-45.
 21. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999;284(5419):1520-3.
 22. Bauer HM, Manos MM. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic molecular microbiology: principals and applications*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. p. 407-13.
 23. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(8):2444-8.
 24. Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*. 1996;34(4):933-8.
 25. Vera-Cabrera L, Howard ST, Laszlo A, Johnson WM. Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1997;35(5):1190-5.
 26. Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1637-50.
 27. Viana-Niero C, de Haas PE, van Soolingen D, Leão SC. Analysis of genetic polymorphisms affecting the four phospholipase C (*plc*) genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates. *Microbiology*. 2004;150(Pt 4):967-78.
 28. Kong Y, Cave MD, Yang D, Zhang L, Marrs CF, Foxman B, et al. Distribution of insertion- and deletion-associated genetic polymorphisms among four *mycobacterium tuberculosis* phospholipase c genes and associations with extrathoracic tuberculosis: a population-based study. *J. Clin. Microbiol*. 2005;43(12):6048-53.
 29. Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, Filliol I, Boulahbal F, Vincent V, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):57-65.
 30. Talarico S, Durmaz R, Yang Z. Insertion- and deletion-associated genetic diversity of *mycobacterium tuberculosis* phospholipase c-encoding genes among 106 clinical isolates from turkey. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):533-8.