

Nuevos métodos de identificación de micobacterias

Fernando Alcaide Fernández de Vega

Servicio de Microbiología, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental. Universitat de Barcelona. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

En la actualidad, se han descrito más de 100 especies diferentes incluidas en el género *Mycobacterium*, muchas de ellas con gran repercusión clínica, ya que son los agentes causales de infecciones humanas con una elevada morbilidad y mortalidad. La identificación de las micobacterias mediante métodos convencionales (velocidad y temperatura óptima de crecimiento, fotocromogenicidad, morfología colonial y pruebas bioquímicas) ha sido el estándar en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Sin embargo, esta identificación fenotípica tiene notables limitaciones, ya que numerosas especies no pueden diferenciarse y el crecimiento lento de estos microorganismos hace que los resultados se demoren 2-4 semanas tras el aislamiento inicial. Por ello, uno de los mayores retos de los laboratorios de micobacteriología consiste en lograr una identificación rápida y precisa de todas las especies micobacterianas. El objetivo de esta revisión es realizar una breve descripción de las nuevas alternativas en la identificación micobacteriana. Aunque el análisis de los lípidos de la pared celular (ácidos micólicos) mediante cromatografía líquida de alta presión es una opción buena y bien conocida, los métodos de mayor interés y desarrollo se basan en la identificación molecular, como las sondas de ácidos nucleicos y, sobre todo, las técnicas de amplificación genómica.

Palabras clave: *Mycobacterium*. Identificación. Nuevos métodos.

New methods for mycobacteria identification

Currently, the genus *Mycobacterium* comprises more than 100 different species, many of which cause significant clinical infections with high morbidity and mortality. Mycobacteria identification by conventional methods (rate and optimal temperature of growth, pigment production, colony morphology, and biochemical characteristics) has been the standard in most clinical microbiology laboratories. However, this phenotypic approach has considerable limitations, since numerous species cannot

be differentiated. Moreover, because of the slow growth of these microorganisms, the results may not be available until 2-4 weeks after the initial isolation. Therefore, one of the most important challenges for clinical mycobacteriology laboratories is rapid and accurate identification of this variety of microorganism. This review aims to briefly describe several alternative procedures for mycobacterial identification. Although analysis of cell wall lipids (mycolic acids) by high-performance liquid chromatography is an interesting and well-known option, the most promising innovation for mycobacteria identification is the use of rapid molecular methods such as nucleic acid probes and, especially, genomic amplification methods.

Key words: *Mycobacterium*. Identification. New methods.

Introducción

En los últimos años, en los países desarrollados se ha asistido a un aumento del aislamiento de numerosas especies micobacterianas, tanto conocidas como de nueva descripción. Así, dentro del género *Mycobacterium* se incluyen más de 100 especies, muchas de ellas con gran repercusión clínica, ya que son los agentes causales de infecciones humanas con una importante morbilidad y mortalidad, como la tuberculosis y la lepra, entre otras. No obstante, aunque *Mycobacterium tuberculosis* es, con mucho, la micobacteria más importante y aislada con más frecuencia, las micobacterias no tuberculosas (MNT) representan, en la actualidad, entre el 10 y el 30% del total de las aisladas en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Además, un gran número de ellas son patógenas para el hombre (micobacteriosis), por lo que requieren un tratamiento específico para cada caso. Por ello, ante cualquier aislamiento micobacteriano clínico, se recomienda llevar a cabo una identificación precisa de especie, incluso dentro del complejo *M. tuberculosis*. Para la identificación del género *Mycobacterium* existen diversos tipos de abordaje metodológico: convencional o fenotípico, cromatográfico y los nuevos métodos, como el fagotípico y el genotípico o molecular¹.

Los métodos tradicionales se basan en una identificación preliminar mediante el tiempo de crecimiento (lento o rápido), los aspectos morfológicos y de cromogenicidad o producción de pigmento de las colonias (fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas). Posteriormente, se llevan a cabo diferentes pruebas bioquímicas para llegar a una identificación específica. Sin embargo, la laboriosidad de

Correspondencia: Dr. F. Alcaide Fernández de Vega.
Servicio de Microbiología, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge.
Departamento de Patología y Terapéutica Experimental.
Universitat de Barcelona.
Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

los métodos fenotípicos y el crecimiento lento de estas bacterias demoran la identificación definitiva varias semanas, y en muchos casos es imposible identificar la especie.

En el presente artículo se revisan las nuevas alternativas para la rápida y precisa identificación de las especies micobacterianas. Aunque es posible realizar algunas de ellas directamente sobre las muestras clínicas, esta revisión hace hincapié en la aplicación en los aislamientos obtenidos por cultivo.

Identificación cromatográfica

Una alternativa a la identificación tradicional es el análisis cualitativo de la composición lipídica de la pared celular de estos microorganismos (hasta el 40% de su peso seco), mediante diversos estudios cromatográficos: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Estas técnicas se basan en las diferentes solubilidades de los componentes entre 2 fases miscibles: hay una fase estacionaria (líquida o sólida) y una móvil (gaseosa o líquida), que varían de constitución según el método cromatográfico utilizado. De todos ellos, el estudio de los ácidos micólicos mediante HPLC ha demostrado ser rápido, reproducible, bastante específico de especie y de aplicación universal en la identificación micobacteriana². Además, en la actualidad, se dispone de sistemas de identificación informatizados con bases de datos que contienen múltiples perfiles de ácidos grasos de especies micobacterianas correctamente caracterizadas^{3,4}. No obstante, la HPLC, al igual que el resto de las técnicas cromatográficas (salvo la GLC), no deja de ser un método complejo, que requiere una infraestructura costosa y un gran entrenamiento, por lo que es una alternativa útil de identificación a partir de cultivos sólo en los centros con la dotación y la experiencia suficientes.

Por otro lado, la identificación micobacteriana directamente en muestras clínicas se ha intentado mediante la detección de un componente estructural de la pared micobacteriana, el ácido tuberculoesteárico (ATBS), mediante la cromatografía de gases/espectrometría de masas. Aunque la técnica demostró ser rápida y tener una sensibilidad considerable, el ATBS no es específico de especie y su detección implica una diagnóstico diferencial entre el género *Mycobacterium* y las especies de *Nocardia*, así como otros bacilos grampositivos, que también contienen dicho componente⁵.

Identificación mediante fagos específicos

Entre los nuevos métodos de identificación, recientemente ha aparecido la utilización de bacteriófagos con afinidad específica por las micobacterias. Desde 1947, se han descrito más de 250 micobacteriófagos. Sin embargo, en la actualidad sólo 2 métodos, el LRP (*Luciferase reporter phage assay*) y el PhaB (*phage amplified biologically assay*) o MAB (*mycobacteriophage-based assay*) se han desarrollado con cierta utilidad clínica. La diferencia más importante entre estos métodos radica en la detección de las células micobacterianas infectadas por el fago. En el LRP se utiliza la emisión de luz, codificada por el gen de la luciferasa, incorporado en el genoma del fago. Esta enzima es un indicador de la presencia de células micobacterianas

viables. En el PhaB o MAB, la detección se basa tan sólo en la presencia de múltiples células micobacterianas infectadas viables, tras una amplificación fágica (mycobacteriofago D29) en *Mycobacterium smegmatis*.

El LRP ha demostrado ser útil en la diferenciación entre *M. tuberculosis* y las MNT, a partir de cultivo y en las pruebas de sensibilidad a la isoniazida y la rifampicina^{6,7}. El PhaB o MAB se ha comercializado (FASTPlaqueTB o PhageTeK MB), para el diagnóstico de la tuberculosis en muestras respiratorias, aunque también se ha estudiado para la realización de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *M. tuberculosis*⁸⁻¹¹. En general, son técnicas sencillas y rápidas (48 h), que requieren poco entrenamiento y equipamiento técnico, y son relativamente económicas. No obstante, aunque han demostrado una buena especificidad, se han detectado diversos problemas de sensibilidad en la mayoría de los estudios realizados^{8,11,12}. Por ello, su aplicación en la práctica diaria ha quedado un tanto postergada, y tal vez podrían tener una cierta utilidad en laboratorios con recursos limitados, especialmente en países en desarrollo, y reservarse para las muestras de pacientes con baciloscopia negativa y con una elevada sospecha clínica de presentar tuberculosis.

Identificación genotípica

En la actualidad, la identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una identificación precisa y rápida de las especies micobacterianas. Sus principales ventajas son: una aplicación universal en todos los aislamientos, la posible detección rápida (directamente de las muestras o de cultivos recientes), la identificación de microorganismos de difícil cultivo, el reconocimiento preliminar de nuevos taxones micobacterianos, la reducción del riesgo biológico derivado de la manipulación de los cultivos y una adecuada relación coste-beneficio en los laboratorios clínicos de nivel III o de referencia. Por el contrario, aparte de las contaminaciones potenciales y las limitaciones de su empleo directo en muestras clínicas, estas técnicas actualmente no pueden sustituir completamente a la metodología tradicional. Por otro lado, su comercialización está relativamente poco desarrollada, y algunas de estas técnicas, como la secuenciación, requieren una inversión inicial elevada. No obstante, la gran variedad de técnicas actualmente disponibles y en constante renovación, así como diferentes ámbitos de aplicación, ha llevado consigo la instauración progresiva de esta metodología en los laboratorios diagnósticos, lo que ha supuesto un desembolso inicial asumible, un escaso mantenimiento y un rendimiento óptimo.

Sondas de ácidos nucleicos

La gran revolución en la identificación molecular surgió hace 3 lustros, mediante la introducción de sondas comerciales de ADN (AccuProbe), no radiactivas, que permiten identificar por hibridación con el ARN ribosómico micobacteriano, de forma rápida (2 h) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, el grupo *M. avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*. Estas sondas se pueden aplicar en los cultivos obtenidos en medios tanto sólidos como líquidos. Asimismo, ofrecen la posibilidad de utilizarlos en medios líquidos con contenido hemático, siendo necesaria una pequeña preparación previa median-

te concentración y lavado con una solución detergente (dodecil sulfato sódico y EDTA).

Las sondas comerciales han sufrido, a lo largo de los años, diferentes reformulaciones, debido a diversos problemas de sensibilidad y especificidad, pero han supuesto uno de los modelos de referencia en la detección e identificación micobacteriana en la práctica clínica, en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados¹³. Sin embargo, su aplicación queda limitada a un grupo de micobacterias que, si bien es el más importante desde el punto de vista clínico, no deja de ser reducido. Además, requiere una orientación presuntiva para la elección de la sonda correspondiente, al poder tan sólo realizar una identificación por prueba. Esta selección puede realizarse de una forma sencilla, aunque no exenta de errores, mediante las características fenotípicas del cultivo (morfología colonial, cromogenicidad, turbidez del medio líquido, etc.) y una tinción ácido alcohol-resistente que pueda mostrar las características bacilares individuales y asociativas como sería, por ejemplo, la formación de cuerdas o coronas de espigas en *M. tuberculosis*. También es importante no olvidar la posibilidad de encontrarnos ante cultivos micobacterianos mixtos (especialmente en los pacientes inmunodeprimidos) que la sonda no es capaz de detectar, lo que obliga a realizar un subcultivo, a pesar de una identificación positiva, principalmente con la sonda de ADN para el grupo *M. avium-intracellulare* o *M. tuberculosis*.

Amplificación de secuencias de ADN específicas

Este grupo de técnicas son en la actualidad las que presentan un mayor interés y capacidad de desarrollo. Todas ellas requieren de una amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro sistema, de una zona de ADN concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos o de un posterior análisis postamplificación más completo mediante restricción, hibridación o secuenciación. Como en toda técnica de amplificación genómica, hay diversos factores que influyen en su rendimiento final y que deberán tenerse en cuenta en el proceso de interpretación de los resultados obtenidos.

Elección de la secuencia diana que se va a amplificar

En las micobacterias existen regiones bien conservadas del ADN específicas de género, que flanquean regiones hipervariables específicas de especie. En la actualidad, las dianas mejor estudiadas son el gen *hsp65*, que codifica la proteína micobacteriana de 65 kDa (*heat shock*) y regiones genómicas de la subunidad ribosómica 16S. No obstante, existen más zonas útiles, como la región intergenética 16S-23S ribosomal y los elementos de inserción, entre otras muchas.

Preparación de la muestra

Aunque existe la interesante posibilidad de extraer el ADN directamente de la muestra clínica, lo cierto es que las técnicas de amplificación han demostrado funcionar mejor a partir de cultivos, sólidos o líquidos. En esta situación, la cantidad de ADN disponible es elevada y fácil de obtener, y no requiere una extracción cuidada y laboriosa, como en el caso del procedimiento de fenol-cloroformo; tan sólo es suficiente una lisis, en sus diferentes variedades, y se pueden incorporar en cualquier laboratorio diagnóstico. Dos métodos sencillos y prácticos son hervir

una suspensión de las colonias micobacterianas durante 20 min, o bien llevar a cabo una rotura mecánica de las células mediante ultrasonidos (sonicación).

Amplificación

En la actualidad, esta fase no supone ningún problema. Un gran número de laboratorios clínicos posee una mínima infraestructura para la realización de técnicas de amplificación de ácido nucleicos y están familiarizados con este tipo de técnicas. Las nuevas generaciones de termocicladores, que utilizan tubos de reacción de pared fina, consiguen amplificar en menos de 2 h. También es importante destacar que la realización de la PCR a partir de cultivos conlleva la obtención de una gran cantidad de ADN diana que impide, en gran medida, la contaminación potencial por los amplicones, a diferencia de la amplificación diagnóstica directa en muestras clínicas con un número bajo de microorganismos.

Análisis postamplificación

Existen diversas posibilidades, como se describe a continuación:

– *Observación directa de los fragmentos de amplificación.* Se trata de la forma más sencilla de constatar la presencia o la ausencia de una región genómica concreta, mediante la detección visual de un determinado fragmento de amplificación en un gel de agarosa, tras una electroforesis convencional. Esto ha demostrado ser muy útil para la diferenciación de las especies que componen el complejo *M. tuberculosis* y que no puede llevarse a cabo mediante otros métodos moleculares. De esta forma, se han diseñado algoritmos de identificación basados en la presencia o no de una regiones del genoma denominadas “regiones de diferencia” (RD). Aunque se han descrito 16 regiones, con la amplificación de RD1, RD9, RD10 y, en ocasiones, añadiendo RD3, RD5 y RD11, más la sensibilidad a la pirazinamida, se consigue la identificación de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *Mycobacterium africanum* tipos I y II, y *M. microti*¹⁴. En los casos que fuera necesario diferenciar entre *M. bovis* y *M. caprae*, se deberían seguir otras estrategias algo más laboriosas, que incluyen más regiones genómicas (p. ej., N-RD)¹⁵ o bien sistemas comerciales que implican una hibridación postamplificación (GenoType MTBC)¹⁶.

– *PCR-RFLP (hsp65).* Esta técnica, basada en la amplificación por PCR del gen *hsp65* y su posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante 2 enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*), consigue una identificación rápida (en una jornada laboral), precisa y económica de múltiples cepas micobacterianas en los laboratorios clínicos¹⁷. Aunque existen otras técnicas similares (p. ej., PCR-RFLP del 16S-23S), ésta es, actualmente, la más desarrollada, con una aplicación práctica de indudable valor. Además, la experiencia acumulada en numerosos centros¹⁸⁻²⁰, con una amplia relación de los polimorfismos encontrados en las distintas cepas analizadas, se expone en una página web (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>), donde se pueden consultar los diferentes patrones obtenidos y las identificaciones correspondientes. Gracias a todo ello, se conoce que la técnica es lo suficientemente discriminativa como para diferenciar las especies y las subespecies de los diversos complejos micobacterianos, e incluso entre

las especies consideradas clásicamente homogéneas, como es el caso de *M. kansasii*²¹. Sin embargo, en los últimos años se han descrito múltiples especies nuevas y numerosos patrones de restricción sin una clara correlación identificativa, que deberían reevaluarse y actualizarse.

– *Secuenciación (ADN) de la subunidad ribosomal 16S*. La secuenciación automática con iniciadores marcados con fluoresceína representa un avance sustancial, que soluciona la identificación de muchos microorganismos que, por métodos convencionales, es imposible. Esta técnica representa el patrón de referencia de las identificaciones genotípicas, y cuenta con diversas bases de datos de fácil y libre acceso: GenBank/Entrez (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) y Ridom 16S rDNA (<http://www.ridom.de/rdna/>)²². Aunque existen diversos trabajos que propugnan su aplicación en la práctica diaria²³⁻²⁵, continúa siendo un método caro y laborioso, que queda limitado a los laboratorios de referencia con el equipamiento y la experiencia necesarios. No obstante, los avances tecnológicos son constantes y la mayor automatización con los nuevos secuenciadores capilares o la aparición de microchips de secuenciación del ADN podrían suponer una alternativa potencial en el futuro próximo.

– *Hibridación en fase sólida*. Se trata de una tecnología en pleno auge, basada en sondas cortas de ADN específicas de especie y presentadas en formatos más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc.), y otros de muy próxima aplicación sistemática, como los chips o *arrays* de ADN. En una sola prueba, se aplicaría el producto de amplificación en diversas sondas de los microorganismos aislados con más frecuencia y con significación clínica.

En la actualidad, se dispone de 2 productos comerciales con tiras de nitrocelulosa: INNO-LiPA y GenoType. Ambos sistemas se basan en la amplificación de una zona genética concreta (espacio intergenético 16S-23S para el INNO-LiPA y el 23S rDNA para el GenoType). Posteriormente, se realiza la hibridación del producto de amplificación en las diferentes sondas dispuestas en una tira de nitrocelulosa, que son de fácil lectura e interpretación. En los estudios realizados se ha observado que ambos sistemas son muy similares, con una sensibilidad y una especificidad buenas, a partir de cultivos líquidos y sólidos, y los resultados se obtienen en 5-6 h²⁶⁻²⁹. Además de la variedad de especies que pueden identificarse en una sola prueba, otra ventaja de estos métodos es la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Ambos métodos identifican numerosas especies, con algunas diferencias.

En la tira del INNO-LiPA existen 16 sondas que permiten la detección del complejo *M. tuberculosis*, *M. kansasii* (subtipos I, II y III, para el resto más *M. gastri*), *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum/ulcerans*, *M. celatum*, complejo *M. avium*, *M. avium*, *M. intracellulare* (grupo 1 y 2), *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, complejo *M. chelonae* (grupo 1 y 2), complejo *M. fortuitum* y *M. smegmatis*.

El sistema GenoType incluye diversas tiras con diferentes niveles de identificación. Una primera para 14 especies: complejo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *Mycobacterium interjectum* y *M. mari-*

num/ulcerans. Si el aislamiento no fuese identificado, existe una segunda tira para 16 identificaciones, que aparte de repetir *M. kansasii* incluye: *M. simiae*, *M. mucogencium*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, y *M. shimoidei*. Además existe una tercera tira de GenoType para identificar las diferentes especies del complejo *M. tuberculosis*. En general, los principales inconvenientes de estos sistemas comerciales son su laboriosidad y su coste, aunque inicialmente el GenoType es algo más económico y versátil.

Por otro lado, los chips (*arrays*) de ADN son los formatos de hibridación en fase sólida con más futuro, por su gran disponibilidad y flexibilidad, tanto para la identificación de especies micobacterianas como para la sensibilidad a los antimicrobianos, analizando diversos mecanismos de resistencia. En la actualidad, existen disponibles modelos comercializados o que pueden diseñarse de forma autónoma o con asesoramiento técnico y que, de forma sencilla y rápida, permiten la realización de numerosas hibridaciones de forma simultánea³⁰⁻³³.

– *Amplificación y detección en tiempo real*. En los últimos años, se ha comenzado a utilizar, con fines diagnósticos, la tecnología de PCR en tiempo real. Estos métodos se basan en la realización simultánea de la amplificación de una zona diana concreta y su reconocimiento mediante hibridación que, a su vez, es detectada y cuantificada mediante el uso de diversos marcadores fluorogénicos. Las mayores ventajas residen en su rapidez (3 h) y las posibilidades futuras de aplicación para un amplio abanico de especies, así como la detección y la identificación directas a partir de muestras. En la actualidad, existen 2 grandes grupos en dependencia de que la fluorescencia sea inespecífica o específica. Por otra parte, se puede utilizar la PCR u otros métodos de amplificación, como el SDA (*strand displacement amplification*), basado en la amplificación por desplazamiento de cadenas de ADN y su posterior detección mediante la transferencia de energía fluorescente (ET). Entre los métodos más conocidos están el sistema BDProbeTec ET (el primer sistema comercial), las sondas LightCycler, Molecular Beacons y Taqman, y los cebadores Sunrise y Scorpion, entre otros. En general, tanto el BDProbeTec ET como los demás métodos se han focalizado, desde un principio, en el complejo *M. tuberculosis*, y a posteriori se ha producido un cierto desarrollo en la identificación de otras especies con importancia clínica³⁴⁻³⁷. Por ello, aún existe poca experiencia, aunque los datos obtenidos hasta ahora son prometedores; en un futuro puede suponer una alternativa real en la identificación micobacteriana.

Bibliografía

- Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R editores. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9ª ed. Madrid: SEIMC; 2005.
- Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. Clin Microbiol Rev. 2001;14:704-26.
- Glickman SE, Kilburn JO, Butler WR, Ramos LS. Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. J Clin Microbiol. 1994;32:740-5.

4. Kellogg JA, Bankert DA, Withers GS, Sweimler W, Kiehn TE, Pfyffer GE. Application of the Sherlock Mycobacteria Identification System using high-performance liquid chromatography in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001;39:964-70.
5. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994;13:961-79.
6. Carriere C, Riska PF, Zimhony O, Kriakov J, Bardarov S, Burns J, et al. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3232-9.
7. Jacobs WRJ, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science.* 1993;260:819-22.
8. Alcaide F, Gali N, Domínguez J, Berlanga P, Blanco S, Orus P, et al. Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2867-71.
9. Eltringham LJ, Wilson SM, Drobniewski FA. Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3528-32.
10. Gali N, Domínguez J, Blanco S, Prat C, Alcaide F, Coll P, et al. Use of a mycobacteriophage-based assay for rapid assessment of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to isoniazid and influence of resistance level on assay performance. *J Clin Microbiol.* 2006;44:201-5.
11. Mc Nerney R, Kambashi BS, Kinkese J, Tembwe R, Godfrey-Faussett P. Development of a bacteriophage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2115-20.
12. Kalantri S, Pai M, Pascopella L, Riley L, Reingold A. Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2005;5:59.
13. Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC Jr, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*: Phenotypic and genotypic identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press; 2003. p. 560-84.
14. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2339-45.
15. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis.* 2002;186:74-80.
16. Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2672-5.
17. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:175-8.
18. Da Silva Rocha A, Werneck Barreto AM, As Campos CE, Villas-Boas da Silva M, Fonseca L, Saad MH, et al. Novel allelic variants of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4191-6.
19. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2969-73.
20. Leao SC, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods.* 2005;61:193-9.
21. Alcaide F, Richter I, Bernasconi C, Springer B, Hagenau C, Schulze-Robbecke R, et al. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1959-64.
22. Harmsen D, Dostal S, Roth A, Niemann S, Rothganger J, Sammeth M, et al. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infect Dis.* 2003;3:26.
23. Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1010-5.
24. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1447-53.
25. Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Drede A, Kiekenbeck M, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2882-9.
26. Lebrun L, Gonullu N, Boutros N, Davoust A, Guibert M, Ingrand D, et al. Use of INNO-LIPA assay for rapid identification of mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;46:151-3.
27. Padilla E, González V, Manterola JM, Perez A, Quesada MD, Gordillo S, et al. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and genotype Mycobacterium assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3083-8.
28. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1769-75.
29. Suffys PN, Da Silva RA, De Oliveira M, Campos CE, Barreto AM, Portals F, et al. Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4477-82.
30. Fukushima M, Kakinuma K, Hayashi H, Nagai H, Ito K, Kawaguchi R. Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2605-15.
31. Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, Berno A, Small PM, Drobniewski F, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res.* 1998;8:435-48.
32. Park H, Jang H, Song E, Chang CL, Lee M, Jeong S, et al. Detection and genotyping of *Mycobacterium* species from clinical isolates and specimens by oligonucleotide array. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1782-8.
33. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarrenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol.* 1999;37:49-55.
34. Kramme S, Bretzel G, Panning M, Kawuma J, Drosten C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004;193:189-93.
35. Rondini S, Mensah-Quainoo E, Troll H, Bodmer T, Pluschke G. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4231-7.
36. Rusch-Gerdes S, Richter E. Clinical evaluation of the semiautomated BD-ProbeTec ET System for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;48:265-70.
37. Tobler NE, Pfunder M, Herzog K, Frey JE, Altwegg M. Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-Microarray. *J Microbiol Methods.* 2006;66:116-24.