

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Utilización de diferentes técnicas de biología molecular integradas en un algoritmo de identificación de micobacterias no tuberculosas

Óscar Esparcia ^{a,b,*}, Montserrat Español ^a, Montserrat Garrigó ^{a,b}, Carmen Moreno ^a, Michel Montemayor ^a, Ferran Navarro ^{a,b} y Pere Coll ^{a,b}

^a Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

^b Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de febrero de 2011

Aceptado el 16 de junio de 2011

On-line el 16 de septiembre de 2011

Palabras clave:

Gene 16S rRNA

AccuProbe

Mycobacterium avium complex

hsp65

RESUMEN

Introducción: El objetivo del presente trabajo fue demostrar la utilidad de un algoritmo de identificación de micobacterias no tuberculosas (MNT) que integra diferentes técnicas de biología molecular y características fenotípicas básicas. Además se ha realizado una actualización del algoritmo de interpretación del análisis del patrón de restricción de *hsp65* (PRA *hsp65*).

Métodos: La manera elegida de trabajar consistió en la identificación mediante hibridación con sondas de ADN seguido de PRA *hsp65* en aquellos aislados que no pudieron ser identificados mediante hibridación con sondas de ADN. En caso necesario se realizó secuenciación del 16S rDNA y *hsp65*.

Resultados: Se aislaron 236 MNT. De ellos, 102 (43,2%) aislados fueron identificados mediante hibridación con sondas de ADN y 76 (32,2%) mediante PRA *hsp65*. En los 58 (24,5%) aislados restantes se secuenció 16S rDNA, lo cual permitió la identificación de 53 (22,4%). Para 5 (2,1%) aislados se secuenció *hsp65* y permitió la identificación de un aislado más. Cuatro (1,7%) aislados no pudieron ser identificados. Tres nuevos patrones de PRA *hsp65* fueron encontrados. Siete aislamientos hibridaron con la sonda AccuProbe *Mycobacterium avium* complex Identification pero no lo hicieron con las sondas específicas de especie incluidas en el MAC. Cinco y 2 aislados fueron identificados como *M. intracellulare* y *Mycobacterium colombiense*, respectivamente.

Conclusión: Este esquema de trabajo nos permitió la identificación de casi todas las MNT encontradas en este estudio, incluyendo especies recientemente descritas.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Use of different PCR-based techniques integrated into a non-tuberculous identification algorithm

ABSTRACT

Keywords:

16S rRNA gene

AccuProbe

Mycobacterium avium complex

hsp65

Introduction: The aim of the present work was to demonstrate the utility of a non-tuberculous mycobacteria (NTM) identification algorithm, which integrates different PCR-based techniques and basic phenotypic features. Moreover, the algorithm for pattern restriction analysis of *hsp65* (*hsp65* PRA) interpretation has been updated.

Methods: The workflow chosen consisted of the identification by a DNA hybridization probe method, followed by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65* (*hsp65* PRA) in those isolates that cannot be identified by hybridization probes. If necessary, 16S rRNA gene and *hsp65* gene sequencing were used for speciation.

Results: A total of 236 NTM were collected, in which 102 (43.2%) isolates were identified by DNA specific probes and 76 (32.2%) isolates were identified with *hsp65* PRA. Partial sequencing of the 16S rRNA gene was used for species identification of the remaining 58 (24.5%) isolates. Fifty-three (22.4%) were identified using this method. Five isolates (2.1%) were submitted for partial sequencing of *hsp65* gene and

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: oscar.esparcia@marinasalud.es (Ó. Esparcia).

one isolate was identified with this method. Four strains (1.7%) could not be identified at species level. Three new PRA patterns were found. Seven isolates tested positive with the AccuProbe *Mycobacterium avium* complex identification test but did not test positive with the *M. avium* or *Mycobacterium intracellulare* specific probes. Five and two of these isolates were identified as *M. intracellulare* and *Mycobacterium colombiense*, respectively.

Conclusion: This approach allowed us to identify almost all NTM isolates found in this study, including some recently described species.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) cada vez son más reconocidas como patógenas en seres humanos¹. Los métodos fenotípicos para su identificación están bien establecidos y son económicos, pero tienen el inconveniente de que son tediosos y requieren personal especializado². La introducción, en las 2 últimas décadas, de distintas herramientas moleculares ha revolucionado el proceso de identificación al reducirse el tiempo necesario para llevarlo a cabo, además de ser imprescindibles para la caracterización de nuevas especies³. Los tests basados en la hibridación con sondas de ADN (AccuProbe, Gen-Probe) son rápidos, sensibles y fáciles de realizar pero cubren solo pocas especies. En 1989, Hance et al. propusieron un test basado en la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la proteína del shock térmico de 65 KDa (*hsp65*) para detectar e identificar micobacterias a partir de muestras clínicas⁴. Despues de éste, Telenti et al. desarrollaron un método basado en este gen para diferenciar micobacterias mediante el análisis del patrón de restricción (PRA)⁵. Desde entonces, este método ha sido utilizado por distintos autores^{6,7}, conduciendo a un algoritmo de identificación para 54 especies². Recientemente han sido descritos patrones adicionales^{8,9}. Los esquemas de trabajo basados en la secuenciación para detectar polimorfismos en el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (16S rDNA) han sido útiles para la identificación de MNT. De cualquier forma, hay poca variabilidad en el 16S rDNA en *Mycobacterium* spp., lo que hace a esta diana un pobre discriminador para especies muy relacionadas genéticamente como *Mycobacterium abcessus* y *Mycobacterium chelonae*¹⁰. El *hsp65* es más polimórfico que el 16S rDNA. Kapur et al. fueron los primeros en secuenciar *hsp65* para identificar micobacterias¹¹. Otros autores han demostrado la utilidad de la secuenciación parcial de *hsp65* para identificar MNT¹².

El esquema de trabajo elegido en nuestro laboratorio consiste en la identificación de *Mycobacterium* sp. mediante hibridación con sondas de ADN (AccuProbe), seguido de PRA *hsp65* en aquellos aislados que no pueden ser identificados mediante hibridación. Si el patrón obtenido no es concluyente utilizamos la secuenciación parcial de 16S rDNA y *hsp65* para llegar a una identificación definitiva.

El motivo del presente trabajo es describir los resultados obtenidos utilizando este algoritmo de identificación durante un periodo de 5 años. También hemos actualizado el algoritmo de identificación mediante *hsp65* PRA basado en su secuencia nucleotídica.

Métodos

Aislados de micobacterias no tuberculosas

En el Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona fueron recuperados 236 aislados clínicos de MNT durante el periodo 2002-2006. Solo se consideró un aislamiento por paciente. Los aislados fueron examinados al microscopio y subcultivados en medio de Löwenstein-Jensen para realizar los tests de velocidad de crecimiento, producción de pigmento y capacidad para crecer a diferentes temperaturas. La identificación mediante hibridación con sondas AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA, EE. UU.) de *Mycobacterium avium*

complex (MAC), *M. avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonaiae* se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda AccuProbe (MAC, *M. kansasii* y *M. gordonaiae*) fue elegida en función de las características fenotípicas. En caso de positividad para la sonda específica de MAC se procedió a la hibridación con las sondas específicas de *M. avium* y *M. intracellulare*. Este estudio no requirió aprobación por el comité ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído mediante Instagene matrix siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Glattbrugg, Suiza).

Análisis del patrón de restricción de *hsp65* (hsp65 PRA)

Un fragmento de *hsp65* fue amplificado y posteriormente digerido con *Bst*II y *Hae*III (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) como describió Telenti et al.⁵ con las siguientes modificaciones: 15 µl de la reacción de amplificación fue añadida a una mezcla que contenía 1 µl (10 U/µl) de enzima, 3 µl de tampón de restricción específico (10X) y 11 µl de agua destilada. Las mezclas fueron incubadas durante 120 min a 60 °C para la digestión con *Bst*II y a 37 °C para la digestión con *Hae*III. Los fragmentos obtenidos en la restricción fueron sometidos a electroforesis y los pesos de las bandas obtenidas fueron analizados con Bio Image System (Millipore, EE. UU.), con Marker VIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y un marcador de 25 pares de bases (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) como estándares de peso molecular. En la digestión de *Hae*III no se tuvieron en cuenta los fragmentos menores de 50 pb. Los patrones de PRA obtenidos fueron interpretados según el algoritmo publicado por Brunello et al.². Hemos utilizado este algoritmo debido a que los patrones de PRA obtenidos fueron validados mediante secuenciación.

Amplificación de 16S rDNA

La amplificación de 16S rDNA fue realizada utilizando iniciadores universales.

Secuenciación parcial de 16S rDNA (primeros 500 pares de bases) y *hsp65*

Los productos de PCR amplificados fueron purificados con High Pure PCR Product Purification Kit® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La secuenciación fue llevada a cabo en ambos sentidos con el método dideoxido con iniciadores fluorescentes (fmol DNA Cycle Sequencing System, Promega, Madison, EE. UU.) utilizando para ello un secuenciador de ADN (ALF, Pharmacia, Upsala, Suecia).

Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Además, las

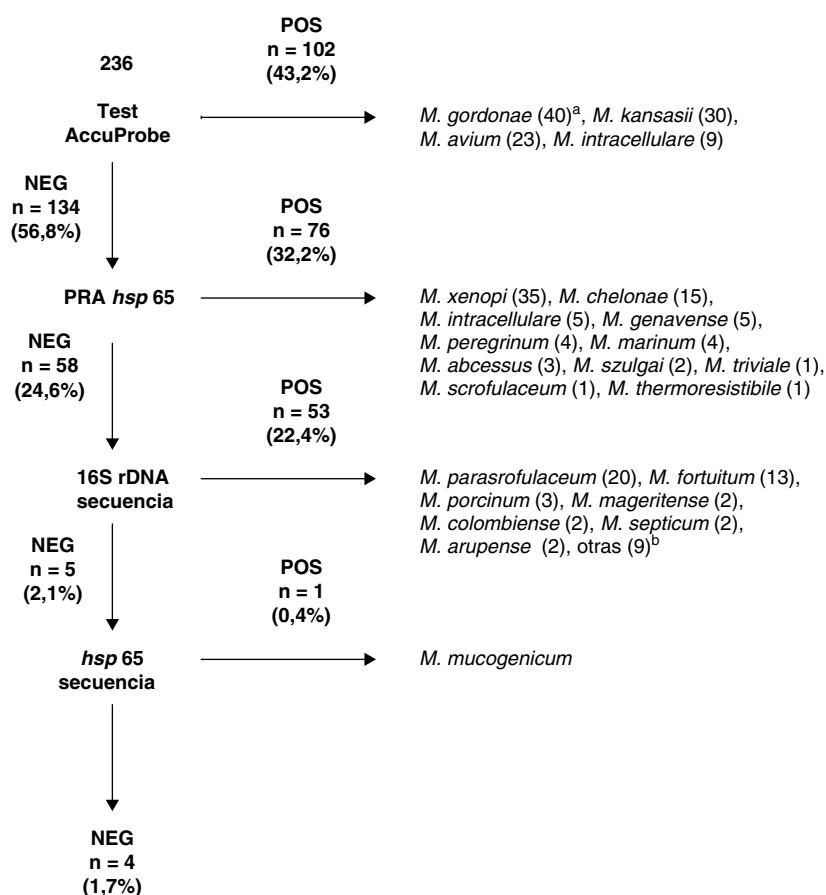


Figura 1. Resultados obtenidos con nuestro algoritmo de identificación de micobacterias no tuberculosas.

^aNúmero de aislados.

^bM. wolinskyi (1), M. alvei (1), M. lentiflavum (1), M. terrae (1), M. peregrinum (1), M. nonchromogenicum (1), M. celatum (1), M. kumamotoense (1) y M. sherrisii (1).

secuencias nucleotídicas de 16S rDNA fueron analizadas con la base de datos de Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.de>). Para los análisis de 16S rDNA y *hsp65*, la identificación de especie fue confirmada si la secuencia nucleotídica obtenida presentaba una homología $\geq 99,5\%$ ¹³ y $\geq 97\%$ ¹², respectivamente, con una secuencia depositada en las bases de datos públicas y publicada. El nuevo algoritmo basado en la secuenciación para interpretación del PRA *hsp65* fue realizado de la siguiente manera. Los patrones de PRA que no estaban incluidos en el algoritmo publicado por Brunello et al.² fueron calculados *in silico* a partir de secuencias de *hsp65* depositadas en GenBank con el programa LaserGene (DNASTAR 4.0, Madison, WI, EE. UU.). Los patrones de PRA estimados, basados en datos de la electroforesis, han sido incluidos cuando ninguna secuencia que correspondiera a ese patrón estaba depositada en GenBank. Algunos errores menores y cambios taxonómicos detectados en el algoritmo de Brunello et al.² fueron corregidos.

Números de acceso de las secuencias depositadas en GenBank

Las secuencias de *hsp65* únicas determinadas en el presente trabajo han sido depositadas en GenBank con los números de acceso EU732652, EU732653 y EU732654.

Resultados

Durante el periodo de estudio se aislaron 236 MNT. Fenotípicamente, 134 (56,7%) aislados correspondieron a crecedores lentos pigmentados (PSG), 54 (22,8%) a crecedores lentos no pigmentados y 48 (20,3%) a crecedores rápidos. Dentro del grupo de PSG,

100 (74,6%) aislados fueron escotocromógenos y 34 (25,4%) fueron fotocromógenos.

Los resultados obtenidos con nuestro algoritmo de identificación se muestran en la figura 1. Un total de 102 (43,2%) aislados fueron identificados mediante hibridación con sondas de ADN (AccuProbe). En 134 aislados (56,8%) se realizó PRA *hsp65*. Fueron identificados mediante esta técnica 76 (32,2%) aislados. La secuenciación de 16S rDNA se realizó para la identificación de especie de los 58 (24,5%) aislados restantes. Un total de 53 (22,4%) fueron identificados con este método. En los 5 aislados no identificados mediante secuenciación de 16S rDNA, se realizó secuenciación de *hsp65*, identificándose un aislado como *M. mucogenicum*. Finalmente, 4 aislados no pudieron ser identificados y, en función de sus secuencias únicas de 16S rDNA y *hsp65*, probablemente correspondan a taxones no descritos. No se realizaron pruebas bioquímicas o de HPLC para estos 4 aislados no identificados.

Un total de 7 aislados presentaban un resultado positivo para AccuProbe *M. avium complex* Identification Test pero no presentaban un resultado positivo con las sondas AccuProbe específicas de *M. avium* y *M. intracellulare*. Cinco de estos aislados fueron identificados mediante PRA como *M. intracellulare* pero los otros 2 aislados no presentaban un patrón de PRA incluido en el algoritmo de Brunello et al.². Estos 2 aislados fueron identificados mediante secuenciación de 16S rDNA como *Mycobacterium colombiense*.

Entre los 58 aislados que no pudieron ser identificados mediante *hsp65* PRA, 48 presentaban patrones que no estaban incluidos en el algoritmo propuesto por Brunello et al.². Estos aislados fueron identificados mediante secuenciación de 16S rDNA como *M. parasrofulaceum* (n = 20), *M. fortuitum* (n = 13), *M. mageritense* (n = 2), *M. colombiense* (n = 2), *M. arupense* (n = 2), *M. wolinskyi* (n = 1),

M. alvei (n = 1), *M. lentiflavum* (n = 1), *M. terrae* (n = 1), *M. peregrinum* (n = 1), *M. nonchromogenicum* (n = 1), *M. celatum* (n = 1), *M. kumamotoense* (n = 1) y *M. sherrisii* (n = 1). Cinco aislados presentaron un patrón de PRA específico de *M. porcinum* y *M. septicum*. Esta última especie no está incluida en el algoritmo de Brunello et al. pero es conocido que comparte el patrón de *hsp65* PRA con *M. porcinum*^{14,15}. Tres de estos 5 aislados fueron identificados con secuenciación de 16S rDNA como *M. porcinum* y 2 aislados como *M. septicum*.

Los 5 aislados restantes no pudieron ser identificados mediante secuenciación del 16S rDNA. Cuatro aislados presentaban menos de un 99,5% de homología con alguna secuencia depositada en las bases de datos públicas y un aislado presentó un 100% de homología con la secuencias correspondientes a *M. mucogenicum* (GenBank accession number AF480586) y *M. phocaicum* (GenBank accession number AY859682).

Desarrollo del nuevo algoritmo para interpretación de PRA *hsp65* basado en la secuencia

Tres nuevos patrones de PRA *hsp65* se encontraron en este estudio y fueron confirmados mediante secuenciación de *hsp65*. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con la secuencia de *hsp65* de *M. tuberculosis* (GenBank accession number M15467).

Una secuencia correspondió a un nuevo patrón (tipo II) de *M. alvei* (GenBank accession number EU732653), diferente del tipo I (CIP103464) debido a cambios en los lugares de restricción de *Hae*III (T₆₁₈→C y G₇₉₈→C). La secuenciación de *hsp65* demostró que *M. alvei* tipo II difería de *M. alvei* tipo I en 13 de 441 nucleótidos (96,9% de homología).

La segunda secuencia correspondió a un nuevo patrón (tipo VIII) de *M. terrae* (GenBank accession number EU732654), diferente del tipo I (ATCC15755) por cambios en los lugares de restricción de *Bst*EII (T₆₃₁→A) y *Hae*III (G₅₂₂→C, C₅₉₃→G, C₅₉₄→T y G₇₄₁→C). La secuenciación del amplicón demostró que *M. terrae* tipo VIII difería de *M. terrae* tipo I en 25 de 441 nucleótidos (94,3% de homología), de *M. terrae* tipo II en 32 nucleótidos (92,7% de homología), de *M. terrae* tipo III en 18 nucleótidos (95,9% de homología) y de *M. terrae* tipo IV en 24 nucleótidos (94,5% en homología).

Finalmente, la tercera secuencia correspondió a un nuevo patrón (tipo III) de *M. mageritense* (GenBank accession number EU732652) que difería de *M. mageritense* tipo I (CIP104973) debido a cambios en los sitios de restricción de *Hae*II (T₅₃₇→C y C₅₈₈→T). La secuenciación de *hsp65* mostró una diferencia de 11 de 441 nucleótidos (97,5% de homología) con *M. mageritense* tipo I y de 12 de 441 nucleótidos (97,2% de homología) con *M. mageritense* tipo II.

Todos los resultados obtenidos en este estudio junto con una actualización de observaciones previamente publicadas y el algoritmo publicado por Brunello et al.² han sido integradas en el algoritmo ilustrado en la tabla 1.

Discusión

Clásicamente, *Mycobacterium* spp. han sido identificadas con métodos fenotípicos. En las últimas 2 décadas, el desarrollo de herramientas basadas en la biología molecular ha llevado a profundas modificaciones en los métodos de identificación y en la clasificación taxonómica de este grupo. La introducción del sistema AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA) ha acelerado enormemente la identificación de algunas especies de *Mycobacterium*. Desarrollado para la identificación de *M. tuberculosis complex*, MAC, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*, es un ensayo simple y rápido. Consiste en una sonda única cuya elección puede ser orientada en función de la morfología al microscopio o las

características de la colonia. En nuestro estudio, AccuProbe fue capaz de identificar 102 de 236 (43,2%) aislados de MNT, resultados similares a los publicados por otros autores¹².

Siete aislados presentaron un resultado positivo con AccuProbe MAC Identification Test pero negativa para las sondas específicas de *M. avium* y *M. intracellulare*. Estudios recientes han llamado la atención acerca de la amplia diversidad de los aislados que pueden ser detectados dentro del MAC¹⁶.

La especie *M. colombiense* fue descrita en 2006 como un crecedor lento incluido en el MAC¹⁷ y ha sido asociada a enfermedad humana. En nuestro estudio encontramos 2 aislados de esta especie. Otras especies como *M. palustre* y *M. saskatchewanense* pueden ser confundidas con MAC debido a su positividad con AccuProbe MAC Identification Test aunque genéticamente están distantes del MAC¹⁶.

La identificación de micobacterias mediante PRA *hsp65* fue desarrollada por Telenti et al.⁵ y ha sido una práctica establecida desde 1993. Fueron identificados originalmente por Telenti et al. 33 patrones de PRA; después de esto, otros autores introdujeron patrones adicionales en el algoritmo publicado por estos autores^{7,18}. En 2001, Brunello et al. publicaron un algoritmo para la identificación mediante PRA *hsp65*, el cual incluyó 50 especies de micobacterias². Dado que se han descrito más de 130 especies y subespecies de micobacterias (J.P. Euzéby, List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature [<http://www.bacterio.cict.fr>]) hemos considerado necesaria una actualización de este procedimiento. Chimara et al.¹⁹ recientemente han publicado un nuevo algoritmo de identificación mediante PRA *hsp65*.

En nuestro estudio, nosotros identificamos 76 de 134 (56,7%) aislados con esta técnica. En varios estudios^{6,9,19} PRA *hsp65* identificaba cerca del 90% de las cepas evaluadas, aunque en ellos se incluían especies que pueden ser identificadas mediante sondas AccuProbe. Si se tiene como referencia el algoritmo publicado por Chimara et al.¹⁹ el número de aislados no identificados mediante PRA *hsp65* sería de 32 aislados, en vez de los 58 aislados para los que fue necesario realizar la secuenciación del 16S rDNA. Un total de 26 aislados sí presentaron un PRA *hsp65* incluido en el algoritmo publicado por Chimara et al.¹⁹. Estos aislados son *M. parascrofulaceum* (n = 7), *M. fortuitum* (n = 13), *M. wolinskyi* (n = 1), *M. nonchromogenicum* (n = 1), *M. celatum* (n = 1), *M. sherrisii* (n = 1), *M. kumamotoense* (n = 1) y *M. mucogenicum* (n = 1). No obstante, en el caso de *M. wolinskyi* (n = 1) según el algoritmo presentado en nuestro estudio comparte PRA *hsp65* con *M. fortuitum* ATCC19542². Una diferencia importante de nuestro algoritmo de *hsp65* PRA con el algoritmo propuesto por Chimara et al.¹⁹ es que el nuestro incluye los fragmentos 325/116 y 310/116, obtenidos tras digestión con *Bst*EII, que separamos por ser claramente diferentes (15 nt).

Distintos factores críticos deben ser considerados cuando se usa PRA *hsp65* como método de identificación de MNT. Uno es la pérdida de estandarización debido a las diferentes condiciones de electroforesis que son utilizadas. Esto causa diferencias en los patrones comunicados en la literatura científica. Además, esta metodología está afectada por la interpretación subjetiva si no se utiliza software para reconocer el patrón. Para evitar estas dificultades, nosotros utilizamos estrictas condiciones de electroforesis y software apropiado. Reconociendo las limitaciones del PRA *hsp65*, Kapur et al.¹¹ fueron los primeros en secuenciar el amplicón de *hsp65* generado con los iniciadores de Telenti como método de identificación de MNT. Desde entonces, otros autores han demostrado la utilidad de esta aproximación diagnóstica¹². La secuenciación de 441 pares de bases del *hsp65* permite la construcción de algoritmos basados en la secuencia. De cualquier forma, los patrones de bandas deducidos de la secuencia no reflejan exactamente los patrones de bandas observados en los geles de electroforesis. Además, algunas especies de *Mycobacterium* pueden compartir patrón de PRA o tienen diferencias de menos de 5 pb (tabla 1). Finalmente, nuevos

Tabla 1

Algoritmo de patrones de *hsp65* PRA basados en el análisis *in silico* del fragmento de Telenti de *hsp65*

Longitud de los fragmentos digeridos con <i>Bst</i> II (pb)	Longitud de los fragmentos digeridos con <i>Hae</i> III (pb) ^{a,b}	Especie ^b	Referencia
No digestión	197, 87, 58	<i>M. confluentis</i>	AJ310228
No digestión	184, 107	<i>M. gilvum</i>	AJ310236
No digestión	175, 87, 59	<i>M. gadium</i> CIP105388	AJ310233
No digestión	171, 87	<i>M. tusciae</i>	AJ307660
No digestión	168, 127	<i>M. triviale</i> DSM44153	AJ307659
No digestión	161, 87, 59, 58	<i>M. vaccae</i> CIP105934	AF547889
No digestión	(160), (85), (55)	<i>M. flavescentis</i> Type III	22
No digestión	(145), (130)	<i>M. simiae</i> Type V	22
No digestión	145, 127	<i>M. florentinum</i> DSM44852	DQ350162
No digestión	145, 127	<i>M. lentiiflavum</i> Type I CIP105465	AF547851
No digestión	145, 87, 59, 58, 52	<i>M. komossense</i> CIP105293	AY438649
No digestión	145, 87, 59, 58	<i>M. parafortuitum</i> CIP106802	AF547864
No digestión	145, 69, 58, 54	<i>M. brumae</i>	AJ310224
No digestión	139, 98, 58, 51	<i>M. holsaticum</i> DSM44478	AJ310469
No digestión	139, 87, 58	<i>M. flavescentis</i> Type II	DQ986499
No digestión	139, 58, 51	<i>M. flavescentis</i> CIP104533	AF547831
No digestión	139, 58, 51	<i>M. novocastrense</i> CIP105546	AF547862
No digestión	134, 127, 65	<i>M. duvalii</i> CIP104539	AJ310229
No digestión	127, 114, 70, 58	<i>M. aurum</i> Type II CIP 104465	AY438081
No digestión	127, 103, 69	<i>M. szulgai</i> CIP104532	AF547878
No digestión	127, 103, 59	<i>M. nebraskense</i> ATCCBAA-837	AY368457
325, 116	196, 69, 58, 54	<i>M. aichiense</i>	AJ310218
325, 116	185, 145	<i>M. fallax</i> CIP81.39	AF547829
325, 116	181, 127	<i>M. terrae</i> Type I CIP104321	AF547879
325, 116	161, 123, 58	<i>M. rhodesiae</i> CIP106806	AF547870
325, 116	(145), (130)	<i>M. lentiiflavum</i> Type II	22
325, 116	(145), (130)	<i>M. simiae</i> Type IV	22
325, 116	145, 127, 59	<i>M. montefiorensense</i> ATCCBAA-256	AY027785
325, 116	145, 127, 51	<i>M. triplex</i> CIP106108	AF547882
325, 116	(145), (115), (70)	<i>M. terrae</i> Type V	8
325, 116	145, 65, 59, 58	<i>M. mucogenicum</i> Type IV	23
325, 116	145, 65, 59, 58	<i>M. phocaicum</i> Type III	23
325, 116	145, 58	<i>M. arupense</i> Type I ATCCBAA-1242	DQ168662
325, 116	145	<i>M. cookii</i> CIP105396	AF547824
325, 116	(140), (85), (60)	<i>M. terrae</i> Type VII	24
325, 116	139, 94, 58	<i>M. nonchromogenicum</i> Type II	AJ307639
325, 116	139, 87, 58	<i>M. chitae</i>	AJ310227
325, 116	139, 65, 58	<i>M. mucogenicum</i> Type V	24
325, 116	139, 58	<i>M. terrae</i> Type III	AY550212
325, 116	(130), (110), (70), (60)	<i>M. gordonae</i> Type VIII	22
325, 116	(130), (95), (75), (60)	<i>M. kansasii</i> Type V	22
325, 116	127, 112, 70, 59	<i>M. gordonae</i> Type IV	AJ310239
325, 116	127, 112, 69	<i>M. kumamotonense</i>	AB239920
325, 116	127, 103	<i>M. genavense</i>	AJ310235
310, 131	197, 60, 58, 54	<i>M. chelonae</i>	AJ310226
310, 131	197, 60, 58, 54	<i>M. salmoniphilum</i> ATCC13758	DQ866777
310, 131	175, 87, 58	<i>M. sphagni</i> DSM44076	AJ307665
310, 131	161, 123, 58	<i>M. madagascariense</i> CIP104538	AF547852
310, 131	160, 112, 111	<i>M. haemophilum</i>	AJ307630
310, 131	145, 69, 58, 54	<i>M. immunogenum</i> CIP106684	AY458081
310, 131	139, 134, 51	<i>M. elephantis</i> Type I CIP106831	AF547828
310, 131	139, 134, 51	<i>M. pulveris</i>	AF547869
310, 131	(140), (100), (60)	<i>M. elephantis</i> Type II	25
310, 131	139, 94, 78	<i>M. canariasense</i> CIP 107998	AY255477
310, 131	139, 94, 78	<i>M. cosmeticum</i> ATCC BAA-878	AY449731
310, 131	139, 65, 58	<i>M. mucogenicum</i> TypeI ATCC49650	14
310, 131	127, 114, 58	<i>M. botniense</i> DSM44537	AF547812
310, 131	127, 94, 78	<i>M. latus</i> DSM44577	AY438090
310, 116	244, 139	<i>M. fluoranthenivorans</i> DSM44556	DQ350157
310, 116	181, 161	<i>M. fredericksbergense</i> DSM44346	AF547834
310, 116	181, 139	<i>M. terrae</i> Type II	AY550211
310, 116	172, 139	<i>M. neocaurum</i> CIP105387	AF547860
310, 116	146, 139, 58	<i>M. diermhoferi</i> CIP105384	AF547825
310, 116	145, 78, 58	<i>M. augbanense</i> CIP 108543	AY859677
310, 116	145, 65, 58	<i>M. phocaicum</i> CIP108542 Type I	AY859676
310, 116	145, 65, 58	<i>M. mucogenicum</i> TypeII CIP105223	24
310, 116	139, 87, 58	<i>M. mucogenicum</i> Type III	23
310, 116	139, 87, 58	<i>M. phocaicum</i> Type II	23
310, 116	139, 65, 58	<i>M. phocaicum</i> Type IV	23
231, 210	223, 106	<i>M. shottii</i> ATCC700981	AY550225
231, 210	197, 87, 58	<i>M. moriokaense</i> CIP105393	AF547857
231, 210	197, 69, 58	<i>M. bolletii</i> CIP 108541	AY859675
231, 210	197, 69, 58	<i>M. massiliense</i> CCUG 48898	AY596465
231, 210	(190), (105), (80)	<i>M. ulcerans</i> Type II	7
231, 210	188, 126	<i>M. simiae</i> Type I	AJ307652

Tabla 1 (Continuación)

Longitud de los fragmentos digeridos con <i>Bst</i> II (pb)	Longitud de los fragmentos digeridos con <i>Hae</i> III (pb) ^{a,b}	Especie ^b	Referencia
231, 210	(185), (130)	<i>M. genavense</i> Type II ATCC51233	22
231, 210	178, 134, 72, 51	<i>M. thermoresistibile</i> CIP105390	AF547880
231, 210	178, 98, 51	<i>M. hassiacum</i> CIP105218	AF547842
231, 210	162, 94, 51	<i>M. poriferae</i>	AJ307645
231, 210	161, 58, 51	<i>M. austroafricanum</i> CIP 105395	AF547807
231, 210	161, 58, 51	<i>M. vanbaalenii</i> DSM7251	AY438091
231, 210	(155), (140)	<i>M. simiae</i> Type II	7
231, 210	146, 139, 98, 52	<i>M. peregrinum</i> Type I CIP105382	AF547865
231, 210	145, 139, 75	<i>M. parascrofulaceum</i> Type V	AY337278
231, 210	(145), (130), (60)	<i>M. parvum</i> CIP107385	22
231, 210	(145), (130)	<i>M. seoulense</i> DSM44998	22
231, 210	(145), (130)	<i>M. intracellularare</i> Type III	22
231, 210	145, 129, 127	<i>M. intermedium</i> CIP104542	AF547847
231, 210	145, 127, 95	<i>M. scrofulaceum</i> Type I	AJ307648
231, 210	145, 127	<i>M. saskatchewanense</i> ATCCBAA-544	AY208859
231, 210	145, 127	<i>M. simiae</i> Type VI	AY550224
231, 210	145, 127	<i>M. avium</i> Type III	AF126033
231, 210	145, 127	<i>M. interjectum</i> Type I	AJ307632
231, 210	145, 106, 78	<i>M. ulcerans</i> CIP105425	AF547888
231, 210	145, 106, 78	<i>M. pseudoshottsii</i> ATCCBAA-883	AY550226
231, 210	145, 106, 78	<i>M. marinum</i>	AJ307636
231, 210	145, 106	<i>M. boemicum</i> CIP 105811	AF547811
231, 210	(145), (105), (80)	<i>M. malmoense</i> Type II	22
231, 210	145, 69, 58, 52	<i>M. abscessus</i>	AJ310215
231, 210	(140), (125), (60), (50)	<i>M. senegalense</i> Type III ATCC35796	22
231, 210	(140), (105), (80)	<i>M. intracellularare</i> Type II	22
231, 210	140, 81, 58, 51	<i>M. phlei</i> CIP105389	AF547866
231, 210	139, 123, 98, 52	<i>M. peregrinum</i> Type II	AY379072
231, 210	139, 123, 98, 52	<i>M. septicum</i> ATCC700731	15
231, 210	139, 123, 98, 52	<i>M. porcinum</i> ATCC33776	15
231, 210	139, 123, 58, 52	<i>M. boenickei</i> CIP107829	AY943175
231, 210	139, 112, 69	<i>M. terrae</i> Type IV	19
231, 210	139, 103, 58	<i>M. kubicae</i> CIP106428	AF547850
231, 210	139, 103	<i>M. conspicuum</i> CIP105165	AF547823
231, 210	139, 87, 59, 58	<i>M. chubense</i> CIP106810	AF547821
231, 210	139, 87, 58	<i>M. chlorophenolicum</i> CIP104189	AF547820
231, 210	139, 87, 58	<i>M. obuense</i>	AJ307640
231, 210	127, 112, 95	<i>M. intracellularare</i> Type V	26
231, 210	127, 112	<i>M. gordonaiae</i> Type V	27
231, 210	127, 112	<i>M. interjectum</i> Type II	AY550236
231, 210	127, 112	<i>M. heidelbergense</i> CIP105424	AF547844
231, 210	127, 103, 78	<i>M. kansasii</i> Type I CIP104589	AF547849
231, 210	127, 103, 78	<i>M. branderri</i> CIP104592	AJ310223
231, 210	127, 103, 59	<i>M. avium</i> Type II	AF126032
231, 210	127, 103	<i>M. avium</i> Type I ATCC25291	DQ284768
231, 210	127, 103	<i>M. colombiense</i> CIP108962	AM062765
231, 210	127, 94, 81, 78	<i>M. parascrofulaceum</i> Type III	AY337276
231, 210	127, 94	<i>M. palustre</i> DSM44572	AY943200
231, 210	127, 78, 58	<i>M. celatum</i> Type I CIP106109	AF547817
231, 210	(120), (115), (110)	<i>M. intracellularare</i> Type IV	22
231, 210	112, 106	<i>M. asiaticum</i> DSM44297	AF547806
231, 131, 79	181, 161	<i>M. doricum</i> DSM44852	AF547826
231, 131, 79	(175), (80)	<i>M. aurum</i> Type I	7
231, 131, 79	161, 145, 59	<i>M. agri</i>	AJ310217
231, 131, 79	161, 87, 58	<i>M. monacense</i>	DQ381730
231, 131, 79	146, 145, 98, 52	<i>M. alvei</i> CIP103464	AF547805
231, 131, 79	146, 139, 98, 58	<i>M. peregrinum</i> Type III	DQ986500
231, 131, 79	145, 127	<i>M. simiae</i> Type III	AF247569
231, 131, 79	145, 123, 58, 52	<i>M. mageritense</i> Type I CIP104973	AF547853
231, 131, 79	145, 123, 58, 52	<i>M. alvei</i> Type II	Our study
231, 131, 79	145, 123, 58	<i>M. smegmatis</i> CIP104444	AF547876
231, 131, 79	145, 123, 58	<i>M. goodii</i> ATCC700504	AY458071
231, 131, 79	145, 123, 58	<i>M. mageritense</i> Type II	DQ184958
231, 131, 79	145, 81, 58	<i>M. murale</i> CIP105980	AF547859
231, 131, 79	139, 81, 58	<i>M. tokaiense</i> CIP106807	AF547881
231, 131, 79	(140), (85)	<i>M. wolinskyi</i> Type II	28
231, 131, 79	(140), (120), (95)	<i>M. gordonaiae</i> Type VI	7
231, 131, 79	139, 103, 69	<i>M. shimoidei</i> DSM44152	AJ307650
231, 131, 79	139, 123, 98, 52	<i>M. senegalense</i> Type II	AY684049
231, 131, 79	139, 123, 59	<i>M. fortuitum</i> Type II ATCC19542	AJ310232
231, 131, 79	139, 123, 58	<i>M. wolinskyi</i> Type I ATCC700010	AY458064
231, 131, 79	139, 87, 58	<i>M. mageritense</i> Type III	Our study
231, 131, 79	139, 81, 58	<i>M. hodleri</i> CIP104909	AF547845
231, 131, 79	(130), (105), (80)	<i>M. celatum</i> Type II ATCC51130	22
231, 131, 79	(130), (95), (70)	<i>M. kansasii</i> Type III	22

Tabla 1 (Continuación)

Longitud de los fragmentos digeridos con <i>Bsr</i> II (pb)	Longitud de los fragmentos digeridos con <i>Hae</i> III (pb) ^{a,b}	Especie ^b	Referencia
231, 131, 79	127, 103, 101	<i>M. kansasii</i> Type II	AY438086
231, 131, 79	127, 103, 69	<i>M. gastri</i>	AJ310234
231, 131, 79	127, 103, 69	<i>M. kansasii</i> Type VI	AY550233
231, 131, 79	127, 94	<i>M. parascrofulaceum</i> Type IV	AY337277
231, 116, 94	161, 112, 59	<i>M. gordonaee</i> Type IX	AM398452
231, 116, 94	161, 103, 59	<i>M. heckeshornense</i> DSM44428	AF547843
231, 116, 94	(155), (110)	<i>M. gordonaee</i> Type VII	6
231, 116, 94	(145), (130)	<i>M. lentiiflavum</i> Type III	24
231, 116, 94	145, 127, 59	<i>M. chimaera</i> CIP107892	AY943198
231, 116, 94	145, 127, 57	<i>M. intracellulare</i> Type I	AJ307633
231, 116, 94	145, 127	<i>M. scrofulaceum</i> Type III	9
231, 116, 94	145, 105, 78	<i>M. malmoense</i>	AJ307635
231, 116, 94	(145), (70), (60)	<i>M. terrae</i> Type VI	8
231, 116, 94	(140), (125), (100)	<i>M. brisbanense</i> CIP107830	29
231, 116, 94	139, 123, 58	<i>M. terrae</i> Type VIII	Our study
231, 116, 94	139, 58	<i>M. hiberniae</i>	AJ307631
231, 116, 94	127, 112, 95	<i>M. gordonaee</i> Type X	19
231, 116, 94	127, 112	<i>M. gordonaee</i> tipo III	AJ310238
231, 116, 94	127, 94, 59, 51	<i>M. intracellulare</i> Type VI	AY536637
231, 116, 79	210, 115	<i>M. gordonaee</i> Type II	2
231, 116, 79	181, 139, 52	<i>M. senegalense</i> Type IV ATCC35796	AY684045
231, 116, 79	161, 112, 57	<i>M. gordonaee</i> Type I	AJ310237
231, 116, 79	161, 104, 59	<i>M. xenopi</i>	AJ307661
231, 116, 79	152, 127, 69	<i>M. tuberculosis</i> complex	2
231, 116, 79	145, 123, 58, 52	<i>M. fortuitum</i> Type I ATCC6841	AY458072
231, 116, 79	145, 127	<i>M. sherrisii</i> ATCCBAA-832	DQ523524
231, 116, 79	145, 58, 54	<i>M. nonchromogenicum</i> Type I DSM44164	24
231, 116, 79	141, 123, 58, 52	<i>M. farcinogenes</i>	AJ310231
231, 116, 79	139, 123, 58, 52	<i>M. conceptionense</i> CIP108544	AY859678
231, 116, 79	139, 123, 58, 52	<i>M. houstonense</i> ATCC49403	AY458077
231, 116, 79	139, 123, 58, 52	<i>M. neworleansense</i> ATCC49404	AY496143
231, 116, 79	139, 123, 58, 52	<i>M. senegalense</i> Type I CIP104971	AF547872
231, 116, 79	139, 94	<i>M. parascrofulaceum</i> Type I	AY337275
231, 116, 79	(135), (90), (85)	<i>M. fortuitum</i> type III	6
231, 116, 79	(130), (115), (75), (60)	<i>M. kansasii</i> Type IV	30
231, 116, 79	(130), (95)	<i>M. lentiiflavum</i> Type IV	22
231, 116, 79	127, 94	<i>M. parascrofulaceum</i> Type II ATCCBAA-614	AY337274
231, 116, 79	(125), (95)	<i>M. scrofulaceum</i> Type II	8

^a Los patrones en paréntesis son estimados ya que ninguna secuencia correspondiente a ese patrón ha sido publicada.

^b Las especies y patrones en gris presentan patrones compartidos o diferencias de menos de 5 pares de bases. Los patrones en negrita son nuevos patrones encontrados en este estudio.

patrones para nuevas especies o especies conocidas son descritos con frecuencia. Aunque tales patrones nuevos, si son fácilmente reconocidos², no deberían ser un inconveniente para esta metodología, sí que es verdad que requiere una actualización constante. En nuestro trabajo, 3 aislados presentaban patrones de PRA *hsp65* que no coincidían con alguno previamente descrito. Esta circunstancia también ha pasado en otros estudios^{6,8,9}.

El algoritmo de patrones de cepas de referencia calculados *in silico* a partir de las secuencias depositadas en las bases de datos creemos que es útil porque refleja la realidad mejor que los algoritmos comunicados con patrones estimados, aunque el PRA *hsp65* es una estimación, no una secuenciación.

El gen más ampliamente utilizado en identificación bacteriana es el 16S rDNA y es considerado el *gold standard*¹⁰. Su utilización ha contribuido a la descripción de nuevas especies de MNT en los últimos años¹⁰. Sin embargo, como existe poca variabilidad dentro del 16S rDNA del género *Mycobacterium*, no permite diferenciar especies cercanamente relacionadas como *M. chelonae* o *M. abcessus*¹⁰.

La secuenciación parcial de 16S rDNA nos ha permitido identificar un total de 53 (22,4%) aislados, incluyendo algunas especies recientemente descritas como *M. sherrisii*, *M. kumamotoense* y *M. arupense*. Destaca la elevada frecuencia con la que aislamos *M. parascrofulaceum*. Esta especie fue descrita en 2004²⁰ como un crecedor lento escotocromógeno relacionado con *M. simiae*. Trece aislados fueron identificados como *M. fortuitum* mediante secuenciación del 16S rDNA. Todos presentaron un patrón de PRA *hsp65* que corresponde a *M. fortuitum* tipo I. Este

patrón no está incluido en el algoritmo publicado por Brunello et al.².

Nosotros encontramos 5 de 58 aislados (8,6%) que no pudieron ser identificados mediante secuenciación de 16S rDNA. Uno de ellos fue identificado como *M. mucogenicum* mediante secuenciación de *hsp65*. Finalmente, 4 aislados (1,7%) no pudieron ser identificados y podrían corresponder a nuevos taxones, en función de sus secuencias únicas de 16S rDNA y *hsp65*. Otros autores²¹ han comunicado resultados similares.

Actualmente ninguna técnica de biología molecular es capaz de identificar el 100% de los aislados de *Mycobacterium* sp. La técnica de HPLC se encuentra en laboratorios de referencia y requiere personal muy especializado. La secuenciación parcial del 16S rDNA se ha convertido en la actual prueba de referencia «práctica» para la identificación de especie (la prueba de referencia real para la identificación de especie es el estudio de reasociación de ADN o hibridación ADN-ADN). El problema de este gen para *Mycobacterium* sp. es que presenta poca variabilidad para este género (el punto de corte para el diagnóstico de especie está fijado en 99,5% de homología, frente al 99% general para otras especies bacterianas), de ahí que se utilicen otros genes como *hsp65* o *rpoB*, los cuales presentan más variabilidad que el 16S rDNA. Las inmunocromatografías de membrana, como GenoType® CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania), si bien son fáciles y rápidas de realizar, sólo identifican 30 especies (o complejos, como *M. tuberculosis* complex). Además, en ocasiones, son necesarias 2 hibridaciones, ya que GenoType CM identifica 12 especies, un complejo (*M. tuberculosis*

complex) y *M. marinum/ulcerans*; GenoType AS permite la identificación de 16 especies. En nuestro estudio un total de 42 cepas no hubieran podido ser identificadas mediante esta técnica y necesitarían otra técnica de identificación. Estas especies serían *M. triviale* (n = 1), *M. thermoresistibile* (n = 1), *M. parascrofulaceum* (n = 20), *M. porcinum* (n = 3), *M. mageritense* (n = 2), *M. colombiense* (n = 2), *M. septicum* (n = 2), *M. arupense* (n = 2), *M. alvei* (n = 1), *M. terrae* (n = 1), *M. nonchromogenicum* (n = 1), *M. kumamotonense* (n = 1), *M. sherrisii* (n = 1) y *Mycobacterium* sp. (probables taxones no descritos) (n = 4).

La identificación correcta de MNT clínicamente relevantes es esencial para establecer un sistema taxonómico detallado y su rápida identificación está llegando a ser cada vez más importante para el buen cuidado del paciente. Nosotros integramos diferentes técnicas de biología molecular como AccuProbe, PRA *hsp65* y secuenciación de 16S rDNA y *hsp65*, junto a características fenotípicas básicas en un algoritmo de identificación de MNT. Este algoritmo nos permitió identificar casi todas las MNT aisladas en este estudio, incluyendo algunas especies recientemente descritas. En el presente trabajo hemos actualizado el algoritmo para interpretación del PRA *hsp65*.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este estudio ha sido parcialmente financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, el Instituto de Salud Carlos III-Feder y la Red Española de Investigación en Patología Infectiosa (REIPI C03/14 y RD06/0008/0013).

Bibliografía

- Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1992;5:1-25.
- Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2799-806.
- Selvarangan R, Wu WK, Nguyen TT, Carlson LD, Wallis CK, Stiglich SK, et al. Characterization of a novel group of mycobacteria and proposal of *Mycobacterium sherrisii* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2004;42:52-9.
- Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frébault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol*. 1989;3:843-9.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger 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.
- Da Silva Rocha A, Da Costa Leite C, Torres HM, De Miranda AB, Pires Lopes MQ, Degrave WM, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J Microbiol Methods*. 1999;37:223-9.
- 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.
- Da Silva Rocha A, Werneck Barreto AM, Dias Campos CE, Villas-Bôas da Silva M, Fonseca L, Saad MH, et al. Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4191-6.
- Häfner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol Cell Probes*. 2004;18:59-65.
- Clarridge 3rd JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:840-62.
- Kapur V, Kanjilal S, Hamrick MR, Li LL, Whittam TS, Sawyer SA, et al. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 1995;119:131-8.
- McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3000-11.
- Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2761-4.
- Adekambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:2095-105.
- Wallace Jr RJ, Brown-Elliott BA, Wilson RW, Mann L, Hall L, Zhang Y, et al. Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5689-97.
- Turenne CY, Wallace Jr RJ, Behr MA. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:205-29.
- Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E, Garcia MJ. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:2049-54.
- Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol*. 1997;35:79-85.
- Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiol*. 2008;8:e48.
- Turenne CY, Cook VJ, Burdz TV, Pauls RJ, Thibert L, Wolfe JN, et al. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:1543-51.
- Tortoli E, Bartoloni A, Böttger EC, Emmer S, Garzelli C, Magliano E, et al. Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. *J Clin Microbiol*. 2001;39:4058-65.
- PRASITE: Identification of Mycobacteria. [<http://app.chuv.ch/prasite>].
- Cooksey RC, Jhung MA, Yakrus MA, Butler WR, Adékambi T, Morlock GP, et al. Multiphasic approach reveals genetic diversity of environmental and patient isolates of *Mycobacterium mucogenicum* and *Mycobacterium phocaicum* associated with an outbreak of bacteremias at a Texas hospital. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:2480-7.
- Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois JP. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:293-302.
- Turenne C, Chedore P, Wolfe J, Jamieson F, May K, Kabani A. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium elephantis* from human specimens. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1230-6.
- Smole SC, McAleese F, Ngampasutadol J, Von Reyn CF, Arbeit RD. Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3374-80.
- Cooksey RC, de Waard JH, Yakrus MA, Rivera I, Chopite M, Toney SR, et al. *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:2385-91.
- Brown BA, Springer B, Steingrube VA, Wilson RW, Pfyffer GE, Garcia MJ, et al. *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1999;49:1493-511.
- Schinsky MF, Morey RE, Steigerwalt AG, Douglas MP, Wilson RW, Floyd MM, et al. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenkei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:1653-67.
- Jiménez-Pajares MS, Herrera L, Valverde A, Saiz P, Sáez-Nieto JA. Phenotypic and genotypic characteristics of *Mycobacterium kansasi* strains isolated in Spain (2000-2003). *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2005;23:254-8.