



Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas

Sergio L. Yzquierdo S., Liliam Mederos C., Alexis Díaz G., Miguel Echemendía F. y Ernesto Montoro C.

Application of PCR-RFLP in the diagnosis of non-tuberculous mycobacteria

The amplification of a fragment from *hsp65* gene by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with *Bst*EII and *Hae*III restriction enzymes has demonstrated to be very useful for identification of Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM). The biochemical tests as well as the PCR-RFLP were carried out in 13 reference strains and 46 strains received in the laboratory. The results by biochemical tests were available in 4-6 weeks whereas the PCR-RFLP only required 48 hours. In both methods, *Mycobacterium intracellulare*, *M. kansasii* and *M. fortuitum* were the most frequently detected species. The PCR-RFLP method is fast, cheap and simple. Its application in Reference Laboratories could be very useful for diagnosis of NTM.

Key words: Non-tuberculous mycobacteria, polymerase chain reaction, restriction fragments length polymorphism, biochemical test.

Palabras claves: Micobacterias no tuberculosas, reacción de polimersa en cadena, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, pruebas bioquímicas.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). La Habana, Cuba

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigación de Micobacterias y Tuberculosis

Este trabajo fue financiado por el proyecto INCO-Acción Concertada Improve Diagnosis and Drug Resistance Detection in Latin America, ICA4-CT-2001-10087.

Recibido: 25 abril 2007

Aceptado: 13 agosto 2007

Correspondencia a:

Ernesto Montoro Cardoso
emontoro@ipk.sld.cu

Introducción

En 1882, Robert Koch dio a conocer al mundo al bacilo *Mycobacterium tuberculosis* como el agente causal de la tuberculosis (TBC). Sin embargo, se sabe actualmente que existen más de 100 especies dentro del género *Mycobacterium* con características fenotípicas y bioquímicas bien disímiles a las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*¹. Estos bacilos "atípicos", conocidos como micobacterias no tuberculosas (MNT), son de gran importancia clínica en pacientes inmunocomprometidos. La detección rápida y eficaz de estas micobacterias resulta crucial para la adopción de una correcta terapia específica en los pacientes, permitiendo su pronta recuperación y evitando una posible diseminación de la enfermedad^{2,3}.

Por tal motivo, numerosos métodos han sido diseñados para el diagnóstico de las MNT. En ellos se trata de lograr una identificación precisa de las mismas, para poder aplicar un tratamiento eficaz en los pacientes, ya que estas especies poseen diferentes patrones de susceptibilidad frente a los fármacos antituberculosos^{2,3}.

Muchos laboratorios de referencia realizan la identificación de especies micobacterianas por análisis de las características fenotípicas y bioquímicas, las cuales resultan en ocasiones laboriosas y demoran de 3 a 6 semanas en obtener los resultados⁴.

Los métodos basados en el análisis lipídico, tales como la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía de capa delgada y la cromatografía de gas líquido, han sido aplicados en la identificación de especies micobacterianas. Estos procedimientos suelen ser engorrosos, no son lo suficientemente discriminativos y caros, sólo accesibles para algunos laboratorios clínicos⁵⁻⁸. Las técnicas serológicas pueden ser de gran utilidad en determinadas ocasiones pero, tanto su especificidad como sensibilidad son insatisfactorias⁹.

Las pruebas comerciales Accuprobe® (Gen-Probe, Inc., San Diego, California, EUA) e INNO-LiPA (Mycobacteria, Immunogenetics, Bélgica) son muy confiables pero extremadamente costosas para países de bajos recursos y no aplicables para toda la gama de especies micobacterianas⁶.

Hance y cols, reportaron en 1989 la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de estrés térmico de peso molecular 65 kDa (*hsp65*), el cual acoplado con pruebas específicas para especies permitía la identificación de micobacterias provenientes de muestras clínicas. Posteriormente, Plikaytis y cols en 1992 y Telenti y cols en 1993, perfeccionaron el método mediante la amplificación de dicho fragmento por RPC seguido del análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) originados por la acción de las enzimas *Bst*EII y *Hae*III¹⁰⁻¹².



En el presente trabajo se aplicó la RPC-PLFR como una herramienta rápida en el diagnóstico rápido de MNT en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigación de Micobacterias y Tuberculosis del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (LNRTB-IPK).

Material y Método

Cepas. Se estudiaron trece cepas de referencias correspondientes a 12 especies de micobacterias y pertenecientes a la colección del LNRTB-IPK: *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 609), *Mycobacterium fortuitum* (Denver Smith 6196), *Mycobacterium avium* (ATCC 25291), *Mycobacterium peregrinum* (TMC 1547, Turtle), *Mycobacterium gastri* (TMC 1456), *Mycobacterium nonchromogenicum* (ATCC 19350), *Mycobacterium scrofulaceum* (ATCC 19981) *Mycobacterium intracellulare* (serotipo 18, Denver 6450-204), *Mycobacterium flavescens* (Denver 2611), *Mycobacterium kansasii* (Denver-Cape 17), *Mycobacterium simiae* I (Denver 1595), *Mycobacterium simiae* II (Denver w-55) y *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v (ATCC 35838).

Así mismo, se estudiaron 46 MNT aislados en pacientes inmunocomprometidos (8) y portadores del virus de inmunodeficiencia humana (30). De los 38 pacientes, 26 manifestaban síntomas de una enfermedad pulmonar, en su mayoría tos crónica, acompañada en ocasiones de pérdida de peso, fatiga, debilidad y fiebre. En los restantes 12 pacientes, las muestras fueron obtenidas por exudados o biopsias. Todas las muestras fueron colectadas por el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de La Habana, en el período comprendido entre enero de 2005 y abril de 2006 e identificadas por el LNRTB - IPK en septiembre del propio año.

Pruebas bioquímicas. A las 46 cepas recibidas en el laboratorio se les realizó una batería de pruebas fenotípicas y bioquímicas según la metodología descrita por Vestal¹³ así como Kent y cols¹⁴, incluyendo: crecimiento a 25, 37 y 45 °C; evaluación de producción de pigmentos; crecimiento en presencia de isoniacida; tolerancia al NaCl 5%; crecimiento en hidroxilamina; catalasa semicuantitativa; reducción de nitratos a nitritos; ureasa; pirazinamidasas; fosfatasa ácida; arilsulfatasa; β-galactosidasa, hidrólisis del Tween 80 y fuente de carbono (este último para micobacterias de crecimiento rápido).

Preparación de la muestra para la RPC-PLFR. La preparación de las muestras se realizó según el trabajo descrito por Telenti y cols¹². Se tomó una asada de

colonia micobacteriana y se resuspendió en 400 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) en viales de 1,5 mL y luego fueron sometidos a 80 °C por 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se conservó a -20 °C, siendo suficientes 5 µL del mismo para la RPC. Como control negativo del ensayo se empleó 5 µL de agua destilada estéril.

RPC-PLFR. Fue aplicada tanto en las 13 cepas de referencia como a las 46 cepas recibidas en el laboratorio. Se utilizaron los cebadores Tb11 (5'-ACCAA CGATGGTGTGTCCAT-3') y Tb12 (5'-CTTGTCGAAC CGCATAACCCT-3'), descritos por Telenti y cols¹² y Devallois y cols¹⁵, para amplificar un fragmento de aproximadamente 439 pares de bases (pb) del gen *hsp65* en 13 cepas de referencia. La mezcla de reacción contenía a ambos cebadores en una cantidad de 25 pmoles, 5 µL de tampón de reacción (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100), 2 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1, 5 µL de dNTP (10 mM), 1,5 U de *Taq* polimerasa (Promega) y H₂O destilada estéril para un volumen final de 50 µL. El ADN fue desnaturizado a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 60 °C 1 minuto y 72 °C 1 minuto. Un paso de extensión final de 7 minutos a 72 °C fue añadido al final de la corrida. El producto final de la RPC fue chequeado con un marcador de peso molecular de ADN XIV (Boehringer Mannheim) que abarca un rango desde 100 pb hasta 1.500 pb. Finalmente, se utilizó 15 µL por separado de dicho producto para la digestión con las enzimas *Bst*EII y *Hae*III. Los resultados de la digestión fueron analizados mediante una electroforesis submarina en gel de agarosa al 3% (Gibco, EUA) y se determinó la talla de cada uno de los fragmentos de restricción obtenidos por medio del marcador de peso molecular de 50 pb (Gibco, EUA). Posteriormente, se procedió a la identificación de especies de las diferentes cepas analizadas, comparando los patrones de RPC-PLFR con las tablas reportadas por Telenti y cols¹², Devallois y cols¹⁵ y la base de datos PRASITE con acceso libre (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Resultados

En el presente trabajo se comparó la identificación de MNT mediante pruebas bioquímicas y la RPC-PLFR. Los resultados de las pruebas bioquímicas estuvieron disponibles entre 4 y 6 semanas a diferencia de la RPC-PLFR que requirió de sólo 48 horas.

Al aplicar la RPC-PLFR en 13 cepas de referencias, se pudo apreciar concordancia de 100% en la identificación de especie. Sin embargo, la RPC-PLFR identifi-



Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de 5 especies micobacterianas

Especies	Temperatura			Ureasa	Tween 80	Aril sulfatasa		Fuente de Carbono		
	25 °C	37 °C	45 °C			3 d	14 d	inositol	manitol	Citrato
<i>M. avium</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. intracellulare</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. malmoense</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>M. peregrinum</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-

+ : Resultado positivo; - : Resultado negativo; 3 d: Tercer día; 14 d: Catorce días

có a la cepa *M. simiae* II como *M. simiae* III, según la base de datos PRASITE (dato no mostrado).

Por otro lado, la identificación de las 46 MNT por pruebas bioquímicas evidenció la presencia de 9 especies micobacterianas, algunas de ellas, con características fenotípicas muy similares. Tales fueron los casos de las especies *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. malmoense*, micobacterias no cromogénicas de crecimiento lento, en las que las pruebas bioquímicas de crecimiento a 25 y 45 °C, la prueba arilsulfatasa, la hidrólisis del Tween 80 y la ureasa resultaron ser decisivos para la diferenciación de estas especies (Tabla 1). Otras dos especies micobacterianas no cromogénicas pero de crecimiento rápido que resultaron ser muy similares fenotípicamente fueron las especies *M. fortuitum* y *M. peregrinum*. En este caso, la obtención de crecimiento de *M. peregrinum* en presencia de manitol fue suficiente para su identificación (Tabla 1).

La RPC-RFLP identificó 7 especies correspondientes a 9 patrones diferentes (Tabla 2). En ambos métodos, las especies *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. fortuitum* resultaron ser las micobacterias más representativas de nuestro estudio (Figura 1, Tabla 2). Sin embargo, cuatro resultados discordantes fueron encontrados entre estas pruebas. Cuatro cepas, identificadas por pruebas bioquímicas como *M. malmoense* (2 cepas), *M. intracellulare* (1 cepa) y *M. peregrinum* (1 cepa), fueron reportadas por la RPC-PLFR como *M. intracellulare* (2 cepas), *M. avium* (1 cepa) y *M. fortuitum* II (1 cepa), respectivamente (Tabla 2).

Discusión

En los últimos años, numerosos métodos moleculares han sido desarrollados para la detección de diferentes especies micobacterianas. Estos métodos tienen la capacidad de reducir considerablemente el tiempo de diagnóstico e incluso, han llegado a ser

Tabla 2. Número de cepas identificadas por ambos métodos

Número de especies	Identificación por pruebas bioquímicas	Identificación por RPC-PLFR
14	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
6	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
1	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
7	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> I
1	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> IV
1	<i>M. simiae</i>	<i>M. simiae</i> I
3	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> I
2	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> III
7	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> II
2 *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. intracellulare</i>
1 *	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>
1 *	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> II

*Resultados discordantes entre ambos métodos
RPC-PLFR: Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

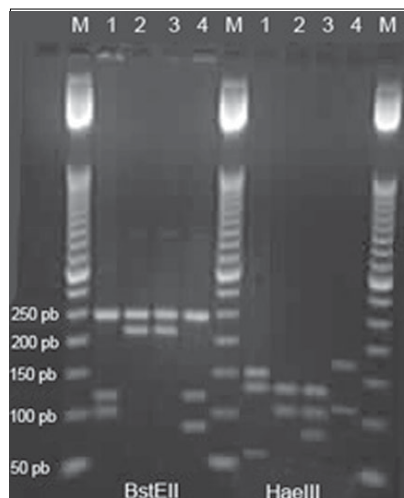


Figura 1. Resultados de los patrones de restricción de cuatro MNT al aplicar la RPC-PLFR con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*. Carril 1: *M. intracellulare*, Carril 2: *M. avium*, Carril 3: *M. kansasii* I, Carril 4: *M. gordonae* I, Carril M: Marcador de peso molecular 50 pb.



decisivos en la identificación de nuevas especies. Una de las secuencias dianas más empleadas en estos fines es, sin duda, la comprendida dentro del gen *hsp65*, con la cual se ha logrado la identificación de más de 50 especies de MNT, incluyendo más de 90% de las micobacterias patogénicas de crecimiento rápido, así como el diagnóstico de nuevas especies micobacterianas^{16,17}.

En el presente trabajo se procedió a la aplicación de la RPC-PLFR utilizando 13 cepas de referencia. Sin embargo, el método falló en la diferenciación de la cepa *M. simiae* II, la cual presentó patrones similares a *M. simiae* III según la base de datos PRASITE, lo que consideramos constituye la principal desventaja de esta técnica, pues existe más de una base de datos descrita para MNT que no siempre coinciden en sus patrones reportados^{2,13,16,17}. En nuestra opinión, el principal problema de la RPC-PLFR es que no se ha logrado uniformidad internacional para la interpretación de los resultados. Las diferencias pudieran deberse a condiciones de corrida aplicadas en los ensayos realizados, porcentaje de agarosa usada, e incluso, el tipo de gel empleado, puesto que se han reportado diferencias entre los patrones de corrida cuando se emplean geles de agarosa y geles de poliacrilamida^{2,16}.

Tanto por pruebas bioquímicas como por RPC-PLFR *M. intracellulare*, *M. kansassii* y *M. fortuitum* fueron las especies más frecuentemente identificadas en esta serie que comprendió a 46 MNT; la aislada con máxima frecuencia fue *M. intracellulare*, lo cual se corresponde a un estudio similar realizado en el país durante el período 1985-1989¹⁸. Junto con *M. avium* conforman el complejo *Mycobacterium avium*, reportado como el más frecuente en países como Brasil, E.U.A. y Canadá^{3,19}.

La especie *M. kansassii* ha sido también reportada como una micobacteria de importancia clínica, en especial en pacientes que sobrepasan los 50 años de edad, causando una infección pulmonar muy similar a la TBC. La incidencia de la TBC causada por esta especie depende de la región geográfica donde se realice el estudio, destacándose países como Inglaterra y España donde se han detectado un gran número de aislados de esta micobacteria¹⁹. *Mycobacterium fortuitum* ha sido también reconocido como una de las micobacterias de mayor incidencia en nuestro país²⁰. En este sentido, Wong y cols realizaron un estudio en Hong Kong empleando RPC-PLFR y encontraron a *M. fortuitum* dentro de las especies más frecuentes²⁰. Así mismo, Shulz y cols combinó la RPC anidada con enzimas de restricción para determinar la frecuencia de ADN de micobacterias en tejidos conservados en parafina por un período de tres años, destacándose el

complejo *Mycobacterium fortuitum*, formado por las especies *Mycobacterium chelonae* y *M. fortuitum*, como la MNT mayormente encontrada²¹.

Cuatro cepas (de las 46 MNT analizadas) presentaron resultados discordantes al comparar los dos métodos de identificación empleados en nuestro estudio. Estas discrepancias también han sido encontradas por otros autores, los cuales se lo atribuyen a la presencia de más de una especie micobacteriana en el cultivo original o a errores de interpretación de las características fenotípicas y bioquímicas, dada la gran similitud que presentan estas especies en pruebas convencionales^{4,5,22}. Por tal motivo, trabajos publicados con anterioridad plantean que el uso de RPC-PLFR suele ser más efectivo en el diagnóstico de MNT que las pruebas bioquímicas, debido, fundamentalmente, a que los métodos convencionales se apoyan en características fenotípicas de las micobacterias, un parámetro susceptible de variar en determinadas especies, lo que pudiera conducir a un diagnóstico erróneo de las mismas^{4,5,22}.

En esta serie, en 5 especies micobacterianas se observaron estas discrepancias. Las pruebas bioquímicas de crecimiento a 25 y 45 °C, hidrólisis de la urea (ureasa) y del Tween 80 fueron suficientes para diferenciar las especies *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. malmoense*. Por lo contrario, las dos cepas de *M. malmoense* detectadas por estas pruebas así como una cepa de *M. intracellulare*, fueron diagnosticadas por la RPC-PLFR como *M. intracellulare* (dos cepas) y *M. avium* (una cepa), respectivamente. Consideramos que estas discrepancias se deben a la estrecha similitud que presentan estas especies en las pruebas bioquímicas; no siempre el fenotipo es del todo reproducible. Por tal motivo, las tablas de identificación reportadas para MNT reflejan porcentajes o probabilidades de éxito o fracaso para una prueba determinada²³. Una cepa identificada por pruebas bioquímicas como *M. peregrinum*, presentó perfiles similares a *M. fortuitum* según la RPC-PLFR. El uso de manitol como fuente de carbono resultó ser decisiva para diagnosticar la especie *M. peregrinum*, en las restantes pruebas fue muy similar a *M. fortuitum*. En este caso, además de lo planteado con anterioridad, es probable que alguna contaminación de nuestro laboratorio haya producido este diagnóstico errado para esta prueba en particular.

Las MNT presentan una relativa resistencia a un amplio espectro de fármacos antituberculosos, debido, fundamentalmente, a la poca permeabilidad y alta hidrofobia que presenta su superficie celular²⁴. Por ello, la aplicación de un método de diagnóstico efectivo resulta crucial para ejecutar una correcta terapia específica en los pacientes. Nuestro laboratorio, como



centro nacional de referencia del país, utiliza más de un método de diagnóstico en muestras de importancia clínica, con el objetivo de asegurar una correcta identificación y, por consiguiente, un eficaz tratamiento. Afortunadamente, para los pacientes de nuestro estudio las discrepancias encontradas por ambos métodos no hubieran ocasionado fallas en el tratamiento de estos (de haberse realizado un solo método) ya que las infecciones ocasionadas por *M. intracellulare*, *M. avium* y *M. malmoense* son tratadas de forma similar, usualmente claritromicina o azitromicina, rifampicina y etambutol^{24,25}. Para infecciones ocasionadas por *M. fortuitum* y *M. peregrinum* ocurre algo similar, se ha encontrado efectividad de amikacina, ciprofloxacina, sulfonamidas y cefoxitina^{24,25}.

En resumen, consideramos que la RPC-PLFR es un método rápido y efectivo para el diagnóstico de MNT. Su aplicación en los laboratorios de referencia pudiera ser de gran utilidad para una correcta identificación y, por ende, para el uso de una terapia adecuada en los pacientes afectados por estos microorganismos.

Resumen

La amplificación por reacción de la polimersa en cadena (RPC) de un fragmento del gen *hsp65*, seguido del análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) por las enzimas *BstEII* y *HaeIII*, ha demostrado ser muy útil en la identificación de micobacterias no tuberculosas (MNT). En el presente trabajo se les realizó una batería de pruebas bioquímicas así como la RPC-PLFR a un total de 13 cepas de referencia y 46 cepas recibidas en el laboratorio. Los resultados de las pruebas bioquímicas estuvieron disponibles entre 4 a 6 semanas, a diferencia de la RPC-PLFR que requirieron de sólo 48 horas. En ambos métodos, las especies detectadas con mayor frecuencia fueron *Mycobacterium intracellulare*, *M. kansasii* y *M. fortuitum*. La RPC-PLFR es un método rápido, sencillo y eficaz. Su aplicación en los Laboratorios de Referencia pudiera ser de gran utilidad para el diagnóstico de MNT.

Referencias

- Hale Y M, Pfyffer G E, Salfinger M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 834-46.
- Leão S C, 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.
- Silva CF, Ueki SY, Geiger D, Leão S. *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001; 43: 120-5.
- Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts G D, Böttger E C. Two laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: Molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 296-303.
- Mondragón M, Vázquez C A, Barrón C, Acosta P, Jost K C, Balandrano S, et al. Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública México* 2000; 42: 484-9.
- Palomino J C, Martín A, Portales F. New methods for the diagnosis and drug resistance detection in mycobacteria. *Recent Res Devel Microbiol* 2002; 2: 297-318.
- Butler W, Jost K, Kilburn J. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2468-72.
- Lambert M A, Moss C W, U. A. Silcox U A, Good R. Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of *Mycobacterium* species by capillary gas chromatography. *J Clin Microbiol* 1986. 23: 731-6.
- Daniel T M, Debanne S M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1137-51.
- Hance A J, 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.
- Plikaytis B B, Plikaytis B D, Yakrus A, Butler W R, Woodley C L, Silcox V A, et al. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1815-22.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, 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.
- Vestal A L. Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Atlanta (GA): Department of Health Service, CDC, 1975; 42-95.
- Kent P T, Kubica G P. Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta (GA): Centers for Disease Control, US Department of Health and Public Services, 1985.
- Devallois A, Seg Goh K, 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.
- Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Torotoli 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.
- Steingrube V A, Gibson J L, Brown B A, Zhang Y, Wilson R W, Rajagopalan M, et al. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 149-53.
- Ferrá C, Montoro E, Gutiérrez A M, Valdivia J A, Jiménez C. Estudio de micobacterias no tuberculosas aisladas en Cuba durante el período 1985-1989. Reporte preliminar. *Rev Cub Med Trop* 1992; 44: 205-7.



- 19.- Martínez-Moragón E, Menéndez R, Palasí P, Santos M, López-Aldeguer J. Enfermedades por micobacterias ambientales en pacientes con y sin infección por el VIH: características epidemiológicas, clínicas y curso evolutivo. Arch Bronconeumol 2001; 37: 281-6.
- 20.- Wong D, Yip P, Tse D, Tung V, Cheung D, Kam K. Routine use of a simple low-cost genotypic assay for the identification of mycobacteria in a high throughput laboratory. Diag Microbiol Infec Dis 2003; 47: 421-6.
- 21.- Schulz S, Cabras A D, Kremer M, Weirich G, Miethke T, Bosmuller H C, et al. Species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues: frequent detection of nontuberculous mycobacteria. Mod Pathol 2005; 18: 274-82.
- 22.- McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodríguez 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.
- 23.- Leão S, Martín A, Mejía G I, Palomino J C, Robledo J C, Telles M A, et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden Broele, Brugge, Belgium, 2004.
- 24.- Falkinham J O. 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 177-215.
- 25.- American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Resp Crit Care Med 1997; 156: S1-S25.