



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**COMPARACION ENTRE TRES METODOS PARA
IDENTIFICAR MICOBACTERIAS**

ACTIVIDAD DE INVESTIGACION

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA:

CARLOS ARTURO VAZQUEZ CHACON

ASESORA: M en C. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A LA MEMORIA DE MI PADRE.

A MI MADRE CON CARÍÑO: POR SU GRAN APOYO Y PACIENCIA.

A MIS PARIENTES: EN ESPECIAL A MIS HERMANOS Y SOBRINOS.

GRACIAS A:

Mis profesores de la FES-Cuautitlán por contribuir a mi formación profesional, especialmente a Ana Laura por su apoyo y confianza.

Mis compañeros del InDRE por haber compartido muchos momentos gratos y haberme permitido trabajar y aprender con ellos, especialmente al M. en I.B.B. Hiram Olivera.

INDICE

Comparación entre tres metodos para identificar micobacterias (versión en español)

Introducción.....	I
Material y Métodos.....	II
Resultados.....	III
Conclusiones.....	V

Comparison among three methods for mycobacteria identification (versión original en inglés)

Paginación en la publicación.....	484-489
-----------------------------------	---------

Comparación entre tres métodos para identificar micobacterias

Introducción.

Las enfermedades producidas por el género *Mycobacterium* son una causa importante de mortalidad y morbilidad en el mundo, estas se han incrementado debido a las infecciones causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), siendo los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* los principalmente involucrados.¹ La identificación de las micobacterias a nivel especie es importante debido a su significado clínico; pues es importante discriminar entre especies patógenas y no patógenas. También es crítico el discernimiento de las especies para satisfacer el esquema de tratamiento adecuado para los pacientes, ya que diferentes regímenes farmacológicos específicos son requeridos contra las distintas especies de micobacterias patógenas.²

Los métodos convencionales para la identificación de micobacterias, utilizadas comúnmente en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) en la Ciudad de México, están basados en su cultivo y en pruebas bioquímicas, requiriendo de varias semanas para un crecimiento adecuado y en algunos casos no es posible su identificación precisa.³ Algunas dificultades, tales como la carencia de una reproducibilidad adecuada, las variabilidad de los fenotipos y el hecho de que la información sobre los fenotipos está limitada a las especies más comunes; pueden conducir a resultados ambiguos o erróneos.² Se han utilizado de manera alternativa técnicas para la identificación de micobacterias como cromatografía en capa fina, cromatografía de gas-líquido, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en Inglés) y técnicas moleculares basadas en hibridación, amplificación o secuencia de ácidos nucleicos; sin embargo, en los países en desarrollo estas pruebas están restringidas a laboratorios de investigación.³

Este estudio se diseñó para comparar, desde el punto de vista económico y operacional, las pruebas bioquímicas para identificar micobacterias con dos técnicas nuevas, HPLC y PCR: El HPLC separa los ácidos micólicos presentes en la pared celular, que son derivatizados a sus correspondientes ésteres de p-bromofenilacilo en función del tamaño de sus cadenas, de la insaturación de sus ácidos grasos y de sus grupos funcionales generando un patrón distintivo para cada especie de micobacteria.^{4,5} El método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés),

amplifica un fragmento de un gen que codifica para la proteína de choque térmico de 65-KDa (*hsp65*) seguida del análisis del polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP, por su siglas en Inglés), utilizando las enzimas de restricción *HaeIII* y *BstEII*.^{3,6}

El objetivo de este estudio fue el de instrumentar un nuevo algoritmo para procesar cepas de micobacterias que llegan a este instituto para ofrecer un servicio más eficiente.

Material y métodos

Este fue un estudio ciego realizado entre febrero de 1999 y enero de 2000 en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos en la Ciudad de México. Fueron analizados un total de 107 aislados, de los cuales 76 habían sido previamente identificados como micobacterias no tuberculosas y 31 como pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*.

Se calculó un tamaño de muestra para un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). Las cepas fueron seleccionadas y analizadas doble ciego. Se obtuvieron independientemente cuatro cultivos para realizar pruebas bioquímicas, HPLC, PCR-RFLP y una prueba de control externo (Departamento de Salud de Texas, Austin TX, E.U.A.) donde el algoritmo consistió en primer lugar de HPLC y posteriormente, si la cepa era de difícil identificación, se utilizaban sondas de ácidos nucleicos y pruebas bioquímicas.

Se llevó a cabo el método de detección ultravioleta para el HPLC, siguiendo los lineamientos del Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos.⁷ Ha sido publicada una nueva versión de referencia⁸ que no estaba disponible al realizar este estudio.

Para el PCR-RFLP el ADN se extrajo como se describe por van Soolingen⁹. Básicamente las células bacterianas fueron lisadas con lisozima, proteinasa K y dodecil sulfato de sodio (SDS, por su siglas en Inglés), seguido de extracción con bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB, por sus siglas en Inglés) cloruro de sodio y cloroformo; el ADN se precipitó con isopropanol, se lavó dos veces con etanol y se resuspendió con 20 μ L de agua destilada estéril. El procedimiento del PCR se basó parcialmente en el de Telenti *et al.*⁶ Los iniciadores TB11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT) y Tb12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT) se utilizaron para amplificar un fragmento de 439 pb del gen *hsp65*; las condiciones de reacción incluyeron un tiempo de preincubación de 2 min a 94°C seguido, de 40 ciclos de dos pasos: 30 seg a 94°C y 2 min a 67°C.

Los productos de PCR fueron observados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y digeridos por separado con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*. Los productos de restricción fueron analizados en geles de poliacrilamida al 12% usando pBR322/*HaeIII* como marcador de peso molecular. Los patrones de restricción fueron comparados con el algoritmo reportado por Devallois *et al.*³

El análisis bioquímico empezó con la determinación de velocidad de crecimiento y producción de pigmento para cada aislado. Para encontrar la temperatura de crecimiento óptima, cada cepa fue incubada a varias temperaturas (25, 37 y 42°C). Se llevaron a cabo tres pruebas bioquímicas; niacina, reducción de nitratos y producción de catalasa a 68°C. Los aislados positivos para niacina y nitratos y negativos para catalasa a 68°C fueron reportados como *M. tuberculosis*. Los aislados negativos para niacina, positivos para catalasa a 68°C y/o aislados negativos a nitratos fueron caracterizados con otras pruebas bioquímicas como incorporación de hierro, tolerancia al NaCl al 5%, hidrólisis de Tween, aril sulfatasa 1mM y 3mM, reducción de telurito de potasio y ureasa.¹⁰⁻¹²

Los resultados fueron capturados en una base de datos para calcular la sensibilidad de cada método y los porcentajes de concordancia entre los métodos y el laboratorio de referencia. Finalmente se realizó un análisis de tiempo y recursos consumido por cada método. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Winstat™, La prueba de Cochran fue utilizada para valores de p: <0.05, <0.01 y <0.001.

Resultados.

Fueron identificados a nivel especie 107 aislados provenientes del cepario del InDRE, de los cuales 31 pertenecían al complejo *M. tuberculosis* y el resto fueron micobacterias no tuberculosas.

El método más rápido fue el PCR-RFLP; los resultados usando HPLC y pruebas bioquímicas requirieron de 5 a 15 días adicionales respectivamente. Las diferencias se debían principalmente a que se requiere una mayor cantidad de micobacterias para su detección ultravioleta en el HPLC y a la numerosa cantidad de pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de las micobacterias no tuberculosas.

Los resultados de la identificación por los tres métodos comparados con el laboratorio de referencia se encuentran resumidos el cuadro no.1. Básicamente, para la identificación del complejo *M. tuberculosis*, los tres métodos fueron adecuados. El PCR-RFLP fue el más sensible logrando identificar los 31 aislados de *M. tuberculosis*, el

HPLC identificó 28 aislados y las pruebas bioquímicas 26. Para las micobacterias no tuberculosas el PCR-RFLP también fue la prueba más sensible, siendo especialmente notable que esta técnica identificó 20 de los 24 aislados pertenecientes al complejo *M. avium*, mientras que el HPLC y las pruebas bioquímicas solo identificaron 18 y 5 aislados respectivamente. Esto se debió parcialmente a la observación de 6 patrones de HPLC poco comunes (cuadro II) y 19 patrones pigmentados que mostraron una velocidad de crecimiento alterada.

La especificidad fue calculada para cada especie considerando como negativos a todos los aislados que no correspondan a esa especie en particular y como falsos negativos a los aislados erróneamente identificados como pertenecientes a esa especie.

Para *M. tuberculosis* la especificidad fue del 98.7% para los métodos PCR-RFLP y las pruebas bioquímicas con solo un error en 76 muestras. La especificidad del HPLC fue inicialmente de solo el 83.1% debido que los aislados de los complejos *M. terrae* y *M. avium* mostraron patrones diferentes a aquellos encontrados en el manual del CDC (Centro de control de enfermedades)⁷ y solo un número limitado de patrones de referencia para *M. terrae* estaban disponibles en nuestro instituto en el momento en que se llevaba a cabo este estudio. Se obtuvieron patrones de referencia adicionales para los complejos *M. terrae* y *M. avium* y se compararon con los patrones de los aislados que fueron equivocadamente identificados como *M. tuberculosis*. Entonces fue posible diferenciar claramente todos los aislados de los complejos *M. terrae* y *M. avium* de *M. tuberculosis*. Después de la corrección para estos aislados, la especificidad del HPLC fue del 100%.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las tres pruebas para la identificación de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* pero no para *M. fortuitum* y *M. gordonae*. La significancia estadística y las diferencias entre cada prueba se muestran en el cuadro I.

El análisis de costos de los tres métodos se muestra en el cuadro III. En este análisis se separaron las pruebas bioquímicas para *M. tuberculosis* de aquellas requeridas para la identificación de micobacterias no tuberculosas. La técnica menos costosa para la identificación de *M. tuberculosis* fueron las pruebas bioquímicas y también fueron las más rápidas requiriendo de solo un día. Para las micobacterias no tuberculosas, las pruebas bioquímicas fueron ineficientes, costosas y requirieron más de 30 a 40 días. El HPLC resultó tan rápido como las pruebas bioquímicas para la identificación de *M. tuberculosis* con la ventaja de poder identificar otras micobacterias al mismo tiempo, pero con un

precio más elevado. Finalmente, el PCR-RFLP fue el procedimiento más costoso y requirió un día más que los otros métodos, y así como el HPLC, puede identificar inmediatamente micobacterias no tuberculosas. También fue el método más preciso como lo muestran las tablas I y II.

Conclusiones.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la metodología básica para la identificación de micobacterias, que incluye morfología colonial, pigmentación, velocidad de crecimiento y pruebas enzimáticas, fue rápida y confiable para la identificación de los aislados de *M. tuberculosis*, requiriendo de tres pruebas realizadas en un día a partir de un crecimiento confluyente. Sin embargo, las cepas de micobacterias no tuberculosas implicaban un proceso largo que requería hasta nueve pruebas distintas y duraba aproximadamente de 6 a 8 semanas. Después de terminado este procedimiento largo y laborioso, encontramos con frecuencia que los resultados no eran absolutos, debido a que a veces se observaban variaciones entre especies en su actividad enzimática y sus características fenotípicas. En el presente trabajo, estas variaciones hicieron particularmente difícil la identificación de las especies pertenecientes a los complejos *M. terrae* y *M. avium*. Wallace *et al*¹³ reportaron que el 80% de las cepas del complejo *M. avium* recuperadas de pacientes con HIV mostraban pigmento. Esta característica no era considerada para la identificación del complejo *M. avium* en nuestro laboratorio conduciendo a una asignación errónea de especie. Otra fuente de incertidumbre fue la heterogeneidad reportada para el complejo *M. terrae*, que condujo a una baja sensibilidad observada para estos aislados por los tres métodos. Interesantemente, las tres cepas pertenecientes al complejo *M. terrae* identificadas por PCR-RFLP resultaron *M. nonchromogenicum*, la cual ha mostrado ser una especie patógena para el humano.^{14, 15}

Con el uso de una colección adecuada de patrones de referencia, la identificación por HPLC fue confiable. El tiempo requerido para obtener un resultado de un cultivo puro fue de uno a dos días. Actualmente, esta técnica está bien establecida y se tienen patrones que permiten identificar hasta veinte especies⁸. En nuestro estudio, el HPLC consumió más tiempo que el PCR-RFLP, esto se debió parcialmente a que se analizaron simultáneamente muchas cepas, pero también se debió a que el HPLC basado en la detección ultravioleta requiere de mayor crecimiento bacteriano que el PCR, por lo tanto requiere de más tiempo. Es posible una identificación más rápida usando la detección de

ésteres de los ácidos micólicos por fluorescencia en el HPLC.¹⁶

La dificultad para identificar los complejos *M. avium* y *M. terrae* enfatiza la necesidad de contar con patrones de HPLC adecuados.

El PCR-RFLP fue el más preciso de los tres métodos y al menos tan rápido que el HPLC, además, puede identificar hasta treinta y cuatro especies del género *Mycobacterium*³ y también puede identificar varias especies del género *Nocardia* y otros actinomicetos aerobios.^{17,18} De hecho, como se describió anteriormente, este método fue el primero en terminar la identificación de todos los aislados, debido a que permite al operador procesar más aislados al día.

Otro aspecto importante fue el costo de las técnicas. En una comparación directa, encontramos que las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *M. tuberculosis*, fueron las menos costosas, seguidas por el HPLC y las pruebas bioquímicas para las micobacterias no tuberculosas, mientras que el PCR-RFLP fue el más costoso. Sin embargo, tenemos que considerar que una identificación más rápida y precisa de las micobacterias permite una recuperación más rápida del paciente y un ahorro importante en los fármacos; ya que el tratamiento común dura aproximadamente 6 meses, cuesta en México alrededor de \$100 dólares y es inconveniente cuando la infección es causada por micobacterias no tuberculosas.

Pensamos que una identificación más eficiente de las micobacterias se puede lograr combinando los tres métodos en un algoritmo optimizado (figura I), considerando criterios de costo-beneficio y ahorro de tiempo. Este algoritmo será utilizado en este instituto a partir de la publicación de este trabajo: Cuando es obtenido el cultivo primario, se realizan las tres pruebas bioquímicas básicas para identificar *M. tuberculosis*. Cuando estas pruebas sugieran una micobacteria no tuberculosa, el aislado es analizado entonces por HPLC, el cual permite la identificación de la mayoría de las especies a un costo relativamente bajo. Si se encuentra un patrón inusual de HPLC o no hay suficiente crecimiento para su identificación, entonces el aislado es analizado por PCR-RFLP, que permite la identificación de más especies con menor cantidad de muestra. Cuando llegue al instituto una muestra con características clínicas y epidemiológicas sugerentes de una micobacteria no tuberculosa, la muestra se analizará directamente por PCR-RFLP para obtener un resultado más rápido. Si el PCR-RFLP no puede arrojar un resultado inequívoco, se realizará la secuenciación de fragmentos del 16S ARN y del gen *hsp65* para su identificación final o para su inclusión en los bancos de datos en el caso de encontrar una nueva especie. Finalmente, debe ser considerada la importancia de otros

métodos como las pruebas por hibridación utilizadas en el laboratorio de referencia en el Departamento de Salud de Texas, pero la desventaja es que se requiere de una prueba para cada especie. Estas pruebas no son recomendadas para una cantidad grande de aislados desconocidos., pero si son lo mejor disponible para confirmar una identificación incierta por otros métodos o cuando la identificación alcanza un punto en el que sólo un número limitado de especies pueden ser asignadas.

Comparison among three methods for mycobacteria identification

Misael Mondragón-Barreto, Q.F.B.,⁽¹⁾ Carlos A. Vázquez-Chacón, Q.F.B.,⁽¹⁾
Candelaria Barrón-Rivero, Q.B.P.,⁽¹⁾ Patricia Acosta-Blanco, Q.B.P.,⁽¹⁾ Kenneth C. Jost Jr, B.A.M. (A.S.C.P.),⁽²⁾
Susana Balandrano, Biól.,⁽¹⁾ Hiram Olivera-Díaz, M. en I.B.B.⁽¹⁾

Mondragón-Barreto M, Vázquez-Chacón CA, Barrón-Rivero C, Acosta-Blanco P, Jost KC Jr, Balandrano S, Olivera-Díaz H. Comparison among three methods for mycobacteria identification. Salud Publica Mex 2000;42:484-489.

Mondragón-Barreto M, Vázquez-Chacón CA, Barrón-Rivero C, Acosta-Blanco P, Jost KC Jr, Balandrano S, Olivera-Díaz H. Comparación entre tres métodos para identificar micobacterias. Salud Publica Mex 2000;42:484-489.

Abstract

Objective. To compare three methods: Biochemical tests, high-performance liquid chromatography (HPLC) and polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP), for the identification of mycobacteria, and to perform a cost-benefit analysis to define an optimum identification algorithm. **Material and methods.** One-hundred-and-seven mycobacteria isolates were identified by the three methods at Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, between February of 1999 and January of 2000 and the results were compared with those of a reference laboratory using the Q-Cochran statistical test. **Results.** PCR-RFLP was the most rapid and specific procedure but also the most expensive; biochemical tests excelled for identification of *Mycobacterium tuberculosis*, but were lengthy and expensive for other mycobacteria; HPLC ranked in the middle for price, speed and specificity. **Conclusions.** Considering the expected proportion of *M. tuberculosis*, the following algorithm was proposed: Initially, biochemical tests should be performed; if the results indicate a non-tuberculous mycobacteria, the isolate should be analyzed with HPLC; if results are unclear, the isolate should be analyzed using PCR-RFLP. Isolates showing a previously undescribed PCR-RFLP pattern should be characterized by DNA sequencing.

Key words: *Mycobacterium*/diagnosis; diagnosis, laboratory; chromatography, high-performance liquid/diagnostic use; Mexico

Resumen

Objetivo. Comparar tres métodos: pruebas bioquímicas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para identificar micobacterias a nivel especie, analizando costo-beneficio y proponiendo un algoritmo de identificación. **Material y métodos.** Entre febrero de 1999 y enero de 2000, en los laboratorios del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos se tipificaron 107 aislados de micobacterias y los resultados se compararon con los obtenidos en un laboratorio de referencia utilizando la prueba estadística Q de Cochran. **Resultados.** Se encontró que el PCR-RFLP fue el método más específico y rápido pero también el más caro. Las pruebas bioquímicas fueron confiables para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, pero lentas e inespecíficas para otras micobacterias. El HPLC estuvo en un nivel medio tomando en cuenta costo, tiempo y especificidad. **Conclusiones.** Considerando la proporción esperada de *M. tuberculosis*, se propone el siguiente algoritmo: si las pruebas bioquímicas indican una micobacteria no tuberculosa, el aislado será analizado por HPLC; si la identificación no es clara, el aislado será analizado usando PCR-RFLP. Si el aislado no pertenece a un patrón descrito, se identificará por secuenciación de ADN.

Palabras clave: *Mycobacterium*/diagnóstico; diagnóstico de laboratorio; cromatografía líquida de alta resolución/uso diagnóstico; México

- (1) Departamento de Biología Molecular y Departamento de Micobacterias, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México, D.F., México.
(2) Mycobacteriology/Mycology Branch, Bureau of Laboratories, Texas Department of Health. Austin, Texas, United States of America.

Received on: March 24, 2000 • Accepted: August 9, 2000

Reprinted requests to: Hiram Olivera Díaz. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Carpio 470, colonia Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, 11340 México, D.F., México.
E-mail: hir_oli@starmedia.com

The diseases produced by species of the genus *Mycobacterium* are important causes of morbidity and mortality in the world; they have increased due to HIV infections, with the involvement mainly of *M. tuberculosis* and *M. avium* complexes.¹ The identification of mycobacteria to the species level is important because of the clinical significance; some species are pathogenic while others are not. Knowledge of species is also critical in order to provide adequate patient management because specific antimycobacterial drugs are required against different pathogenic mycobacteria species.²

The conventional methods for the identification of mycobacteria, currently used at Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) in Mexico City, are based on culture and biochemical tests, they require several weeks for adequate growth, and sometimes, accurate identification is not possible.³ Difficulties such as lack of adequate reproducibility, the variability of phenotypes, and the fact that phenotype information is limited to common species, may lead to ambiguous or erroneous results.² Alternative techniques have been established, such as thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography, high-performance liquid chromatography (HPLC), and molecular techniques based on hybridization, amplification, or sequencing of nucleic acids, but in developing countries they are generally limited to research laboratories.³

This study was designed to compare (from economic and operational points of view), mycobacteria biochemical tests with two new techniques, HPLC and PCR: HPLC separates mycolic acids extracted from bacterial cell wall, that are derivatized to their p-bromophenacyl esters as a function of their chain length, unsaturated acids, and functional groups, thus generating a distinctive pattern for each species of mycobacteria.^{4,5} The polymerase chain reaction (PCR)-based method amplifies a fragment of the gene that codes for the 65-KDa heat-shock protein (*hsp65*), followed by restriction fragments length polymorphism (RFLP) analysis, using the restriction enzymes *HaeIII* and *BstEII*.^{3,6}

The objective of the study was to implement a new algorithm for processing mycobacterial strains that arrive at this Institute, to offer a more efficient service.

Material and methods

This was a masked study, conducted between February 1999 and January 2000 at Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos in Mexico City. A total of 107 isolates were analyzed, 76 of which had

been previously identified as non-tuberculous mycobacteria, and 31 as *M. tuberculosis* complex isolates.

Sample size was calculated for a confidence interval of 95% ($p < 0.05$). Strains were selected and analyzed in a double-masked fashion. Four subcultures for each strain were obtained independently to perform biochemical tests, HPLC, PCR-RFLP, and one external control test (Texas Department of Health, Austin TX, USA); the identification algorithm consisted firstly of HPLC and then, if any strain was difficult to identify, genetic probes and biochemical tests were used.

Ultraviolet-detection HPLC was performed as described by the U.S. Department of Health and Human Services.⁷ A newer reference version that has now been published,⁸ was not available when this study was conducted.

For PCR-RFLP, DNA was extracted as described by van Soolingen.⁹ Basically, bacterial cells were lysed with lysozyme, proteinase K and SDS, followed by CTAB/NaCl and chloroform extraction; DNA was then precipitated with isopropanol, washed twice with ethanol, and resuspended in 20 μ l of sterile distilled water. The PCR procedure was partially based on Telenti *et al.*⁶ Primers Tb11 (5' -ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT) and Tb12 (5' -CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT) were used to amplify a 439-bp fragment of the *hsp65* gene; reaction conditions included a pre-incubation time of 2 min at 94 °C, followed by 40 two-step cycles of 30 sec at 94 °C, and 2 min at 67 °C. PCR products were electrophoresed in 2% agarose gels and digested separately by restriction endonucleases *BstEII* and *HaeIII*. Restriction products were analyzed on 12% polyacrylamide gels using pBR322/*HaeIII* as the molecular weight standard. Restriction patterns were compared with the algorithm reported by Devallois *et al.*³

Biochemical analysis began by determining growth rate and pigment production for each isolate. To find the optimal temperature for growth, each strain was incubated at several temperatures (25, 37, and 42 °C). Three biochemical tests; niacin, nitrate reduction, and catalase production at 68 °C, were performed. Niacin and nitrate-positive isolates and 68 °C catalase-negative isolates were reported as *M. tuberculosis*. Niacin-negative, 68 °C catalase-positive and/or nitrate-negative isolates were further characterized with other biochemical tests like iron uptake, 5% NaCl tolerance, Tween hydrolysis, 1mM and 3mM aryl sulfatase, potassium tellurite reduction, and urease.¹⁰⁻¹²

Result data were entered into a database, to calculate the sensitivity for each method, and concordance percentages between methods and with the reference laboratory. Finally, a time and resources analysis was

made for each method. Statistical analysis was performed using the Winstat™ statistical package; Q-Cochran's test was used to obtain p values of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$.

Results

One-hundred-and-seven *Mycobacterium* isolates from our institutional collection were identified to the species level. Thirty-one belonged to the *M. tuberculosis* complex and the remaining were non-tuberculous mycobacteria.

The fastest method was the PCR-RFLP; results from HPLC and biochemical testing required 5 and 15 additional days, respectively. The differences were mainly due to the larger amount of cells required for ultraviolet-detection HPLC and to the large number of biochemical tests necessary for the identification of non-tuberculous mycobacteria.

Identification results with the three methods compared with the reference laboratory are summarized in Table I. Basically, for the identification of *M. tuberculosis* complex, the three methods were adequate. PCR-RFLP was more sensitive, since it correctly identified all 31 *M. tuberculosis* isolates; HPLC identified 28 isolates, and the biochemical tests identified 26. For the non-tuberculous mycobacteria, PCR-RFLP was also more sensitive; especially remarkable was that this technique identified 20 from 24 *M. avium* complex isolates, while the HPLC and the biochemical tests only identified 18 and 5 isolates, respectively. This was partially due to the observation of 6 unusual HPLC patterns (Table II) and 19 pigmented isolates that also showed an altered growth rate.

Specificity was calculated for each species, considering as negatives all the isolates not belonging to that particular species and as false negatives, the isolates erroneously identified as belonging to the species.

For *M. tuberculosis* the specificity was 98.7% for two methods, PCR-RFLP and biochemical tests, with only one error in 76 samples. HPLC specificity was initially only 83.1% because *M. terrae* and *M. avium* complexes isolates showed different patterns from those found in the CDC manual,⁷ and only a limited number of *M. terrae* complex reference patterns were available at our Institute at the time of the study. Additional *M. terrae* and *M. avium* complexes reference patterns were obtained and compared with the isolates that were mistakenly identified as *M. tuberculosis*. It was then possible to clearly differentiate all of *M. terrae* and *M. avium* complexes isolates from *M. tubercu-*

Table I
SENSITIVITY OF THE THREE METHODS FOR SPECIES IDENTIFICATION COMPARED WITH THE REFERENCE LABORATORY

Species	Reference n	Method					
		PCR-RFLP		HPLC		BT	
		n	%	n	%	n	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	31	31	100	28	90	26*	84
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	19	18	95	17	90	13*	68
<i>Mycobacterium avium</i> complex	24	20*	83	18*	75	5 [§]	21
<i>Mycobacterium gordonae</i>	14	11	79	6 [‡]	43	8*	57
<i>Mycobacterium terrae</i> complex	10	3	30	0	0	3	30
<i>Mycobacterium simiae</i>	5	5	100	3	60	0	0
<i>Mycobacterium flavescens</i>	2	0	0	0	0	1	50
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1	1	100	1	100	0	0
<i>Mycobacterium marinum</i>	1	1	100	0	0	0	0

Q-Cochran test, * $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$, § $p < 0.001$

Table II
NUMBER AND PERCENTAGE OF STRAINS WITH ATYPICAL PATTERNS

Species	Reference n	Method					
		PCR-RFLP		HPLC		BT	
		n	%	n	%	n	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	31	0	0	3	10	0	0
<i>Mycobacterium avium</i> complex	24	0	0	6	38	19	80
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	19	0	0	2	11	6	32
<i>Mycobacterium gordonae</i>	14	3	21	8	62	6	43
<i>Mycobacterium terrae</i> complex	10	7	70	10	100	7	70

losis. After correcting for these isolates, specificity of HPLC was 100%.

Statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$) among the three tests for the identification of *M. tuberculosis* and *M. avium* complexes, but not for *M. fortuitum* and *M. gordonae*. Statistical significance and differences between each test and the reference test are shown in Table I.

Cost analysis of the three methods is shown in Table III. In this analysis we separated the biochemical procedures for *M. tuberculosis* from those required for the identification of non-tuberculous mycobacteria. The least expensive method for *M. tuberculosis* identification was the biochemical test; it was also the fastest, since it required only one day. For non-tuberculous

Table III
RESOURCES CONSUMED FOR EACH IDENTIFICATION METHOD OF MYCOBACTERIA TO SPECIES LEVEL

Method	Time (days)	Workers	Samples per day	Salary per sample (USD)	Reagents (USD)	Material (USD)	Cost per sample (USD)
BT (<i>M. tuberculosis</i>)	1	1	20	1.7	1.3	1.0	4.0
BT (NTM)	30-40	2	20	3.4	3.05	3.65	10.1
HPLC	1	1	5	6.8	3.7	2.3	12.8
PCR-RFLP	2	2	20	3.4	3.6	5.9	13.0

BT: biochemical tests

NTM: non-tuberculous mycobacteria

HPLC: high performance liquid chromatography

PCR-RFLP: polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism

mycobacteria, biochemical tests were inefficient, costly, and required more than 30-40 days. HPLC was as fast as the biochemical tests for *M. tuberculosis* identification, with the advantage that it can identify other mycobacteria at the same time, but at a higher price. Finally PCR-RFLP was the most expensive procedure, and required one more day than the other methods; but like HPLC, PCR-RFLP can also immediately identify non-tuberculous mycobacteria. Furthermore, it was also the most accurate method, as shown in Tables I and II.

Discussion

Results obtained in this work showed that the basic methodology for mycobacteria identification, including colonial morphology, pigmentation, growth rate, and enzymatic tests, was fast and reliable for the identification of *M. tuberculosis* isolates, requiring three tests performed in a single day from a well-grown homogeneous culture. However, a non-tuberculous mycobacteria strain implied a lengthy process that required up to nine different tests and took approximately 6 to 8 weeks. After finishing this long and time-consuming procedure, we often found that the results were not absolute, because sometimes intra-species variation in enzymatic activity and phenotypic characteristics were observed. In the present work, these variations made particularly difficult the identification of species belonging to the *M. terrae* and *M. avium* complexes. Wallace *et al*¹³ reported that 80% of *M. avium* complex strains recovered from patients with HIV show pigmentation. This feature was not considered for *M. avium* complex identification at our laboratory, leading to an erroneous assignation of species. Another source of uncertainty was the reported heterogeneity for *M. terrae* complex, that led to the low sensitivity observed

for those isolates with the three methods. Interestingly, the three strains belonging to *M. terrae* complex identified by PCR-RFLP were *M. nonchromogenicum*, which has been shown to be pathogenic to humans.^{14,15}

With the use of an adequate collection of reference patterns, identification by HPLC was reliable. The required time to obtain a result from a pure culture was 1 to 2 days. Nowadays, this technique is well standardized and we have now patterns allowing the identification of up to 20 species.⁸ In our study, HPLC took more time than PCR-RFLP, partially because there were too many strains to analyze simultaneously, but also because ultraviolet-based HPLC needs more cells than the PCR procedure and therefore more time was required to obtain the cell mass. Faster identification by HPLC could be possible by developing more sensitive fluorescence detection of mycolic acid esters.¹⁶

The problem with identification of *M. avium* and *M. terrae* complexes emphasized the need for adequate HPLC reference patterns.

The PCR-RFLP was the most precise of the three methods and at least as fast as the HPLC; moreover, it can identify up to 34 *Mycobacterium* species³ and can also identify several *Nocardia* and other aerobic actinomycetes.^{17,18} In fact, as described above, this method was the first to finish the identification of all the isolates, because it allows the technicians to process more isolates on a daily basis.

Another important aspect was the cost of the techniques. In a direct comparison, we found that the biochemical tests used for *M. tuberculosis* identification were the least expensive, followed by HPLC and biochemical tests for non-tuberculous mycobacteria, while PCR-RFLP was the most expensive. However, we also have to consider that a faster and more accurate identification of mycobacteria allows a faster recovery of the patients and important savings in drugs; since cur-

rent tuberculosis treatment takes about 6 months, costs around \$100 USD in Mexico, and is useless when the infection is caused by non-tuberculous mycobacteria.

We think that more efficient identification of mycobacteria could be achieved by a combination of the three methods in an optimized algorithm (Figure 1), considering cost-benefit and time-saving criteria. This algorithm will be used at our Institute following the publication of this study: When the primary culture is obtained, the three basic biochemical tests to identify *M. tuberculosis* are performed. When these tests suggest a non-tuberculous mycobacteria, the isolate is then analyzed by HPLC, which allows the identification of most species at a relatively low cost. If an unusual HPLC pattern is found or there is not enough growth for a clear identification, the isolate is analyzed by PCR-RFLP, which allows the identification of a wider variety of species with a smaller sample. When a sample with clinical or epidemiological characteristics suggesting non-tuberculous mycobacteria arrives at our Institute, the sample will be analyzed directly by PCR-RFLP to obtain faster results. If the PCR-RFLP is unable to give an unequivocal result, sequencing of 16S RNA and the *hsp65* gene will be performed for a final identification or for its inclusion in the data banks if new species are encountered. Finally, the importance of other methods like the hybridization tests used in the reference laboratory at the Texas Department of Health should be considered. These tests have the advantage of being highly specific, but the disadvantage that a specific test for each species is required. These tests are not recommended for the screening of a large

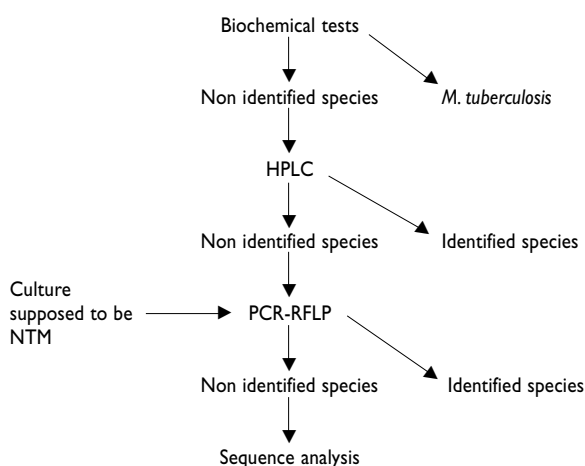


FIGURE 1. OPTIMIZED ALGORITHM FOR IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA TO THE SPECIES LEVEL

number of unknown isolates, but are the best available to confirm an uncertain identification performed by other methods, or when the identification reaches a point from which only a limited number of species can be assigned.

Acknowledgments

We acknowledge Q.B.P. Lorena Chávez-González and Q.B.P. Ma. de Lourdes Olivares-Delgado for their technical assistance, Dr. Mayra García-Ruiz for advice in statistics and we are specially grateful to the InDRE's Research Workshop organized by Dr. Ma. Dolores Correa-Beltrán for encouragement, support and creative discussion. We also thank the staff of the Texas Department of Health Mycobacteriology/Mycology Laboratory, especially Sher H. Chiu, for their assistance with reference identification.

References

1. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA et al. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1815-1822.
2. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: Molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34:296-303.
3. 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; 35:2969-2973.
4. Butler WR, Jost KC Jr, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2468-2472.
5. Butler WR, Thibert L, Kilburn JO. Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2698-2704.
6. 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; 31:175-178.
7. Butler WR, Cage G, Desmond E, Duffey PS, Floyd MM, Gross WM et al. Standardized method for the HPLC identification of mycobacteria. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, 1996.
8. Butler WR, Cage G, Desmond E, Duffey PS, Floyd MM, Gross WM et al. Mycolic acid pattern standards for HPLC identification of mycobacteria. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, 1999.
9. Van Soolingen D, Hermans PWM, de Hass PEW, Soll DR, van Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2578-2586.
10. Vestal AL. Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Atlanta (GA): Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, CDC, 1975; 42-95.
11. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta (GA): Centers for Disease Control, US Department of Health and Public Services, 1985.

12. Strong BE, Kubica GP. Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory. Atlanta (GA): Centers for Disease Control, US Department of Health and Public Services, 1981.
13. Wallace RJ Jr, O'Brien R, Glassroth J, Raleigh J, Dutt A. Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:940-953.
14. Torkko P, Suutari M, Suomalainen S, Paulin L, Larsson L, Katila ML. Separation among species of *Mycobacterium terrae* complex by lipid analyses: Comparison with biochemical tests and 16S RNA sequencing. *J Clin Microbiol* 1998;36:499-505.
15. Ridderhof JC, Wallace RJ, Kilburn JO, Butler WR, Warren NG, Tsukamura M et al. Chronic tenosynovitis of the hand due to *Mycobacterium nonchromogenicum*: Use of high-performance liquid chromatography for identification of isolates. *Rev Infect Dis* 1991;13:857-864.
16. Jost KC Jr, Dunbar DF, Barth SS, Headley VL, Elliott LB. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1270-1277.
17. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC Jr, Blacklock Z, Gibson JL et al. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and endonuclease restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:817-822.
18. Wilson RW, Steingrube V, Brown B, Blacklock Z, Jost KC Jr, McNabb A et al. Recognition of a *Nocardia transvalensis* complex by resistance to aminoglycosides, including amikacin and PCR-restriction fragment length analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2235-2242.