

IDENTIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS

Montserrat Garrigó¹ y Pere Coll^{1,2}

Servicio de Microbiología, Hospital de Sant Pau, Barcelona¹. Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona²

Las micobacterias, especialmente las especies del complejo tuberculosis, son responsables de numerosas infecciones en humanos (tabla 1). La Organización Mundial de la Salud ha declarado a la tuberculosis (TB) como una emergencia mundial, muriendo cada año aproximadamente tres millones de personas por esta causa y desarrollándose alrededor de nueve millones de nuevos casos por año. Durante algunos años se creyó que se podría erradicar la TB en los países desarrollados. En la última década, no obstante, la incidencia en éstos no ha seguido la línea descendente que se había proyectado. A pesar de que el 80% de la TB está concentrada en 22 países, el gran movimiento migratorio desde países con alta incidencia y con graves problemas de multiresistencia hacia países desarrollados, la existencia de bolsas de pobreza en el mundo industrializado y el desmantelamiento de algunos programas de control de la TB, han jugado un papel importante en esta reemergencia.

Para el control de la TB es necesario el diagnóstico precoz de los casos a fin de interrumpir la cadena de transmisión. Los métodos microbiológicos tradicionales no son eficientes, dada su lentitud. En los últimos 20 años se han desarrollado nuevos métodos de aislamiento, identificación, estudios de sensibilidad y tipificación, tanto para *Mycobacterium tuberculosis* como para el resto de las micobacterias. Además, aunque con menor importancia en el ámbito de la salud pública que *M. tuberculosis*, la frecuencia de aislamiento de micobacterias no tuberculosas (MNT) va aumentando y, al mismo tiempo, se van describiendo nuevas especies susceptibles de producir patología en humanos. En el año 1975 el género *Mycobacterium* comprendía alrededor de 30 especies, actualmente se han descrito alrededor de un centenar (tabla 2). Es necesario llegar en la identificación al nivel de especie para orientar el tratamiento de las distintas micobacterias, incluso dentro del complejo tuberculosis. Los estudios de sensibilidad en *M. tuberculosis* son particularmente importantes, tanto para la monitorización de las tasas de resistencia inicial en una comunidad, que influirán en los tratamientos empíricos de los casos de esta comunidad, como para la detección de cepas resistentes en pacientes con factores de riesgo. Los estudios de sensibilidad en las MNT se limitan a pocas especies, el complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* y las micobacterias de crecimiento rápido no pigmentadas con significación clínica.

Por todo esto, el laboratorio de micobacteriología clínica juega un papel importante tanto en la atención sanitaria como en el ámbito de la salud pública, y ha de emitir los resultados adecuados en el mínimo tiempo posible. Se ha pasado por varias fases para obtener respuestas con mayor rapidez, la utilización de medios de cultivo líquidos radiométricos y no radiométricos para el aislamiento y estudios de sensibilidad, la aplicación de las técnicas cromatográficas y el desarrollo de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos para la identificación, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de *M. tuberculosis* directamente en la muestra clínica, la tipificación molecular para el seguimiento de cepas de interés y, finalmente, las técnicas de secuenciación para la identificación. Así pues, en los últimos años han aparecido un conjunto importante de

técnicas nuevas que es necesario utilizar de manera complementaria para generar una información rápida y completa.

Cada laboratorio tiene que decidir su sistemática de trabajo en función de la comunidad a la que presta servicio y de la incidencia de *M. tuberculosis* y MNT en su población. La excelencia del laboratorio de microbiología no será efectiva si no existe una estrecha colaboración entre el laboratorio y los clínicos. Una muestra recibida en buenas condiciones y con la información necesaria hará que el rendimiento del laboratorio sea el esperado. Cuando existe esta colaboración, los clínicos comparten con el laboratorio tanto la calidad de sus resultados como la rapidez de éstos.

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis y del resto de micobacteriosis ha estado basado tradicionalmente, y no dejará de estarlo en un futuro, en el examen directo y en el cultivo. La microscopía, aunque relativamente poco sensible, se mantiene como la única prueba diagnóstica capaz de dar una respuesta rápida (primeras 24 h) en muchos laboratorios, independientemente de su presupuesto y sofisticación. Además, nos da una valoración del grado de infecciosidad del paciente con tuberculosis pulmonar, indispensable para el control de la infección en la comunidad. Es interesante la introducción, en el trabajo habitual, de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en la muestra clínica para una rápida confirmación de la sospecha de TB en pacientes con examen directo positivo para bacilos alcohol-ácido resistentes. No es aconsejable su utilización sistemática. En muestras con examen directo negativo es necesario que exista una sospecha clínica fundamentada que permita hacer una selección, tanto para las muestras respiratorias como para las no respiratorias. Su interpretación ha de ser prudente, debido a las limitaciones de este tipo de técnicas (presencia de inhibidores, riesgo contaminaciones, etc.), y deben tenerse en cuenta los datos clínicos y radiológicos. Estas técnicas permiten un diagnóstico rápido y presentan una elevada especificidad.

A lo largo de su trayectoria, el laboratorio de Micobacteriología de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona ha ido introduciendo en su actividad asistencial todos aquellos avances técnicos que, de manera razonable y eficiente, le han ayudado a conseguir sus objetivos en el mínimo tiempo posible. En su algoritmo de trabajo (Figura 1) se combinan técnicas basadas tanto en las características fenotípicas como en las genotípicas.

ALGORITMO DE TRABAJO

Las muestras que llegan al laboratorio se procesan según su procedencia. Aquéllas que provienen de territorios contaminados con flora comensal se descontaminan (método de NaOH/N-acetil-cisteína), mientras que las que provienen de territorios estériles se procesan sin descontaminar. A todas ellas se les practica un examen directo (tinción de auramina), urgente si es requerido por los clínicos, y se cultivan en medio sólido (Löwenstein-Jensen) y líquido [BACTEC®12B, BACTEC®13A (BACTEC® System, Becton Dickinson) o BacT/ALERT®MP (bioMérieux)], a diferentes temperaturas en función del tipo de muestra y la orientación clínica. En el caso de que se solicite específicamente o se trate de una muestra con examen directo positivo, se realizará una prueba de amplificación y detección de ácidos nucleicos en la muestra clínica [*Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test* (MTD) Gen-Probe].

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN

Hibridación con sondas de ácidos nucleicos

En función de la morfología de la colonia, en caso de aislamiento en medio sólido, o de la morfología microscópica en medio líquido, se escoge una de las sondas Accuprobe® (Gen-Probe). La técnica de hibridación de ácidos nucleicos en medio líquido es sencilla y rápida y se adapta a cualquier laboratorio. La experiencia demuestra que son reacciones específicas y sensibles, por lo que sustituyen a las demás técnicas de identificación convencional en aquellas especies para las que se dispone de sondas. Actualmente, están comercializadas sondas específicas para los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium*, y para *Mycobacterium intracellulare*, *M. avium*, *Mycobacterium gordonae* y *M. kansasii*. Si bien estas sondas cubren la mayoría de aislamientos con importancia clínica son necesarias otras técnicas alternativas de identificación para el resto de especies.

Generalmente, el cultivo en medio líquido es el primero en positivizarse. En cualquier caso, es necesario hacer un subcultivo en medio sólido para descartar la presencia de cultivos mixtos, especialmente en enfermos inmunodeprimidos. Por otra parte, si el resultado de la hibridación es negativo, se harán los subcultivos necesarios para estudiar la velocidad y temperatura óptima de crecimiento de la cepa así como la producción de pigmento. En las micobacterias de crecimiento rápido no pigmentadas se realiza la prueba de la arilsulfatasa y el crecimiento en McConkey sin cristal violeta para definir el complejo *Mycobacterium fortuitum*.

Estas pruebas fenotípicas son imprescindibles para una buena interpretación de las pruebas moleculares, que se pondrán en marcha simultáneamente. Por otra parte, si procede, se pone en marcha el estudio de sensibilidad y la conservación de la cepa.

Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PRA)

Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de un fragmento de 440 pb de un gen que codifica para una *heat shock protein* de 65kDa presente en todas las micobacterias y la posterior digestión del amplificado con dos enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*. Se obtienen varios fragmentos de diferentes pesos moleculares. El número y tamaño de los fragmentos de restricción separados por electroforesis en un gel de agarosa son específicos de especie. El patrón de bandas se comparará con los algoritmos publicados (tabla 3), pudiéndose identificar la mayoría de las especies aisladas. No siempre es fácil calcular con la precisión que se requiere los pesos moleculares de las bandas obtenidas en los geles de agarosa. Por otra parte, la aparición de patrones no descritos o variaciones en el patrón dentro de una misma especie hacen que, en ocasiones, sea necesaria la aplicación de otras técnicas de identificación. El PRA es especialmente útil para la identificación de micobacterias exigentes que crecen mal en los medios de cultivo sólido como *Mycobacterium genavense*. La técnica, si bien relativamente sencilla, exige disponer de un laboratorio de Biología Molecular, lo que dificulta su introducción en los laboratorios convencionales.

Secuenciación de la subunidad ribosomal 16s (rDNA)

Se secuencian una parte del gen que codifica para la subunidad 16s del ribosoma (500pb). La secuencia obtenida se compara con las que están incluidas en bases de datos presentes en Internet como GenBank o RIDOM. Hay que destacar que, a diferencia de GenBank, la base de datos RIDOM está sometida a un exhaustivo control de calidad y a actualizaciones taxonómicas lo que la hace especialmente recomendable. La secuenciación es útil para la identificación de todas las especies, excepto para diferenciar entre *M. kansasii* y *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium marinum* y *Mycobacterium ulcerans* y entre *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium chelonae*. En estos casos, es útil la técnica de PRA.

Análisis de las regiones de diferencia RD1, RD9, RD10, RD11 (Figura2)

Para la diferenciación de las especies incluidas en el complejo *M. tuberculosis* es necesaria otra técnica molecular, puesto que la gran homogeneidad genética entre ellas no nos permite diferenciarlas por PRA o secuenciación. Actualmente, utilizamos el algoritmo publicado por Parsons *et al.*, basado en la detección por PCR de la presencia o ausencia de unas regiones concretas denominadas "regiones de diferencia" en el genoma. Algunas de estas secuencias han desaparecido en algunos miembros del complejo *M. tuberculosis* y ello nos permite hacer su identificación específica. Dicho algoritmo no permite la diferenciación entre *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae*, debiendo entonces recurrir a otros esquemas publicados por otros autores como los de Brosch *et al* y Mostowy *et al.*

Conclusión

El laboratorio de micobacterias debe esforzarse en dar resultados fiables en el menor tiempo posible. Para ello deberá combinar el diagnóstico microbiológico clásico de las micobacterias, basado en el examen directo, aislamiento por cultivo e identificación fenotípica, con un conjunto de técnicas moleculares. Estas técnicas permiten la detección de *M. tuberculosis* directamente en la muestra clínica (amplificación de ácidos nucleicos) y la identificación rápida de los aislamientos. Se ha comentado el algoritmo de trabajo del servicio de Microbiología del Hospital de Sant Pau. Cada laboratorio deberá definir las técnicas a utilizar en función de sus posibilidades y las características epidemiológicas de las infecciones por micobacterias de la comunidad a la que sirve.

BIBLIOGRAFIA

- ANÓNIMO. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:S1-25.
- BROSCH R, GORDON S.V, MARMESSE M, *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3684-3689.
- BROWN-ELLIOTT BA, WALLACE RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:716-746.
- 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; 39:2799-2806.
- CATTOIR V. Molecular identification of mycobacteria and detection of antibiotic resistance. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004; 62:405-413.
- CLOUD J. L, NEAL H, ROSENBERRY R, *et al.* Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 2002; 40:400-406.
- DEVALLOIS A, GOH K.S, 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.

- HARMSSEN D, ROTHGANGER J, SINGER C, ALBERT J, FROSCH M. Intuitive hypertext-based molecular identification of micro-organisms. *Lancet* 1999; 353:291.
- LEBRUN L, ESPINASSE F, POVEDA J.D, VINCENT-LEVY-FREBAULT V. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2476-2478.
- MOSTOWY S, COUSINS D, BRINKMAN J, ARANAZ A, BEHR M.A. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 2002; 186:74-80.
- PARSONS L.M, BROSCH R, COLE S.T, *et al.* Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2339-2345.
- STEINGRUBE V. A, GIBSON J.L, BROWN B.A, *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; 33:149-153.
- TAYLOR T. B, PATTERSON C, HALE Y, SAFRANEK W.W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 1997; 35:79-85.
- TELENTI A, MARCHESI F, BALZ M, BALLY F, BOTTGER E.C, 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.
- TENOVER F. C, CRAWFORD J.T, HJEBNER R.E, GEITER L.J, HORSBURGH C.R, JR, GOOD R.C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31:767-770.

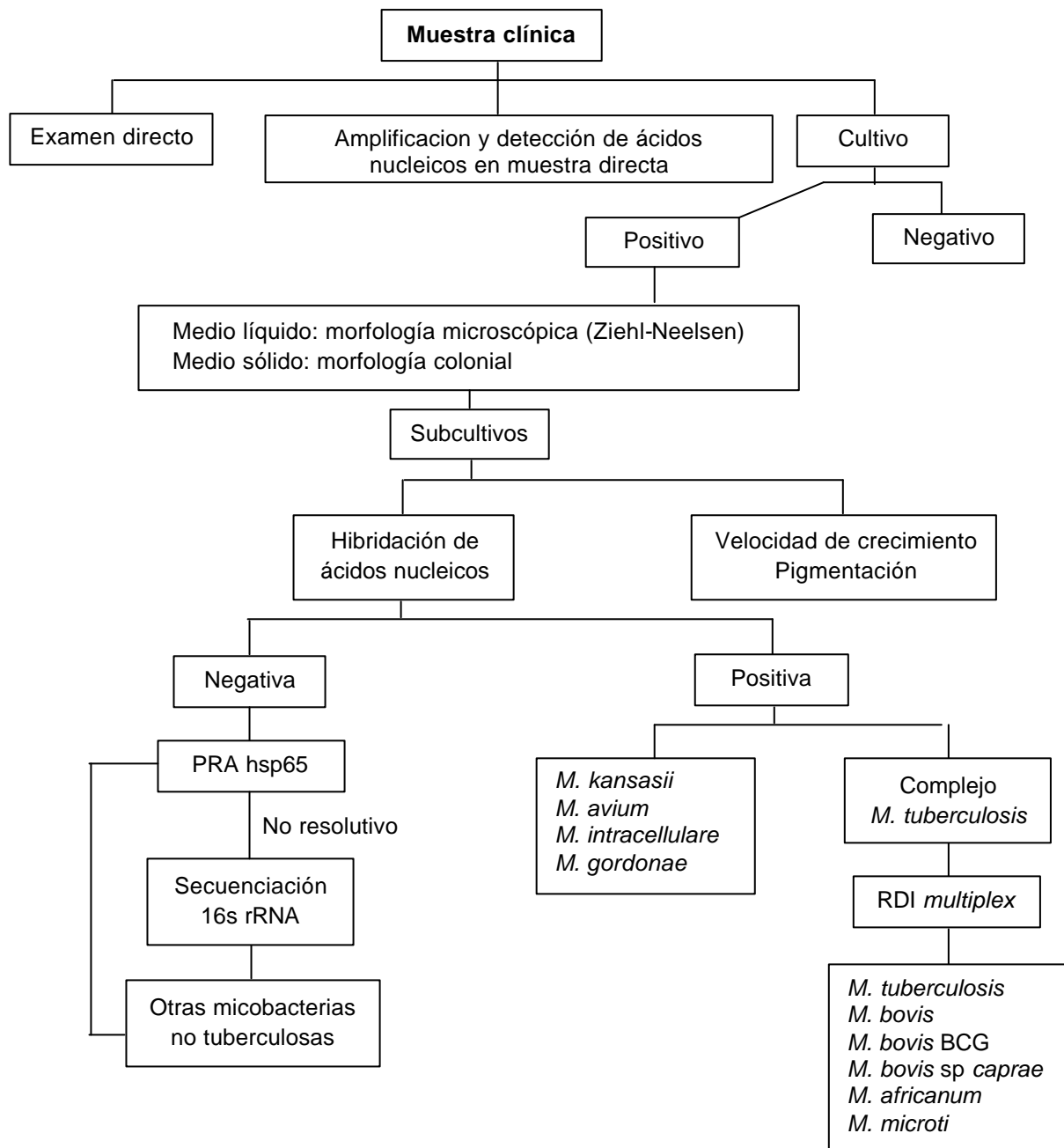
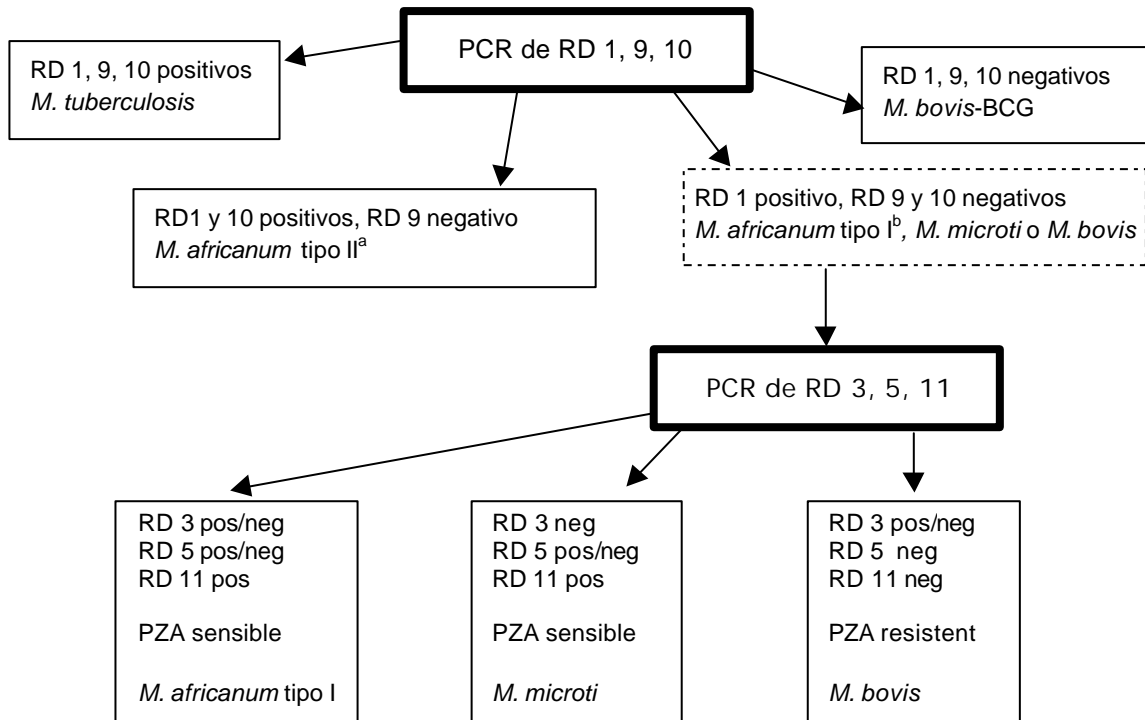


Figura 1. Algoritmo para la identificación de aislamientos del género *Mycobacterium*.



^aVariedad más frecuente en el este africano.

^bVariedad más frecuente en el oeste africano.

Figura 2: Esquema de la identificación de las especies del complejo *M. tuberculosis* mediante la amplificación de las regiones de diferenciación (RD). (Parsons *et al*).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de las principales micobacteriosis no tuberculosas humanas.

Implicación clínica	Especie	Infección					
		Pulmonar	Ganglionar ^b	Cutánea Subcutánea	Osteoarticular	Post traumática Post quirúrgica	Diseminada ^c
Más frecuente	MAC ^a	+++	++	-	-	-	+++
	<i>M. abscessus</i>	+	-	+	-	+	-
	<i>M. chelonae</i>	-	-	++	-	+	-
	Complejo <i>M. fortuitum</i> ^d	+	-	+	+	+	-
	<i>M. haemophilum</i>	-	+	+++	+	-	-
	<i>M. kansasii</i>	+++	+	-	-	-	+
	<i>M. malmoense</i>	+	+	-	-	-	-
	<i>M. marinum</i>	-	-	+++	+	-	-
	<i>M. simiae</i>	+	-	-	+	-	+
	<i>M. szulgai</i>	++	+	+	+	-	-
	<i>M. ulcerans</i>	-	-	+++	-	-	-
	<i>M. xenopi</i>	+++	-	-	-	-	-
Excepcional	<i>M. mucogenicum</i>	-	-	-	-	+	-
	<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	-	+
	<i>M. asiaticum</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>M. gordonae</i>	-	-	+	-	-	-
	<i>M. scrofulaceum</i>	-	++	-	-	-	+
	<i>M. shimoidei</i>	+	-	-	+	-	+
	<i>M. smegmatis</i>	+	-	-	-	+	-
	Complejo <i>M. terrae</i> ^e	-	-	-	-	+	-

^aMAC: Complejo *M. avium*.

^bInfadenitis.

^cInfección diseminada en el paciente inmunodeprimido.

^dComplejo *M. fortuitum*: *M. fortuitum* y *M. peregrinum*.

^eComplejo *M. terrae*: *M. terrae*, *M. triviale* y *M. nonchromogenicum*.

Tabla 2. Lista de las especies y subespecies del género *Mycobacterium*^a.

Número	Especie/subespecie	Año ^b	Número	Especie/subespecie	Año ^b	Número	Especie/subespecie	Año ^b
1	<i>M. abscessus</i>	1992 (1953)	30	<i>M. fortuitum</i>	1980 (1938)	64	<i>M. murale</i>	1999
2	<i>M. africanum</i>	1980 (1969)		supsp <i>acetamidolyticum</i>	1986	65	<i>M. neoaurum</i>	1980 (1972)
3	<i>M. agri</i>	1981 (1972)		supsp <i>fortuitum</i>	1990 (1938)	66	<i>M. nonchromogenicum</i>	1980 (1965)
4	<i>M. aichiense</i>	1981 (1973)	31	<i>M. frederiksbergense</i>	2001	67	<i>M. novocastrense</i>	1997
5	<i>Malvei</i>	1992	32	<i>M. gadium</i>	1980 (1974)	68	<i>M. obuense</i>	1981 (1971)
6	<i>M. asiaticum</i>	1980 (1971)	33	<i>M. gastri</i>	1980 (1996)	69	<i>M. palustre</i>	2002
7	<i>M. aurum</i>	1980 (1966)	34	<i>M. genavense</i>	1993	70	<i>M. parafortuitum</i>	1984 (1965)
8	<i>M. austroafricanum</i>	1983	35	<i>M. gilvum</i>	1980 (1971)	71	<i>M. peregrinum</i>	1922 (1962)
9	<i>M. avium</i>	1980 (1901)	36	<i>M. goodii</i>	1999	72	<i>M. phlei</i>	1980 (1899)
	subsp. <i>avium</i>	1990	37	<i>M. gordonae</i>	1980 (1962)	73	<i>M. porcinum</i>	1980
	subsp. <i>paratuberculosis</i>	1990	38	<i>M. haemophilum</i>	1980 (1978)	74	<i>M. poriferae</i>	1987
	subsp. <i>silvaticum</i>	1990	39	<i>M. hassiacum</i>	1997	75	<i>M. pulveris</i>	1983
10	<i>M. bohemicum</i>	1998	40	<i>M. heckeshornense</i>	2001 (2000)	76	<i>M. rhodesiae</i>	1981 (1971)
11	<i>M. botniense</i>	2000	41	<i>M. heidelbergense</i>	1998 (1997)	77	<i>M. scrofulaceum</i>	1980 (1956)
12	<i>M. bovis</i>	1980 (1907)	42	<i>M. hiberniae</i>	1993	78	<i>M. senegalense</i>	1980 (1973)
	supsp. <i>bovis</i>	2002 (1970)	43	<i>M. hodleri</i>	1996	79	<i>M. septicum</i>	2000
	subsp. <i>caprae</i>	2002 (1999)	44	<i>M. holsaticum</i>	2002	80	<i>M. shimoidei</i>	1982 (1975)
13	<i>M. branderi</i>	1995	45	<i>M. immunogenum</i>	2001	81	<i>M. shottsii</i>	2003
14	<i>M. brumae</i>	1993	46	<i>M. interjectum</i>	1995 (1993)	82	<i>M. simiae</i>	1980 (1965)
15	<i>M. celatum</i>	1993	47	<i>M. intermedium</i>	1993	83	<i>M. smegmatis</i>	1980 (1889)
16	<i>M. chelonae</i>	1980 (1923)	48	<i>M. intracellulare</i>	1980 (1949)	84	<i>M. sphagni</i>	1980
	supsp. <i>abscessus</i>	1992 (1953)	49	<i>M. kansasii</i>	1980 (1955)	85	<i>M. szulgai</i>	1980 (1972)
	subsp. <i>chelonae</i>	1980 (1972)	50	<i>M. komossense</i>	1980 (1979)	86	<i>M. terrae</i>	1980 (1966)
17	<i>M. chitae</i>	1980 (1967)	51	<i>M. kubicae</i>	2000	87	<i>M. thermoresistibile</i>	1980 (1966)
18	<i>M. chlorophenicum</i>	1994 (1986)	52	<i>M. lacus</i>	2002	88	<i>M. tokaiense</i>	1981 (1973)
19	<i>M. chubuense</i>	1981 (1973)	53	<i>M. lentiflavum</i>	1996	89	<i>M. triplex</i>	1997 (1996)
20	<i>M. confluens</i>	1992	54	<i>M. leprae</i>	1980 (1880)	90	<i>M. triviale</i>	1980 (1970)
21	<i>M. conspicuum</i>	1996 (1995)	55	<i>M. lepraemurium</i>	1980 (1912)	91	<i>M. tuberculosis</i>	1980 (1883)
22	<i>M. cookii</i>	1990	56	<i>M. madagascariense</i>	1992	92	<i>M. tusciae</i>	1999
23	<i>M. diernhoferi</i>	1983 (1965)	57	<i>M. mageritense</i>	1997	93	<i>M. ulcerans</i>	1980 (1950)
24	<i>M. doricum</i>	2001	58	<i>M. malmoense</i>	1980 (1977)	94	<i>M. vaccae</i>	1980 (1964)
25	<i>M. duvalii</i>	1980 (1971)	59	<i>M. marinum</i>	1980 (1926)	95	<i>M. vanbaalenii</i>	2002
26	<i>M. elephantis</i>	2000	60	<i>M. microti</i>	1980 (1957)	96	<i>M. wolinskyi</i>	1999
27	<i>M. fallax</i>	1983	61	<i>M. montefiorensis</i>	2003	97	<i>M. xenopi</i>	1980 (1959)
28	<i>M. farcinogenes</i>	1980 (1973)	62	<i>M. morioakaense</i>	1986			
29	<i>M. flavescens</i>	1980 (1962)	63	<i>M. mucogenicum</i>	1995			

^aObtenidas de LBSN (list of bacterial names with standing in nomenclature) y DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

^bAño de clasificación y entre paréntesis el año de la primera descripción.

Tabla 3. Diferenciación de aislamientos de *Mycobacterium* al nivel de especie por PRA; los números indican fragmentos de restricción en pares de bases (Brunello *et al.*).

BstEII^a	HaellI fragmentos en pb^b	Especies
No digestión	198 (197), 92 (87), 50 (58), 33 (40)	<i>M. confluentis</i>
	187 (184), 106 (107), 43 (NF), 38 (34)	<i>M. gilvum</i>
	177 (171), 91 (87), 74 (NF), 49 (45), 33 (36)	<i>M. tusciae</i>
	171 (181), 132 (126), 30 (42), 23 (36)	<i>M. triviale</i>
	146 (145), 69 (69), 58 (58), 55 (54)	<i>M. brumae</i>
	145 (139), 99 (98), 60 (58), 53 (51), 39 (36)	<i>M. pulveris</i>
	136 (165), 129 (128), 64 (65), 47 (46), 20 (35)	<i>M. duvalii</i>
	131 (128), 106 (103), 75 (70), 44 (42), 38(36), 21 (22)	<i>M. szulgai</i>
	93 (87), 53 (59), 39 (36), 23 (22)	<i>M. gadium</i>
130±2 [140]	200 (198), 60 (60), 55 (59)	<i>M. chelonae</i> subsp <i>chelonae</i>
	178 (186), 69 (65), 58 (58)	<i>M. mucogenicum</i>
	163 (160), 108 (112), 106 (111)	<i>M. haemophilum</i>
313±10 [325]	117±3	<i>M. aichiense</i>
	125 o 120]	<i>M. terrae</i>
	204 (196), 72 (69), 60 (58), 56 (54), 43 (41)	<i>M. neoaurum</i>
	187 (181), 132 (126), 42 (38), 36 (34)	<i>M. rhodesiae</i>
	170 (172), 137(139), 58 (56)	<i>M. diernhoferi</i>
	167 (161), 128 (123), 59 (58), 42 (40), 38 (36)	<i>M. chitae</i>
	151 (147), 142 (141), 60 (58), 42 (46)	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II
	147 (139), 84 (87), 58 (58)	<i>M. gordonae</i> tipo IV ^d
145 (139), 91 (94), 50 (58)	<i>Mgenavense</i>	
130 (127), 111 (112), 71 (70), 59 (59)		
127 (127), 108 (103), 43 (42)		
211±4	191 (188), 135 (126), 66 (NF)	<i>M. simiae</i> tipo I
	184 (179), 141 (137), 74 (72)	<i>M. thermoresistibile</i>
	176 (172), 141 (149), 91 (95), 50 (51)	<i>M. sphagni</i>
	167 (162), 96 (94), 53 (51), 46 (45), 42 (40), 37 (36)	<i>M. poriferae</i>
	155 (145), 136 (127), 45 (42), 39 (40)	<i>M. interjectum</i>
	150 (145), 127 (127), 100 (95),	<i>M. scrofulaceum</i>
	146 (145), 102 (106), 81 (78),	<i>M. marinum</i> ^d
	145 (146), 138 (140), 95 (98), 54 (52)	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>
	144 (139), 128 (123), 98 (101), 53 (52)	<i>M. porcinum</i>
	144 (145), 74 (69), 62 (58), 55 (52)	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>
	143 (139), 86 (87), 58 (58), 40 (37)	<i>M. obuense</i>
	141 (140), 85 (81), 51 (54), 33 (36)	<i>M. phlei</i>
	132 (140), 104 (106), 80 (76), 41 (41), 37 (36)	<i>M. branderi</i>
	128 (127), 105 (103), 82 (78)	<i>M. kansasii</i> tipo I ^d
	127 (127), 104 (103), 51(59)	<i>M avium/paratuberculosis</i>
	113 (112), 104 (106)	<i>M. asiaticum</i>
	234±3 [245]	135±5
85±3		<i>M. smegmatis</i>
[140/85 o		<i>M. alvei</i>
80]		<i>M. tokaiense</i>
151 (146), 99 (100), 53 (52),		<i>M. shimoidei</i>
141 (150), 120 (124), 50 (58), 40 (43), 30 (36)		<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>
140 (139), 130 (130), 73 (79), 43 (40),		<i>Mgastri/kansasii</i>
137 (139), 117 (123), 58 (59),		
133 (126, 104 (103), 73 (69)		
117±2		<i>M. intracellulatre</i>
99±4	<i>M. malmoense</i>	
[125 o	<i>M. hiberniae</i>	
120/100]	<i>M. gordonae</i> tipo III ^d	
117±2	<i>M. gordonae</i> tipo II ^d	
84±5	<i>M. xenopi</i>	
[125 o	<i>M. gordonae</i> tipo I ^d	
120/80]	<i>M tuberculosis</i> complex	
157 (152), 131 (127), 71 (69)	<i>M. senegalense</i>	
145 (139), NF (123), 64 (58), 39 (32)	<i>M. farcinogenes</i>	
142 (141), 124 (123), 61 (58), 54 (52), 43 (43)		

^aLos tamaños entre corchetes son los observados para estos fragmentos en patrones descritos anteriormente.

^bLos tamaños entre paréntesis son los derivados del análisis de la secuencia; (NF) diana de restricción no encontrada en la secuenciación. NF fragmento no encontrado en el patrón de PRA.

^cla negrilla indica PRA que no figuran en algoritmos definidos por Telenti *et al.*, Taylor *et al* y Devallois *et al.*

^dEspecies con más de dos cepas estudiadas, se publica el tamaño medio.