



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS ESCOTOCROMÓGENAS POR MEDIO
DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ GARCÍA



MÉXICO D.F

2011



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.

DEDICATORIAS.

A Jaime Martínez, mi padre, que desde niña me motivo a terminar esta carrera dejando su juventud en el trabajo, para permitirme realizar este sueño. Cada gota de sudor papá, está por fin reflejada en este libro.

A Isabel García, mi madre, por todos y cada uno de los días que te has preocupado por mi, porque admiro tu paciencia, tu carácter noble, porque siempre tuviste la esperanza de que yo podía, por la fe que depositaste en mi, por tu amor muchas gracias mamita.

A Sandra, Ivan, Fany y Miguel por ser los mejores hermanos. Gracias a Dios por dejarme crecer, aprender y vivir con ustedes. También los amo.

A Miguel García, Carmina Sierra, Tania y Braulio por ser mi familia y mi apoyo durante la etapa más difícil de la carrera. Tío voy a admirarte y agradecerte toda mi vida.

A Froy porque me diste la oportunidad de volver a creer en el AMOR.

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS por darme la oportunidad de terminar este sueño.

A mis abuelitos Agustín y Dominga por ser un ejemplo de vida y de amor.

A mis abuelitos Gilberto y Carmen por el año en que me brindaron su casa, por cada desvelo y cada preocupación, por brindarme su cariño y compañía, muchas gracias.

A la Facultad de QUÍMICA, por ser mi casa durante tanto tiempo, por haberme brindado todo lo que ahora sé, porque siempre tuviste las puertas abiertas para mí y aunque a veces llegue llorando porque ya no podía más, siempre supe que al final me convertirías en una mejor persona.

A mis maestros Raúl Garza, Rafael García y Luciano Hernández por su apoyo, por inculcarme el amor a las "BACTERIAS"

A mis maestros y amigos porque forman parte de la etapa más importante de mi vida.

A la Facultad de Medicina por permitirme realizar este proyecto dentro de sus instalaciones.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. RAÚL GARZA VELASCO

VOCAL: PROF. GONZALO CASTILLO ROJAS

SECRETARIO: PROF. RAFAEL GARCÍA GONZÁLEZ

1er SUPLENTE: PROF. SANTIAGO ÁVILA RÍOS

2º SUPLENTE: PROF. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

ASESOR DEL TEMA: RAFAEL GARCÍA GONZÁLEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

SUSTENTANTE: MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ GARCÍA.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	9
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>Mycobacterium</i>	10
1.1. Morfología bacteriana	10
1.2. Características microscópicas	11
1.3. Composición química de la pared celular	11
1.4. Propiedades culturales	15
1.5. Actividad catabólica	19
2. IMPORTANCIA CLÍNICA DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS	22
2.1. Epidemiología	22
2.2. Factores de riesgo	22
2.3. Formas clínicas	23
2.4. Inmunidad	25
2.5. Susceptibilidad	26
2.6. Tratamiento	26
2.7. Preservación	31
2.8. Aplicaciones	32
3. MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS	34
3.1. Grupo I Clasificación de Runyon	34
3.2. Grupo II Clasificación de Runyon	37
3.3. Grupo III Clasificación de Runyon	42
3.4. Diagnóstico de micobacterias no tuberculosas	53
3.5. Pruebas para la identificación bioquímica	58
3.6. Análisis cromatográfico	64
3.7. Análisis químico de la pared celular micobacteriana	65
3.8. Métodos genéticos	66
4. MÉTODO EXPERIMENTAL.	72
4.1. Material y métodos para pruebas bioquímicas	72
4.2. Material y métodos para PCR	80
4.3. Resultados	84
4.4. Análisis de resultados	93
4.5. Conclusiones	99
BIBLIOGRAFÍA	101
APÉNDICE	103

ABREVIATURAS

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
µm	Micrometros (1*10 ⁶ metros)
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
mm	Milímetros (1*10 ⁻³ metros)
LAM	Lipoarabinomanana
G	Guanina
C	Citosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LJ	Lowenstein-Jensen
ATS	Sociedad de Toráx Americana
LCR	Líquido ceforraquídeo
CO ₂	Dióxido de carbono
ADC	Albumina, dextrosa y caseína
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
MNT	Micobacterias No Tuberculosas
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
PPD	Derivado proteico purificado
mL	mililitros
DMSO	Dimetil sulfóxido
°C	Grados Celsius
BCG	Bacilo de Calmette y Güerin
SIDA	Síndrome de inmuno deficiencia adquirida
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
PRA	PCR-enzimas de restricción
cm	centímetro
LBA	Lavado broncoalveolar
NALC	N-acetil-cisteína
INH	Isoniacida
T ₂ H	Ácido Tiofén-2-carboxílico
PNBA	Ácido p-nitrobenzoico
MTB	Mycobacterium tuberculosis
TLC	Cromatografía en capa fina
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
mM	milimolar
Tween	Monolaurato de sorbitán polioxietilénico
rrn	Operon ribosómico
M	Molar
Mm	milímetros
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
pmol	picomol
µL	microlitro
pb	Pares de bases
V	Volts
rpm	Revoluciones por minuto
ng	nanogramos
UV	Luz ultravioleta
MPM	Marcador de peso molecular
Da	Dalton
ADN	Ácido desoxirribonucleico
GLC	Cromatografía de gases
ARN	Ácido ribonucleico
min	minutos

RESUMEN

En relación a los diferentes tipos de micobacterias, las MNT constituyen un importante problema a nivel mundial, incrementándose en pacientes inmunodeprimidos ya que estas bacterias suelen actuar como patógenos oportunistas originando un serio problema de salud pública.

Estudios previos han indicado que los análisis convencionales para la identificación de estas micobacterias frecuentemente reportan resultados erróneos para las diversas especies del género *Mycobacterium*.

En este trabajo se incluyeron 3 controles (*M. tuberculosis*, *M. fortuitum* y *M. gordonae*), además de 34 cepas provenientes de pacientes pediátricos, estas cepas fueron sometidas a baciloscopías, cultivo en LJ y MB/Bact, y las pruebas bioquímicas convencionales, de estas técnicas se pudo identificar 12 cepas de *M. gordonae* y 22 no pudieron ser identificadas por lo que se les nombró únicamente como *M. sp.*

Finalmente para corroborar resultados se realizó PCR empleando *16S ARNr* a las 12 cepas de *M. gordonae*. El análisis convencional y molecular reportó los mismos resultados.

Se llegó a la conclusión que la identificación molecular del *16S ARNr* es un método rápido de 12 a 36 horas contra el tiempo empleado en los métodos convencionales de 4 a 8 semanas y es la prueba definitiva para la identificación de especies.

INTRODUCCIÓN

Desde que en 1882 Koch descubriera el agente productor de la tuberculosis, no se han dejado de encontrar nuevas especies pertenecientes al género *Mycobacterium*. Este género incluye a microorganismos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium leprae* y un grupo de micobacterias consideradas menos virulentas o no patógenas, que presentan una amplia distribución entre los diferentes ecosistemas y se comportan como oportunistas ante situaciones de inmunodepresión (32).

Anteriormente consideradas ambientales, no productoras de cuadros patológicos hoy se les reconoce que provocan cuadros asociados a agua contaminada y hasta graves infecciones en pacientes inmunocomprometidos, indiferenciables de las ocasionadas por *M. tuberculosis*. Actualmente, su detección temprana y oportuna es una herramienta indispensable para el tratamiento de la enfermedad que producen.

El género *Mycobacterium* se caracteriza por su gran contenido lipídico en la pared celular, lo cual lo convierte en una bacteria de lento crecimiento; esto es una desventaja para su identificación en el laboratorio clínico y, por eso, para disminuir el tiempo en su detección, se recurre a métodos moleculares, los cuales aportan una mayor exactitud, precisión y confiabilidad al diagnóstico de padecimientos ocasionados por micobacterias no tuberculosas.

OBJETIVO GENERAL

Identificar micobacterias escotocromógenas aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría por medio de pruebas bioquímicas y por el método conocido como reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar por métodos convencionales de laboratorio (estándar de oro) las micobacterias no tuberculosas aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría.

Aplicar la PCR como método principal para la identificación molecular del género y la especie, de las micobacterias no tuberculosas aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría.

Describir las principales características microbiológicas de las especies de micobacterias no tuberculosas.

Describir los principales aspectos relacionados con el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Mycobacterium*

1.1. Morfología bacteriana

El género *Mycobacterium* incluye parásitos obligados, saprófitos y oportunistas que se caracterizan por presentar forma de bacilos delgados de forma recta o ligeramente curva; miden 0.2 a 0.8 μm de ancho por 2 a 7 μm de largo y son aerobios, inmóviles, no formadores de esporas, difíciles de teñir por el método de Gram; de hecho erróneamente llegan a considerarse grampositivos. Resisten la decoloración con ácido-alcohol (BAAR: bacilo ácido alcohol resistente) y conservan el primer colorante como carbolfucsina (tinción de Ziehl-Neelsen y Kinyoun) o fluorocromos (auramina-rodamina) (32).

Esta propiedad, llamada ácido-alcohol-resistencia, no es exclusiva de las micobacterias, ni suficiente para distinguirlas de cultivos del género *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus* (33).

Las colonias micobacterianas son grandes, de 2 a 5 mm de diámetro, de aspecto liso o rugoso, con o sin una pigmentación que va de un color amarillo claro mate hasta un naranja, con bordes irregulares y una textura butirácea y seca.

Se debe tomar en cuenta que *M. leprae* no desarrolla *in vitro* y sólo se ha logrado cultivar en armadillo y en el cojinete plantar del ratón (32).

1.2. Características microscópicas

En las técnicas de afinidad tintoreal, como la tinción de Ziehl-Neelsen o la de Kinyoun, los bacilos aparecen de color rojo (figura 1). La variante fluorocrómica (auramina) los muestra de color amarillo-naranja fluorescente. Esta técnica tiene la ventaja de que se visualizan más campos de la muestra, al requerirse un objetivo de menor aumento (cribado más rápido y exhaustivo) y es la preferida por algunos microbiólogos (figura 2); además, en los casos dudosos puede realizarse una tinción de Ziehl-Neelsen en el mismo portaobjetos (32).

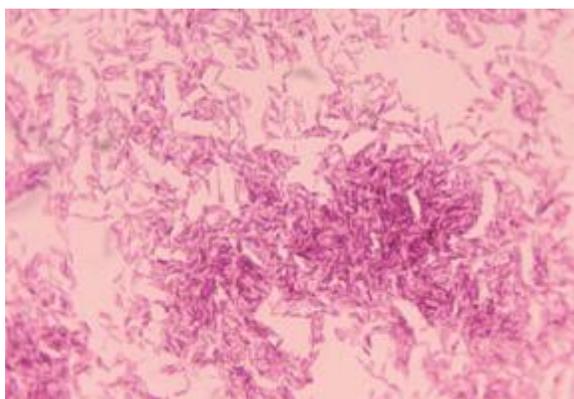


Figura 1. Bacilos de micobacterias teñidos con la Tinción de Ziehl-Neelsen, bacilos rojos (32).

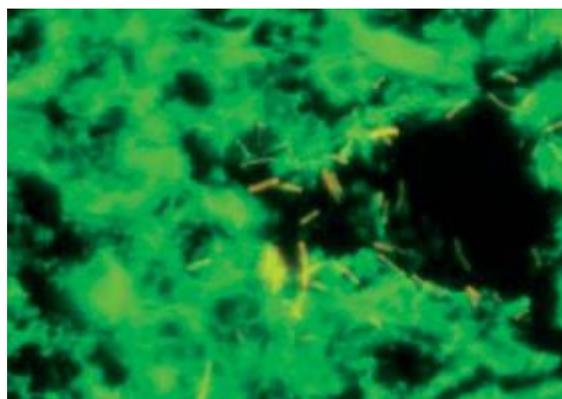


Figura 2. Bacilos de micobacterias teñidos por la técnica de auramina, bacilos amarillo-naranja (32).

1.3. Composición química de la pared celular

La pared celular micobacteriana es una estructura compleja formada por tres capas, seguidas de la membrana celular (figura 3).

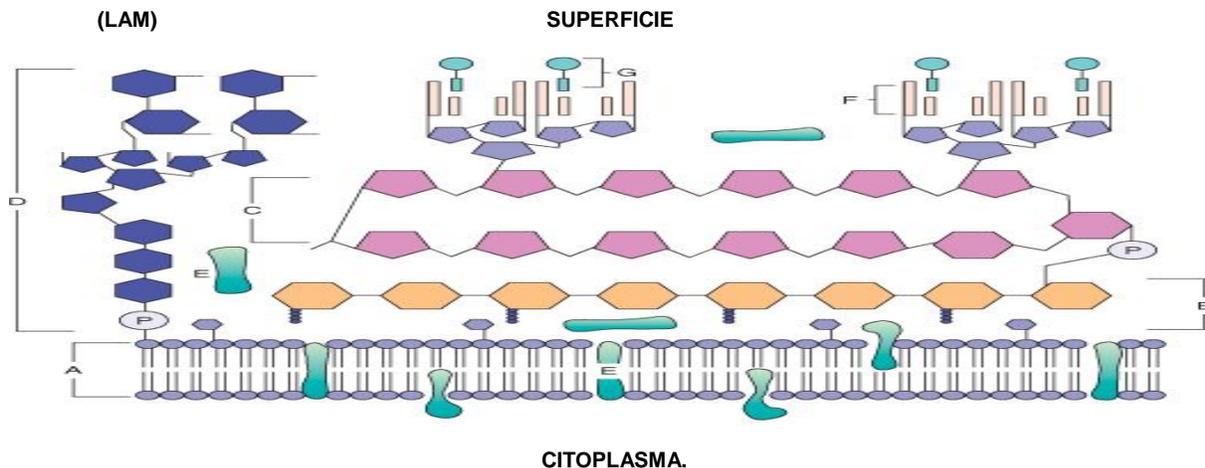


Figura 3. Esquema de la pared celular micobacteriana. A: membrana citoplasmática, B: peptidoglicano, C: ácidos micólicos, D: lipoarabinomanana, E: proteína integral, F: lípidos superficiales y G: carbohidratos.

La primera estructura basal consta de un peptidoglicano unido covalentemente a un arabinogalactano-micolato. El peptidoglicano (mucopéptido o mureína) está formado por unidades repetidas de ácido N-glicolil murámico y N-acetil glucosamina, unidas a un péptido. Diversos trabajos han confirmado que este grupo N-glicolil está presente en todas las Micobacterias, Nocardias y Micromonospora, pero ausente en Corinebacterias y *Streptomyces* (14). Las uniones interpéptidos son de dos clases: D-ala-meso-DAP y meso-DAP-DAP. Aproximadamente, el 70% de la unión cruzada basal en el peptidoglicano se integra por puentes interpéptidos entre residuos meso-DAP. Los puentes interpéptidos de este tipo parecen presentarse sólo en las micobacterias (14).

El péptidoglicano está unido al polímero de arabinogalactano por uniones fosfodiéster entre residuos de ácido murámico y una arabinosa del arabinogalactano (figura 4) (21).



Figura 4. Esquema de las uniones entre el Peptidoglicano y el Arabinogalactano.

El arabinogalactano está construido a partir de un núcleo de galactosa con ramificaciones de arabinosa, ambas en forma furanosa (anillo de cinco átomos). Las micobacterias son las únicas que contienen tanto galactofuranosa como arabinofuranosa en la pared celular (figura 5) (6).

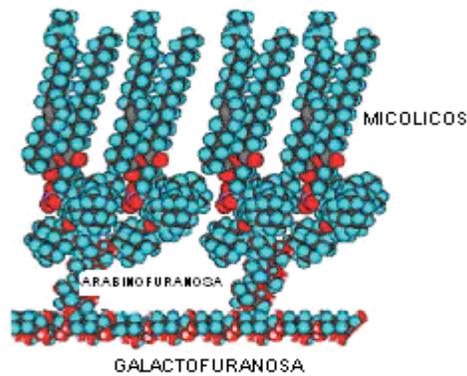


Figura 5. Molécula de Arabinogalactano micolato.

Composición de lípidos

El contenido de lípidos en las micobacterias corresponde aproximadamente al 20-60% del peso seco de la pared; estos lípidos tienen un papel importante en la

virulencia de la cepa infectante e influyen en la respuesta inmunológica a la infección (6).

Los principales lípidos de la segunda capa de la pared celular, son:

Ácidos micólicos: ácidos grasos ramificados, presentes en los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Mycobacterium*. La diferencia en cuanto a los ácidos grasos en estos géneros depende del número de átomos de carbono presentes. Así *Corynebacterium* contiene de 28 a 36, *Nocardia* de 40 a 60 y *Mycobacterium* de 60 a 90 (15).

El alto contenido en guanina y citosina (G=C) del ADN micobacteriano (62-70%) es similar al de otras bacterias productoras de ácido micólico, *Nocardia* (60-69%), *Rhodococcus* (59-69%) y *Corynebacterium* (51-59%) (33).

Glicolípidos: este grupo contiene dos de los posibles factores de virulencia: el factor cordón (6,6'- dimicolil-trehalosa) y los sulfolípidos.

Lipoarabinomanana (LAM): es un glicolípidos al final de la envoltura, aunque está anclado profundamente en el peptidoglicano; se forma por un núcleo de manosas unidas a múltiples cadenas laterales ramificadas de arabinofuranosil-manosa y a una unidad de fosfatidilinositol que puede ser utilizada como un puente de unión con otros elementos de la envoltura.

Factor cordón: 6,6' dimicolil-trehalosa (2 ácidos micólicos unidos a una trehalosa). Asociado a la virulencia (es leucotóxico), ya que inhibe a la succinato deshidrogenasa, provoca el hinchamiento de las mitocondrias y separa a los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso).

Sulfolípidos: glicolípidos sulfatados (ácidos grasos + trehalosa), asociados a la virulencia (actúan como fagolisosomas).

Micósidos: son un tipo específico de glucolípidos, en los que no se ha determinado ningún efecto tóxico o propiedad antigénica alguna.

Otros lípidos que forman parte de la última capa de la pared celular son: cera D, sustancia compleja de la pared celular con capacidad para actuar como adyuvante.

Tsukamura ha encontrado que el principal componente de las micobacterias del grupo II de Runyon (ver clasificación de Runyon), son β -carotenos: la fotosíntesis de estos requiere glicerol, glucosa o piruvato, por lo cual la formación de pigmentación en las micobacterias está influenciado por la composición del medio.

Los fosfolípidos presentes en las micobacterias son el fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, difosfatidilglicerol (cardiolipina) y el fosfatidilinositol manosido, este último imparte gran cantidad de características para los actinomicetos y bacterias corineformes. Implicados en la formación de granulomas.

1.4. Propiedades culturales

El uso de medios a base de huevo fue introducido por Dorset en 1903. Los tres más comúnmente utilizados son: Lowenstein-Jensen (LJ), (American Thoracic Society) ATS y Ogawa (1).

En la actualidad se utilizan numerosos medios de cultivo sobre la base de huevo para el aislamiento de micobacteria; de éstos el más común es el de Lowenstein-Jensen; el medio de Petragnani es más inhibitorio y debe usarse solo con especímenes que contengan gran número de contaminantes. El medio sobre la base de huevo de ATS

es menos inhibitorio y resulta útil para el aislamiento primario de micobacterias en muestras de líquido pleural, biopsias y líquido cefalorraquídeo (LCR) (18).

El agar no se emplea como solidificante porque suele ser tóxico para las micobacterias, en comparación con otras bacterias. Una alternativa sería preparar medio Proskauer y Beck con agar y adicionar suero bovino y albúmina que neutralizan la toxicidad del agar. El suero no debe utilizarse en concentraciones mayores al 5 ó 10 por ciento, porque inhibe el crecimiento bacteriano (36).

Los medios de Cohen y Middlebrook contienen albúmina para el crecimiento óptimo, biotina y catalasa, que estimulan la recuperación de los bacilos dañados en las muestras clínicas; caseína, que mejora el promedio de recuperación y la cantidad de las micobacterias resistentes a Isoniazida (18).

Todos los medios de cultivo producen mayor crecimiento y colonias más grandes cuando se incuban en atmósfera de 5 a 10% de CO₂ (18).

La exposición de estos medios a una luz fuerte o el almacenamiento a 4°C por más de 4 semanas, pueden producir su deterioro y la liberación de formaldehído (18).

De acuerdo al tipo de muestras, se requieren al menos tres muestras de esputo, que se deben incubar en uno o más medios sólidos y un medio líquido. Para muestras de sangre se puede utilizar un medio sencillo con el caldo BACTEC 13A o el medio de lisis centrifugación con 7H10 ó 7H11. Hay dos medios sólidos disponibles: medio base de huevo-patata (agar Lowenstein-Jensen) y medio base de agar libre (agar Middlebrook 7H10 ó 7H11).

Es importante la cuantificación del crecimiento (generalmente de 0 a 4+) para estimar el significado clínico y la respuesta al tratamiento. La mayoría de las micobacterias

de crecimiento lento son detectables en los medios sólidos en 2 a 4 semanas, mientras que en el sistema radiométrico BACTEC lo son en 1 a 2 semanas.

El medio 7H11 difiere del 7H10 por la adición de caseína hidrolizada, lo cual mejora el crecimiento de algunas especies fastidiosas como *M. tuberculosis*. El medio 7H9 requiere de la adición del suplemento ADC (albumina, dextrosa y caseína) y es el más utilizado para la investigación, pues previene aún más la contaminación (1).

Medios sólidos

El medio más ampliamente utilizado es el de Lowenstein-Jensen (con base de huevo), que tiene la ventaja de una menor contaminación en su preparación y puede ser almacenado durante meses (32).

Los medios sin base de huevo, como Middlebrook 7H10 y 7H11, son de menor caducidad, con utilidad para estudios de sensibilidad. Contienen 2% de glicerol que favorece el crecimiento del complejo *Mycobacterium avium*. Se incuban durante 2 meses a 37°C y/o a 30°C si se sospecha de especies como *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans* o *Mycobacterium haemophilum*. Deben ser revisados semanalmente hasta descartarlos como negativos (32).

Medios líquidos

Tienen la ventaja de ser medios de enriquecimiento, por lo que la detección suele ser más rápida, pero presentan la desventaja de que en ellos no se puede observar la morfología de la colonia ni valorar los posibles cultivos mixtos, hasta la resiembra en algún medio sólido. El tiempo medio de incubación suele ser de 42 días a 35-37°C antes de descartarlos como negativos (32).

Fotorreactividad de las micobacterias

La producción de un pigmento amarillo en las bacterias cromogénicas es el resultado de la producción de cristales de caroteno amarillento-naranja por microorganismos con metabolismo activo después de la exposición a la luz brillante.

No se conoce el tipo de pigmento producido por las micobacterias cuando crecen en la oscuridad (18). Los medios Lowenstein-Jensen y ATS son adecuados para la determinación de fotocromogenicidad. Los cultivos fotocromógenos deben incubarse a la temperatura de 30 a 37°C, mientras que los escotocromógenos deben hacerlo a 22-24 y 37°C (18,36).

Se especula que el número de operones de rRNA presentes en el genoma, forma la base genética para diferenciar entre las micobacterias de rápido y lento crecimiento (26).

Clasificación de Runyon

La clasificación de Runyon, realizada en 1954 y modificada en 1974, basada en las características de crecimiento de las micobacterias no tuberculosas (tabla 1), establece una división natural entre las micobacterias de crecimiento lento (más de 7 días) y rápido (menos de 7 días), con su capacidad de pigmentación: fotocromógenas, si producen colonias no pigmentadas en la oscuridad, pero pigmentadas si se exponen a la luz; escotocromógenas, si producen colonias amarillas o naranjas con y sin luz, y no cromógenas, si son siempre no pigmentadas (32).

Se han descrito hasta el momento alrededor de 100 especies de micobacterias. De 1990 a la fecha se han detectado 42 nuevas especies de este género, siendo la

mayoría (23 especies) aisladas sólo de muestras clínicas (55%); diez, aisladas del ambiente –muestras clínicas, y sólo nueve, del ambiente. Entre las micobacterias de crecimiento lento predominan las cromógenas (14 de 21), mientras que las de crecimiento rápido son fundamentalmente no cromógenas (12 de 21). Sigue existiendo, no obstante, un importante reservorio de «nuevas especies» (32).

Tabla 1. Clasificación de micobacterias no tuberculosas de acuerdo a Runyon. (32)

Especie	Grupo de Runyon
<i>Mycobacterium kansasii</i>	I Fotocromógenas
<i>Mycobacterium marinum</i>	
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	II Escotocromógenas
<i>Mycobacterium szulgai</i>	
<i>Mycobacterium gordonae</i>	
<i>Mycobacterium avium- intracellulare</i>	III No cromógenas
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	IV De crecimiento rápido
<i>Mycobacterium chelonae</i>	
<i>Mycobacterium abscessus</i>	

1.5. Actividad catabólica

Las micobacterias, desde el punto metabólico, son organismos altamente versátiles que no sólo crecen en sustratos comunes, como los azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos, sino también en una gran variedad de hidratos de carbono no saturados, aromáticos y cíclicos. Las micobacterias degradan hidratos de carbono con grupos aromáticos policíclicos, como pireno y fenantreno (15).

Fuentes de carbono y nitrógeno

Las micobacterias pueden desarrollar en medios simples que contengan principalmente una fuente de carbono, otra de nitrógeno y metales iónicos esenciales, incluyendo hierro y magnesio. Es importante notar que si el hierro se elimina del medio, el microorganismo detiene su crecimiento (15).

Las fuentes de carbono incluyen carbohidratos tales como glucosa y glicerol, así como ácidos orgánicos, especialmente ácido pirúvico. Las fuentes de nitrógeno son sales de amonio, amidas o aminoácidos y, en algunos casos, nitratos. Los aminoácidos como glicina, alanina y asparagina fungen como fuentes de nitrógeno.

También la glucosa puede ser oxidada por una vía glicolítica anaerobia o por una vía aeróbica a ácido glucorínico y por una serie de descarboxilaciones a ácido pirúvico, con excepción de *M. bovis* que prefiere piruvato como fuente de carbono. Los compuestos de carbono son oxidados por *M. tuberculosis* hasta dióxido de carbono y agua (15).

De igual forma la histidina, el ácido aspártico y la L-prolina pueden ser utilizadas, pero el crecimiento es más lento. Algunas veces el tiempo de desarrollo puede acortarse en medios de cultivo como el Proskauer y el Beck, los cuales no contienen nitrógeno pero puede ser añadido, a partir de trazas de amonio en el aire, en una atmósfera de nitrógeno (15).

Cuando la fuente de nitrógeno como el malato de amonio o fosfato de amonio, se añade a un medio sintético el crecimiento resulta mejor, comparado con el crecimiento en asparagina (15).

La mayor parte de las micobacterias no requieren factores de crecimiento, o vitaminas en el medio de crecimiento. Excepciones a esto son *M. haemophilum* el cual requiere hemina, y *Mycobacterium paratuberculosis* la cual requiere micobactina para su crecimiento (15).

Fuente de hierro

Las micobacterias son las únicas en la producción de dos sideróforos: exoquelinas y micobactinas. Las primeras son sideróforos extracelulares, que hasta ahora sólo han sido pobremente caracterizadas, y de las que se conocen dos tipos que sólo difieren en su capacidad de solubilidad en solventes orgánicos.

Las micobactinas son altamente hidrofóbicas, por lo cual sólo están localizadas dentro de la envoltura celular micobacteriana y son de gran utilidad en la identificación de micobacterias de crecimiento rápido (15).

El incremento en la concentración de hierro resulta en la represión de estos tres componentes.

Materiales de reserva

Las micobacterias pueden almacenar una gran cantidad de sustancias, tales como triacilglicerol, especialmente cuando crecen en medios con glicerol, dando lugar a la formación de cuerpos grasos (vacuolas lipídicas). Estos lípidos pueden ser utilizados como material de reserva, lo mismo que el glicógeno y la trehalosa (15).

2. IMPORTANCIA CLÍNICA DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.

2.1. Epidemiología

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, incluida el agua dulce (en la que se abarca a la contenida en depósitos de hospitales), suelo, material vegetal, aire, animales (ganado bovino y porcino, peces, monos y aves), plantas o material quirúrgico (32).

Su transmisión suele realizarse a través de las vías respiratoria y digestiva o mediante inoculación directa de la piel. También se puede producir diseminación hematógena a partir de algún foco visceral. El hombre no es un reservorio importante y no parece existir contagio de persona-persona (32).

En general, existe una mayor incidencia en climas cálidos. De forma global hay una mayor afectación en varones (59%) si bien existe cierta prevalencia en mujeres con aislamientos de *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium simiae*. La mayor incidencia se acentúa en torno a la sexta década de la vida. Entre los grupos étnicos más afectados están los hispanos, blancos y negros y, entre los de menor incidencia, los asiáticos y los nativos americanos. El 73% de los casos ocurre en zonas urbanas y el resto en el entorno rural (32).

2.2. Factores de riesgo

El factor de riesgo más importante asociado a la enfermedad por micobacterias no tuberculosas es el tabaco (66%), seguido de la enfermedad pulmonar crónica (42%), la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, 26%) y el alcoholismo

(20%). El enfisema y la bronquitis crónica son las patologías sistémicas asociadas a más frecuencia. El VIH, los medicamentos inmunosupresores y la reducción en la inmunidad cruzada entre las micobacterias, al existir un menor número de casos de contacto con el *M. tuberculosis*, se ha propiciado un mayor espectro de personas susceptibles a las micobacterias no tuberculosas. En el caso de pacientes portadores del VIH, una disminución en el recuento de CD4 por debajo de 40 células, aumenta el riesgo en 2,5 veces de infección diseminada por micobacterias no tuberculosas (32).

2.3. Formas clínicas

Las formas clínicas producidas por micobacterias no tuberculosas incluyen enfermedad pulmonar, linfadenitis, infección a través de catéteres, afectación esquelética, enfermedad diseminada, infecciones en piel y tejidos blandos (véase tabla 2).

De todas ellas, la enfermedad pulmonar es la principal manifestación (62%), siendo el complejo *M. avium* el principal causante (32).

Tabla 2. Enfermedades asociadas a micobacterias (32).

Enfermedad	Micobacteria implicada
Enfermedad broncopulmonar crónica	<i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i>
Linfadenitis Esquelética	<i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. chelonae</i>
Infección diseminada	VIH + Complejo <i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> , VIH + <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i>
Infección a través de catéteres	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i>
Piel y tejidos blandos	<i>M. marinum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i>

Las linfadenitis se presentan en niños dentro de un rango de edad de 16 meses a 10 años, si bien la edad media es en torno a los 3 años (32).

No parecen existir factores de riesgo asociados y se localizan en la región submandibular o preauricular, caracterizándose por aumento progresivo de tamaño en la forma asintomática, hasta un momento dado, en que comienzan a supurar (32).

En niños, sólo del 10% de las linfadenitis periféricas producidas por micobacterias se aísla a *M. tuberculosis*, recuperándose en el resto a *M. avium* y *M. scrofulaceum*, a diferencia de los adultos, entre quienes en el 90% con este cuadro clínico se detecta a *M. tuberculosis* (32).

En el 80% de las linfadenitis por micobacterias no tuberculosas se aísla al complejo *M. avium*. Los catéteres contaminados son más frecuentes en infecciones por

M. fortuitum, *M. chelonae* y *M. abscessus*. Menos comunes son los casos de artritis, sinovitis y osteomielitis (32).

Los casos diseminados se suelen presentar en pacientes inmunodeprimidos con infecciones por *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. Desde el punto de vista dermatológico, existen multitud de formas de presentación tales como pápulas, placas, nódulos, abscesos, etc. Algunas micobacterias no tuberculosas adoptan ciertos patrones morfológicos en cuanto a su distribución corporal. De esta forma, el patrón esporotricoides es más frecuente en *M. marinum* y *M. kansasii*, siendo poco frecuente en *M. chelonae* (32).

2.4. Inmunidad

Los antígenos micobacterianos son complicados y consisten en complejos de proteínas, polisacáridos y lípidos (13).

En el caso de *M. tuberculosis*, la defensa del organismo radica en la respuesta inmune celular. Esta interacción en el organismo consiste en el desarrollo de hipersensibilidad retardada; la respuesta celular trae como resultado la formación de la lesión primaria en el pulmón y la positividad al derivado proteico purificado (PPD) (13).

Sin embargo, en cuanto a la presencia de MNT (micobacterias no tuberculosas), no se sabe con exactitud cuál es el tipo de interacción entre el huésped y la micobacteria.

Si los bacilos de la tuberculosis fueron inhalados, éstos alcanzan los alvéolos y son retenidos. Y como es descrito por Youmans, los bacilos fagocitados, se multiplican

lentamente en neutrófilos y macrófagos alveolares. En caso de reinfección por reinoculación de un caso activo o por activación de una vieja infección, el desarrollo de necrosis en la lesión es resultado de la hipersensibilidad a la tuberculina, que se desarrolla en el curso de una primoinfección (13).

La patología de la tuberculosis es descrita por Dannenberg, quien la detalla como la contribución de una reacción inmune al progreso de la enfermedad. La relación entre la hipersensibilidad y la respuesta celular inmune fluctúa durante las diversas etapas de la infección, por los niveles de antígeno presente, macrófagos acumulados, inicio de la activación y destrucción de los bacilos; pero cuando los niveles de antígeno presente son grandes, la enfermedad es progresiva y ocurre necrosis en el tejido (13).

2.5. Susceptibilidad

Para determinar el patrón de susceptibilidad de las micobacterias, debe considerarse a la resistencia como un fenómeno al azar, el cual es independiente a la exposición a los agentes antimicrobianos, la correlación *in vivo* entre la respuesta clínica a un agente antimicrobiano y la respuesta de las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, pues se ha encontrado que si más del 1% de los bacilos tuberculosos de un paciente son resistentes al fármaco *in vitro*, el tratamiento será inútil (18).

2.6. Tratamiento

La American Thoracic Society (ATS) recomienda usar como prueba de identificación a la susceptibilidad que presentan ciertas micobacterias a algunos fármacos:

Susceptibilidad del complejo *M. avium*. En esta prueba se recomienda el uso de Claritromicina en un tratamiento con macrólidos. No se recomienda el uso de Rifabutina.

Susceptibilidad de *M. kansasii*. Esta prueba sólo incluye a la susceptibilidad a la Rifampicina, debido a que la Isoniazida y Estreptomina dan resultados falsos.

Susceptibilidad en las micobacterias de crecimiento rápido. Incluye Amikacina, Doxiciclina, Imipenem, Quinolonas, Sulfamidas, Cefoxitina y Claritromicina.

Tratamiento de micobacterias en las enfermedades pulmonares. La Claritromicina o Rifabutina pueden ser sustituidas por Rifampicina en pacientes con VIH a los que se administren inhibidores de proteasa. La Pirazinamida no suele ser una alternativa o no debe utilizarse como un tercer fármaco, debido a que los aislados de *M. kansasii* son resistentes a ella.

Tratamiento de enfermedades pulmonares causadas por *M. avium*. La Rifabutina, un derivado de la Rifamicina S, presenta una mejor actividad. Los fármacos usados para *M. avium* se caracterizan por tener una alta toxicidad. Un régimen empírico combina Claritromicina y, usualmente, Etambutol y Rifamicina (Rifampicina o Rifabutina). Los pacientes pueden tolerar estos tres fármacos hasta en un 90% y la Rifabutina es preferida a la Rifamicina, porque es más activa *in vivo*, aunque con más efectos secundarios (uveítis y leucopenia).

Todas las cepas no tratadas con anterioridad son susceptibles a los macrólidos.

Tratamiento de MNT en linfadenitis cervical. Generalmente está mejorada con la escisión quirúrgica. Un régimen que incluya Claritromicina está considerado para pacientes con enfermedad extensiva o pobre respuesta a la cirugía.

Tratamiento para enfermedades no pulmonares por micobacterias de crecimiento rápido. Incluye fármacos como la Amikacina y Claritromicina, basándose en susceptibilidad *in vitro*.

Las infecciones pulmonares causadas por *Mycobacterium malmoeense*, *Mycobacterium xenopi* y *Mycobacterium szulgai* son tratadas con una combinación de Etambutol, Isoniazida, Rifampicina y Claritromicina, aunque también la Ciprofloxacina, Claritromicina y Rifampicina son sugeridos para el tratamiento de *M. haemophilum*. Las pruebas de susceptibilidad para estas micobacterias de lento crecimiento incluyen a estos cinco fármacos, aunque para *M. marinum*, los fármacos de elección son Rifampicina, Etambutol, Doxiciclina o Minociclina, Claritromicina y Sulfonamida.

La infección por micobacterias de rápido crecimiento tales como *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, puede ser neutralizada con Amikacina, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Claritromicina, Doxiciclina, Imipenem y Sulfonamida.

Tratamiento para enfermedades causadas por *M. kansasii*. Las cepas susceptibles, pueden ser inhibidas por Rifampicina, Isoniazida, Etambutol, Etionamida, Estreptomina y Claritromicina. Algunos aislados se reportan como resistentes a Isoniazida 0.2 a 1 µg/mL y a la Estreptomina 2 µg/mL.

M. kansasii es también susceptible *in vitro* a los fármacos Claritromicina, Sulfametoxazol, Amikacina, algunas quinolonas y Rifabutina. Adquiere resistencia a Rifampicina, Etambutol e Isoniazida, lo que ha sido demostrado en aislados en los cuales el tratamiento no ha dado resultados.

Para el tratamiento de enfermedad extrapulmonar en adultos, el régimen de fármacos antimicobacterianos es el mismo que para la enfermedad pulmonar.

Azitromicina y Claritromicina intermitentes (tres veces por semana), demuestran tener eficacia para enfermedades pulmonares causadas por el complejo *M. avium* y el uso de Estreptomicina intermitente para los primeros dos a tres meses de terapia puede ser considerado, adicionado a otro régimen terapéutico, para enfermedades extensivas. La dosis exacta de Estreptomicina en un régimen multifármaco dependerá de la masa corporal, así como de la edad del paciente.

Los pacientes deben estar pendientes de los signos y síntomas que pueden presentar por efectos secundarios (tinitus, disminución de la audición y comportamiento inestable), cuando se les administra Estreptomicina; esto contribuirá a un régimen terapéutico adecuado.

Para monitorear los efectos tóxicos de la terapia deben considerarse los siguientes síntomas: agudeza visual (Etambutol y Rifabutina), discriminación de los colores verde y rojo (Etambutol), enzimas del hígado (Claritromicina, Azitromicina, Rifabutina, Rifampicina, Isoniazida y Etionamida), función auditiva y vestibular (Estreptomicina, Amikacina, Claritromicina y Azitromicina), función renal (Estreptomicina y Amikacina), cuenta total de leucocitos y plaquetas (Rifabutina) y sistema nervioso central (Cicloserina).

Tratamiento de enfermedades extrapulmonares localizadas, causadas por *M. avium*.

La escisión quirúrgica, a falta de quimioterapia, es recomendada en niños con linfadenitis cervical por el complejo *M. avium* y *M. scrofulaceum*. Una alternativa para enfermedades recurrentes en niños, en los cuales el riesgo es alto, consiste en el

empleo de un régimen multifármaco con Claritromicina, como en el caso de las enfermedades pulmonares.

Para pacientes adultos con enfermedad localizada que involucra tejidos blandos, tendones, piel, articulaciones y, ocasionalmente hueso, se emplea una combinación de escisiones quirúrgicas y quimioterapias.

La Amikacina y la Estreptomicina son activas y cualquiera suele ser considerada para su uso en pacientes con síntomas severos, especialmente como parte del inicio de la terapia.

M. fortuitum, *M. abscessus* y *M. chelonae* son resistentes a los agentes antituberculosos, pero susceptibles a los agentes antibacterianos. Aislados de *M. fortuitum* son susceptibles a Amikacina (100%), Ciprofloxacina y Ofloxacina (100%), sulfonamidas (100%), Cefoxitina (80%), Imipenem (100%), Claritromicina (80%) y Doxiciclina (50%).

M. abscessus es susceptible a Claritromicina (100%), Clofazimina, Amikacina (90%) y Cefoxitina (70%) e Imipenem (50%). *M. chelonae* es susceptible a Amikacina (80%), Tobramicina (100%), Claritromicina (100%), Imipenem (60%), Clofazimina, Doxiciclina (25%) y Ciprofloxacina (20%). Las enfermedades cutáneas causadas por estos tres microorganismos dan buenos resultados en muestras *in vitro*, cuando se le aplican los siguientes fármacos: Claritromicina, Imipenem, Cefoxitina, Cefmetazol y Amikacina.

La primera línea de antituberculosos (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, etc.) no es útil para el tratamiento de enfermedades causadas por micobacterias de

crecimiento rápido con la excepción de Etambutol, hacia el cual *M. smegmatis* es susceptible.

Para *M. chelonae*, la Tobramicina es más activa que la Amikacina *in vitro*; la Claritromicina, Clofazimina, Ciprofloxacina y Doxiciclina, son los únicos fármacos orales con buenos resultados.

Para *M. abscessus* los únicos fármacos efectivos por vía oral son Clofazimina y Claritromicina y del tratamiento de enfermedades cutáneas causadas por *M. marinum*, se recomienda Rifampicina y Etambutol, Estreptomina (medianamente susceptible); la especie presenta resistencia a Pirazinamida e Isoniazida.

M. malmoense es susceptible a Etambutol, Rifampicina y Estreptomina.

Los aislados de *M. simiae* son resistentes a la primera línea de fármacos antituberculosos y su respuesta a las quimioterapias es variable. Si la enfermedad es diseminada o progresiva se recomienda el uso de 4 fármacos: Claritromicina, Etambutol, Rifabutina y Estreptomina.

M. szulgai es susceptible a Rifampicina y a grandes concentraciones de Isoniazida, Estreptomina y Etambutol.

Para *M. xenopi* la susceptibilidad a los fármacos es variable, pero mejora con una combinación de Rifampicina y Estreptomina (2).

2.7. Preservación

La preservación por congelación es la más utilizada en las especies micobacterianas y otras bacterias, si bien las células microbianas pueden ser dañadas durante la congelación y su subsiguiente descongelación. Las células bacterianas pueden ser

protegidas durante el congelamiento vía la adición de varios crioprotectores tales como el glicerol y el DMSO (dimetil sulfóxido). Las temperaturas de almacenamiento son generalmente de -20 , -70 y -80°C ; aunque también a -140°C en nitrógeno líquido en fase vapor, o a -196°C en nitrógeno líquido fase líquida (1).

2.8. Aplicaciones

Las aplicaciones más reconocidas que se le han dado a las micobacterias residen en la producción de la vacuna BCG (*Bacillus Calmette Guérin*), la cual se deriva de *M. bovis*, y en la prueba de la tuberculina con proteína extraída de cultivos micobacterianos. La tuberculina es utilizada en el diagnóstico previo de reacciones de hipersensibilidad en la piel o en la detección de infecciones previas o presentes en los pacientes (15).

Las micobacterias son usadas en el área de biocatálisis en el desarrollo y transformación de reacciones, en las cuales se utiliza al microorganismo en sí, o a alguna de sus enzimas (15).

En el área de biotecnología, un gran número de aplicaciones comerciales son utilizadas para la biotransformación de esteroides el proceso contempla de una forma o de otra (natural o sintética) la transformación del núcleo esteroidal o la degradación selectiva de algún lugar de la cadena de los esteroides naturales como el colesterol y el β -sitosterol. Los productos formados pueden, subsecuentemente, ser transformados a esteroides activos farmacológicamente. La degradación del colesterol por las micobacterias requiere de un largo periodo de tiempo y abarca degradaciones simultáneas en la cadena y el núcleo esteroidal. La modificación selectiva de alguno

de los núcleos esteroidales en la cadena puede ser empleado para la inhibición de los procesos de biotransformación, o para el uso de alguna mutación; por ejemplo, mutantes de *M. fortuitum* bloquean en varios pasos la degradación del sitoesterol.

Otra aplicación potencial de las micobacterias en el campo de la biocatálisis es la producción de epóxidos ópticamente activos de alquenos; estos compuestos también pueden ser usados en compuestos farmacéuticos (15).

Por otro lado, las micobacterias que crecen en presencia de alquenos producen los epóxidos: 1,2-epoxipropano, 1,2-epoxibutano y 2,4-epoxi-1-cloropropano, y una gran cantidad de enantiómeros (15).

Otra área importante para el uso de las micobacterias es la biotecnología ambiental, en donde se emplean cepas de micobacterias para eliminar el clorovinilo del desperdicio industrial de gases. También se sugiere el uso de micobacterias en procesos de biorremediación de sedimentos contaminados (15).

Una desventaja de las micobacterias en general es su lento crecimiento, lo cual se ve reflejado en su baja actividad catalítica. Sin embargo, las micobacterias juegan un papel importante por su capacidad biocatalítica y, ahora, con el desarrollo de la genética molecular, puede potenciarse su aplicación (15).

III MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS

3.1. Grupo I clasificación de Runyon

Mycobacterium kansasii

Es un bacilo ácido alcohol resistente indistinguible morfológicamente de *M. tuberculosis*, que se dispone en forma de cadena, de lento crecimiento y fotocromógeno, que se aisló en 1953 y su temperatura óptima de desarrollo es de 37°C. Su hábitat natural es el medio acuático, detectándosele en piscinas, depósitos de agua o en aguas residuales. En el agua corriente es capaz de sobrevivir durante un año (32) y se le ha aislado de biofilms, presentes en sistemas de aguas, con *M. avium*, *M. xenopi*, *M. gordonae* y *M. marinum* (13).

Afecta principalmente a personas inmunodeprimidas, como los pacientes con SIDA, trasplantados renales, lupus eritematoso sistémico, cánceres hematológicos, vasculitis, dermatomiositis, leiomiomas, tratados con corticoides sistémicos por tiempo prolongado, etc. En el 72% de los pacientes existe algún trastorno inmunodepresivo que favorece la aparición y diseminación de las lesiones; y en el 28% restante aparece en pacientes inmunocompetentes (32).

En estos casos el modo de infección es a través de pequeños traumatismos cutáneos, aunque existen casos de lesiones diseminadas en paciente inmunocompetente asociado a tuberculide papulonecrótica (32).

El primer caso de lesiones cutáneas por esta micobacteria data de 1965 y, hasta 2001, se habían registrado 45 casos adicionales. Predomina en varones en torno a la

quinta década de la vida y su principal manifestación clínica es en forma de infección pulmonar, sobre todo en pacientes con enfermedad respiratoria previa (32).

Otras formas de presentación son la linfadenitis en niños, meningitis, tendinitis, sinovitis, infecciones oculares, artritis, empiema, osteomielitis, síndrome del túnel carpiano e infecciones hepáticas o esplénicas (32).

La forma de presentación clínica es muy variada, al igual que sucede con otras micobacterias y entre sus principales manifestaciones clínicas se han descrito nódulos, pápulas, pústulas, úlceras, celulitis, lesiones esporotricoides, etc., de carácter generalmente indoloro (32).

Mycobacterium marinum

Este bacilo ácido alcohol resistente fue descrito por primera vez en 1926, por Aronson, en peces de agua salada de un acuario de Philadelphia (32).

En 1951 se aisló como patógeno humano en nadadores de una piscina en Suecia y ha recibido también las denominaciones de *Mycobacterium platypoecilus* y *Mycobacterium balnei*, aunque posteriormente se demostró que ambos términos hacían referencia a una misma micobacteria (32).

Pertenece al grupo I de Runyon, de bacterias fotocromógenas, crece a temperaturas de 30-32°C en 5 a 14 días (velocidad de crecimiento moderada), su hábitat principal es el agua de mar y la estancada y, entre los factores de riesgo, se encuentran las actividades relacionadas con peces y agua dulce o salada contaminadas como los acuarios, tanques de agua y piscinas. Se le puede hallar también en granulomas por picadura de erizo (32).

La puerta para su entrada suelen ser pequeñas erosiones o traumatismos, si bien las lesiones pueden desarrollarse después del contacto con agua contaminada, en ausencia de algún trauma previo. En un tercio de los casos se le localiza en extremidades, con más frecuencia en las superiores, concretamente en dedos y la cara posterior de las manos. En las extremidades inferiores, la rodilla y la región pretibial son los lugares más afectados (32).

Puede presentarse en lesiones nodulares, esporotricoides o diseminadas. La distribución esporotricóide es la forma más frecuente, sobre todo cuando la infección es contraída por contagio en acuarios. Este patrón aparece en el 20-40% de todos los pacientes (32).

La infección por *M. marinum* no suele cursar con sintomatología sistémica, rara vez puede producir sinovitis u osteomielitis y, en casos excepcionales, llega a diseminarse. Tras un periodo de incubación de 2 a 3 semanas, se forma una pápula o pústula que evoluciona a una úlcera costrosa o un absceso. Las lesiones suelen ser autorresolutivas, cicatrizando en 1 a 3 años; por lo tanto, dado que no se sabe qué evolución van a tener, es conveniente iniciar el tratamiento cuando se confirma el diagnóstico (32).

El diagnóstico diferencial incluye, entre otros; al de esporotricosis, leishmaniasis, tuberculosis cutánea, micosis o granulomas por cuerpo extraño (32).

3.2. Grupo II clasificación de Runyon

Mycobacterium szulgai

El nombre de szulgai se debe al microbiólogo polaco T. Szulga (33).

M. szulgai es una micobacteria de significado clínico que fue reconocido por los lípidos de su pared celular por medio de cromatografía.

Son bacilos oblicuos, productores de colonias lisas o rugosas en un medio de base de huevo en dos semanas a 37°C (33).

Es una micobacteria escotocromógena del grupo II de Runyon descrita por primera vez en 1972 sin que hoy día esté aclarado su origen ambiental. Se trata de un patógeno humano muy poco frecuente; en la literatura especializada, hasta el año 2000, sólo se habían identificado en una treintena de casos como causante de enfermedad pulmonar en pacientes con afectación previa en forma de enfermedad cavitaria o fibrosis. Cursa como si fuera una tuberculosis convencional con infiltrados en los lóbulos superiores o cavitación (32).

A la escasez de casos pulmonares hay que añadir la dermatológica, con tan sólo 5 casos descritos hasta el año 2000. La mayor parte de casos descritos están asociados a inmunodepresión. Pueden presentarse en forma de pápulas eritematosas ocasionalmente ulceradas. Existen pacientes con infección por esta micobacteria en forma de síndrome del túnel carpiano asociado a tenosinovitis, osteomielitis o de queratitis tras cirugía ocular con Láser (32).

En contraste con otras micobacterias, este organismo es susceptible a los medicamentos de primera y segunda línea.

Mycobacterium gordonae

Bacilo gram-positivo, no móvil y moderadamente ácido alcohol resistente, comúnmente encontrado en la tapa de tinacos de agua y en el suelo.

M. gordonae fue denominado así en honor de Ruth E. Gordon. Anteriormente, era conocido como “bacilo del agua del grifo” y como *Mycobacterium aquae* (33).

M. gordonae es una micobacteria de crecimiento lento, que necesita 10 a 25 días de incubación a 37°C. Las colonias son habitualmente redondas, lisas, convexas y brillantes. Presentan una pigmentación amarillo-naranja que se produce tanto en la oscuridad como en presencia de luz, si bien con esta última la coloración es más intensa (33).

Existen muy pocos casos descritos de infección por esta micobacteria perteneciente al grupo II de Runyon que normalmente se considera contaminante, encontrándose tan sólo 21 casos hasta 1992, incluso en pacientes inmunodeprimidos o con alteraciones en los estudios radiológicos torácicos. Se considera no patógena, pudiendo encontrarse otras causas o agentes microbiológicos que expliquen estas alteraciones (32).

Frecuentemente es encontrado como agente causal en esputo humano, y lavados gástricos (33).

A pesar de su amplia distribución, tanto en el suelo como en el agua, tampoco se han descrito brotes epidémicos verdaderos con esta micobacteria, lo que refleja su baja patogenicidad. Sí se han observado brotes pseudoepidémicos relacionados con el empleo de medios Bactec contaminados, o por agua contaminada. Es necesario, para que sea considerado patógeno, su aislamiento repetido en las muestras que se

remiten para estudios de laboratorio, la presencia de colonias múltiples en cada medio de cultivo y de enfermedad clínica y/o histología compatible con infección por micobacterias y la erradicación del microorganismo conforme mejora la situación clínica del paciente (32).

Algunos autores apoyan el hecho de su patogenicidad ante su aislamiento en pacientes con infección pulmonar, lesiones cutáneas, peritonitis, endocarditis, bacteriemia, o ileítis. En el caso de afectación pulmonar esta es más frecuente en varones entre la quinta y octava década de la vida con enfermedad pulmonar previa, localizándose radiológicamente a nivel de los lóbulos superiores. Muchos de estos casos acaban por ser crónicos a pesar de los tratamientos (32).

Las lesiones que afectan a piel y tejidos blandos, son más frecuentes en mujeres jóvenes sin enfermedad de base, sin síntomas sistémicos asociados y con respuesta favorable a los tratamientos. Suelen localizarse en sitios de traumatismos como las extremidades y desde el punto de vista dermatológico cursan con pápulas, placas, nódulos o úlceras (32).

Los siguientes criterios podrían ser útiles para diagnosticar una verdadera infección causada por *M. gordonae*: a) aislamientos múltiples del microorganismo en muestras clínicas del mismo origen o de otras localizaciones; b) la detección del microorganismo en frotis o secciones histológicas; c) el crecimiento de éste en diferentes medios de cultivo; d) la presencia de múltiples colonias en cada medio de cultivo; e) la presencia de enfermedad clínica o hallazgos histopatológicos consistentes con la etiología micobacteriana y f) desaparición del microorganismo de las muestras biológicas tras la mejoría clínica.

Existen sondas comerciales de ácidos nucleicos, marcadas con esteres de acridina complementarias del RNA ribosómico de *M. gordonae*, que permiten la identificación de las cepas en menos de una hora, con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100% (3).

También es posible llegar a la identificación mediante técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o de secuenciación del gen *16S rRNA*, pero no están al alcance de todos los laboratorios, y menos aún si hablamos de laboratorios clínicos, debido a su complejidad o laboriosidad. Más asequibles y rápidas resultan las técnicas que analizan los patrones de bandas obtenidos mediante PCR-enzimas de restricción (PRA), o mediante tiras reactivas, recientemente comercializadas, que permiten detectar la hibridación del DNA biotinilado de la micobacteria con sondas específicas inmovilizadas en la propia tira reactiva (25,7).

Mycobacterium scrofulaceum

Bacilos cortos o largos, filamentosos, ácido-alcohol resistentes; su aislamiento fue reportado en 1956 por Leed, como una micobacteria pigmentada a partir de nódulos linfáticos cervicales de niños. En 1957, Prissick y Masson propusieron el nombre de *M. scrofulaceum* para este organismo, término derivado de escrofula que significa linfadenitis tuberculosa.

Las colonias en agar suplementado con albúmina y ácido oleico, o en medio con base de huevo, son usualmente lisas con una coloración de amarillo a naranja en siete o más días de incubación a 37°C. Ocasionalmente las colonias suelen ser rugosas y su temperatura óptima de crecimiento es a 35°C (33).

En humanos es común encontrarlo en secreciones, esputo y lavados gástricos; suele ser un agente causal o estar presente en enfermedades pulmonares (33).

Figura como el segundo agente causal de linfadenopatías cervicales, precedido tan sólo por *M. avium Intracellulare* (33).

Esta micobacteria de crecimiento lento se encuentra en agua y en el tracto respiratorio humano. Sus principales manifestaciones clínicas son linfadenitis cervical en niños y enfermedad pulmonar en adultos (32).

Suele presentarse en paciente de 3 años de edad, siendo en menores de 5 años el 80% de los casos. Existe una ligera preponderancia en mujeres y una predilección estacional en invierno y primavera (32).

Resulta fundamental, en el caso de la linfadenitis, saber si el germen causante es *M. tuberculosis* o una micobacteria no tuberculosa, dado que el tratamiento en el primer caso es la asociación de cirugía y antibioterapia, además de las consideraciones epidemiológicas específicas que se derivan de dicha enfermedad; por el contrario, de demostrarse una micobacteria no tuberculosa, el tratamiento es fundamentalmente quirúrgico. Con más probabilidad estaremos ante una linfadenitis por micobacterias no tuberculosas en el caso de que la prueba de Mantoux sea inferior a 15 mm, la radiografía de tórax sea normal, la ausencia de exposición ante otro paciente con tuberculosis, la prueba de Mantoux negativa en los miembros familiares y la edad del paciente menor de 4 años (32).

Se manifiesta como un nódulo localizado preferentemente en la región yugular o submandibular, unilateral, eritematoso o violáceo, que puede fistulizar en el 20% de

los casos. El tono violáceo de la piel parece ser característico de infección por micobacterias no tuberculosas (32).

Es de carácter asintomático o levemente doloroso y no se suele acompañar de síntomas sistémicos (32).

De forma excepcional puede producir lesiones cutáneas en forma de papulopústulas a través de traumatismos en dedos, así como cuadros diseminados (32).

Este organismo también es aislado en ganglios linfáticos cervicales y submandibulares e inguinales. En una paciente joven este organismo fue considerado como el resultado de una infección vaginal.

Se ha asociado a síndrome de Sweet, lupus eritematoso sistémico, y osteomielitis (32).

3.3. Grupo III clasificación de Runyon

Mycobacterium chelonae

El término chelonae hace referencia al género al que pertenece la tortuga marina (*Chelonia corticata*) de donde fue aislado en el pulmón por Bergey en 1923 (32).

Su temperatura de crecimiento óptima está entre 28-32°C, y se constituye como el patógeno más importante del grupo III de Runyon. Se encuentra en el agua y en el suelo (32).

En pacientes trasplantados la infección se manifiesta en promedio a los 3.5 años después de haber recibido el trasplante. Se ha descrito en pacientes con dermatosis como síndrome de Sweet y dermatomiositis (32).

Los principales factores de riesgo para sufrir enfermedad cutánea por *M. chelonae* son los traumatismos previos y los tratamientos con corticoides, también se han descrito infecciones por catéteres peritoneales, intervenciones de dacriocistorrinostomía, terapia con láser en miopía, liposucciones, con el uso de violeta de genciana contaminado, en intervenciones de cirugía plástica, traumatismos por el uso de lavaplatos, depilación, inyecciones, uso de broncoscopios, heridas superficiales, o en pacientes que tenían tortugas como mascotas. También existen casos idiopáticos (32).

Además de la afectación cutánea, que suele ser la principal manifestación, esta micobacteria se ha visto relacionada en casos de endocarditis tricuspídea, abscesos tiroideos, linfadenitis, lesiones gingivales, queratitis (32).

El periodo de incubación oscila entre 3 semanas y 6 meses. La principal presentación cutánea es la forma diseminada con 5 a 100 nódulos eritematosos circunscritos o con tendencia a confluir en grandes masas con fístulas de drenaje múltiples. También se puede presentar como nódulos subcutáneos simulando lesiones vasculíticas. Se suelen localizar en las regiones dorsales de las extremidades. Preferentemente afectan las extremidades inferiores (32).

Las lesiones de mayor tamaño pueden ser dolorosas y son raros los síntomas sistémicos. En raras ocasiones, puede precederse de afectación pulmonar, o de fiebre periódica (32).

La segunda forma de presentación, en orden de frecuencia, es la celulitis localizada, abscesos subcutáneos o la osteomielitis. La tercera forma es la relacionada con el uso de catéteres (32).

De no tratarse, las lesiones tienden a hacerse crónicas, y diseminarse en pacientes inmunodeprimidos (32).

Mycobacterium haemophilum

Descrito por Sompolinsky y colaboradores en 1978 a partir de úlceras cutáneas en un paciente con enfermedad de Hodgkin. Pertenece al grupo III de Runyon y requiere, a diferencia del resto de micobacterias, la presencia de hemoglobina o hemina en los medios de cultivo y una temperatura óptima entre 30 a 32°C. Para su aislamiento, también se necesitan periodos que oscilan entre 14 a 28 días. Estas dos características han propiciado que los trabajos publicados sean escasos (menos de 120 casos descritos en la literatura médica) (32).

Parece existir crecimiento en menor grado a temperaturas de 37°C precisando, en este caso, periodos prolongados de incubación, de forma similar a lo que ocurre con otras especies de micobacterias no tuberculosas como *M. marinum* y *M. ulcerans* (32).

En grandes series de pacientes estudiados, las formas de presentación más frecuente son las lesiones cutáneas, seguidas de enfermedad pulmonar, artritis y osteomielitis. La mayor parte de pacientes se encuentran inmunodeprimidos, sometidos a trasplantes de médula ósea, infección por VIH o cánceres hematológicos (32).

En el caso de SIDA, pueden producirse artritis sépticas poliarticulares, especialmente con recuentos bajos de CD4. Otro grupo de riesgo son los niños con linfadenitis perihiliar y cervical (32).

Las lesiones cutáneas suelen ser múltiples y generalmente afectan a las extremidades. Otras localizaciones menos frecuentes son la cara, abdomen, nalgas y mamas. Se presentan en forma de pápulas, pústulas, abscesos y úlceras. También se han descrito lesiones purpúreas y anulares (32).

Mycobacterium fortuitum

Fue aislado en ranas por Kuster en 1905 (32).

Pertenece al grupo III de Runyon y requiere una temperatura óptima de 28°C para su cultivo, apareciendo las primeras colonias de 3 a 7 días. Se encuentra en el agua, suelo, polvo y animales.

La puerta de entrada proviene de procedimientos quirúrgicos como la aplicación de catéteres, liposucciones, polipectomías, inyecciones epidurales, esternotomías, extracciones dentarias, agujas de electromiografía, mamoplastías o implantación de prótesis mamarias de silicona, por lo que parece estar implicado material quirúrgico contaminado. A veces, puede ser debido a la administración de enemas.

La infección por VIH no parece incrementar el riesgo de infección. Las formas diseminadas son poco frecuentes, describiéndose el primer caso a comienzos de la década de 1990 en un paciente adicto a drogas por vía parenteral y con SIDA.

Puede ocasionar un amplio espectro de enfermedades como endocarditis, meningitis, neumonías, queratitis, fístulas perianales, linfadenitis, osteomielitis, tenosinovitis y lesiones cutáneas. Estas últimas se pueden presentar como celulitis, abscesos, nódulos o úlceras que drenan un material serosanguinolento o purulento con zonas de necrosis subcutánea y linfadenopatías regionales. También puede presentarse

como múltiples lesiones papulopustulosas. Sin el tratamiento adecuado las infecciones pueden persistir por periodos de 8 años (32).

Mycobacterium avium-intracellulare

Pertenece al grupo III de Runyon. Se trata de una micobacteria no tuberculosa de distribución universal que se aísla en agua, suelo, polvo doméstico y en diversos animales como pájaros, ganado bovino y porcino. Es abundante en climas templados, con aguas y terrenos ácidos y pantanosos. Crece lentamente a 37°C (32). Puede afectar a pacientes con sarcoidosis sistémica o leucemia. La infección suele contraerse por vía respiratoria, siendo la enfermedad pulmonar crónica la forma más frecuente de presentación (32).

En Estados Unidos está considerada la micobacteria no tuberculosa que causa con más frecuencia, enfermedad pulmonar en pacientes no afectados por el VIH. En pacientes con SIDA se presenta de forma diseminada en recuentos inferiores a 100 CD4/mL.

La afectación cutánea es poco frecuente. Existen tres formas de presentación que incluyen; úlceras o nódulos subcutáneos aislados producidos por inoculación traumática en tronco o extremidades; linfadenitis cervical que puede evolucionar a un absceso cutáneo y múltiples nódulos o úlceras en casos diseminados. En estos últimos, se observa la presencia de fiebre, adelgazamiento, anorexia, dolor óseo y abdominal, diarrea, linfadenopatías y esplenomegalia, detectándose en los hemocultivos en medios especiales en más del 90% de los casos. También se puede

diagnosticar mediante el cultivo del aspirado de médula ósea o por el estudio de la biopsia cutánea (32).

Se atribuye a estas micobacterias el 80% de los casos de linfadenitis y el 20% restante a *M. scrofulaceum*. También puede simular lesiones de sarcoidosis cutánea (32).

Mycobacterium ulcerans

Bacilos moderadamente largos, su crecimiento se evidencia en medio a base de huevo después de cuatro semanas de incubación de 30 a 33°C, con colonias transparentes, las cuales al inicio son convexas y lisas, con un contorno irregular, y superficie rugosa amarilla. Forman cordones en agar con ácido oleico y albúmina (33).

Hay abundante crecimiento en temperaturas de 30 a 33°C, pero, poco crecimiento a 25°C y es muy inusual que crezca a 37°C (33).

El primer caso confirmado fue publicado en 1948 por MacCallum y colaboradores en Australia. Si bien, los primeros casos fueron descritos en 1897 por Sir Albert Cook en Uganda, no fueron publicados en revistas médicas. En dicho país, existe una zona endémica donde se han descrito gran cantidad de casos en los años 1950, de donde toma el sobrenombre de «úlceras de Buruli». Suele encontrarse en zonas próximas a los ríos o en aguas estancadas; por ello, afecta, en la mayor parte de los casos, a la población rural de países tropicales o subtropicales. Se han descrito también casos esporádicos en Europa (32).

El microorganismo causante crece mejor a temperaturas de 30 a 32°C, y produce una toxina denominada micolactona, que es responsable de la destrucción tisular.

Suele afectar principalmente a niños y adolescentes. Se transmite a partir de heridas o picaduras de insectos, su localización más frecuente, es en las extremidades inferiores. Se desconoce el modo de transmisión, pero parece que podrían estar implicados ciertos insectos acuáticos de las especies *Naucoris* y *Dyplonychus*.

El periodo de incubación es aproximadamente de 2 meses, a partir de los cuales, se desarrolla en la puerta de entrada, un nódulo asintomático o pruriginoso de 1 a 2 cm de diámetro, que evoluciona a una úlcera indolente de crecimiento lento y progresivo que no se suele acompañarse de síntomas sistémicos (32).

No hay presencia de células gigantes, en humanos no presenta reacciones inflamatorias pero hay áreas con necrosis lipídica y tejido dañado (33).

También existen lesiones tipo pápular, formación de placas o forma edematosas. En ocasiones, pueden desarrollarse osteomielitis u osteítis subyacentes (32).

Existen casos de afectación diseminada, descritos en pacientes infectados por el VIH. Como datos clínico-epidemiológicos que pueden orientar a su diagnóstico figura el hecho de que el paciente viva o haya viajado a zonas endémicas, que sea menor de 15 años de edad y que la lesión esté localizada en las extremidades inferiores (32).

Sin aplicar ningún tratamiento, las lesiones suelen ser autorresolutivas en un plazo de 3 a 6 meses, pero a costa de dejar secuelas irreversibles con formación de cicatrices retráctiles y contracturas (32).

Mycobacterium abscessus

Se encuentra ampliamente distribuido, puede ser aislada del suelo, polvo y agua.

Presenta resistencia a los métodos de esterilización y desinfección, por lo que puede verse implicado en brotes de infecciones nosocomiales (32).

En la mayor parte de los casos descritos en seres humanos se adquiere por la inoculación ante traumatismos accidentales, intervenciones quirúrgicas o inyecciones (32).

La identificación y diferenciación de las especies de *M. chelonae* y *M. abscessus*, tiene poca relevancia a la hora de diferenciar cuadros clínicos, puesto que estos son muy parecidos, con la excepción de que un 90% de las enfermedades pulmonares son producidas por *M. abscessus* y que la mayor parte las infecciones cutáneas diseminadas están provocadas por *M. chelonae* (32).

Mycobacterium xenopi

El nombre de xenopi se debe al término *Xenopus*, un género de la familia de los sapos. Primero se aisló de un granuloma en piel del sapo *Xenopus laevis* (33).

Son bacilos largos, cuyo inóculo diluido en un medio con base de huevo produce colonias no pigmentadas después de catorce días o más de incubación a 37°C algunas colonias llegan a ser amarillas. En agar Middlebrook 7H10 las colonias son características de un centro compacto rodeado por un borde que al microscopio resulta evidentemente filamentososo en la superficie del medio (33).

Las colonias se adhieren al medio por un botón que crece hacia dentro. Su desarrollo óptimo, es de 40 a 45°C (33).

Es de gran importancia reconocer si se trata de una infección por *M. xenopi*, y distinguirlo entre las micobacterias no fotocromógenas y escotocromógenas. Este microorganismo se encuentra clasificado dentro del grupo no fotocromógeno, pero usualmente en el primo cultivo aparece como una micobacteria escotocromógena.

Una característica diferencial de este microorganismo con otras micobacterias escotocromógenas, es la morfología que *M. xenopi* presenta. Ocasionalmente se le asocia con enfermedades crónicas de pulmón, pero es frecuente que sea aislada de secreciones humanas asociadas a la enfermedad (33).

Mycobacterium farcinogenes

Un número de microorganismos aislados de lesiones de muermo fueron designados dentro del género *Nocardia farcinica*. Posteriormente, Chamoiseau estableció que estas lesiones eran ocasionadas en bovinos africanos por microorganismos que correspondían al género *Micobacterium*, basándose en las características lipídicas. Al mismo tiempo que es propuesto el término *M. farcinogenes* con dos subespecies, *tchadense* y *senegalense*. Subsecuentemente en base a las marcadas diferencias en tiempo de crecimiento, actividad metabólica, composición lipídica y homología en DNA, Chamoiseau concluyó que se trataba de dos especies diferentes denominándolas *M. farcinogenes* y *M. senegalense*. Caracterizadas por ser fuertemente ácido alcohol resistentes, productoras de colonias rugosas amarillas después de 15 a 20 días de incubación, en medio a base de huevo, muy adheridas al medio y con un halo iridiscente alrededor (33).

Aislado de lesiones en bovinos africanos. Al ser Inoculada por vía subcutánea en cobayos, produce abscesos que drenan después de ocho días en la cual, la cicatrización es lenta. Seis a siete días después de una aplicación intraperitoneal en cobayos hay abscesos, vesículas en peritoneo y vísceras. Los animales mueren después de una infección prolongada (33).

Mycobacterium phlei

Bacilos cortos de 1 a 2 μm , ácido-alcohol-resistentes en cultivos jóvenes, y después de 5 a 7 días se tiñen del 5-100%. Las colonias en un medio a base de huevo son rugosas, de pigmentación amarilla a naranja después de 2 a 5 días de incubación, en pocos cultivos suelen ser lisas. Si se suplementa el medio con albúmina y ácido oleico hay colonias rugosas, lisas, granulares, forman cordones irregulares, su crecimiento está entre los 22 y 55°C (33).

Este microorganismo no es patógeno para ratones, ratas, cobayos, conejos, pollos, ranas y carpas (33).

Se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza especialmente en el heno y en la hierba (33).

M. thermorresistibile,

M. thermorresistibile, nombrada así debido a la resistencia que presenta a temperaturas elevadas. Es posible un crecimiento lento en un primer aislamiento, pero en un subcultivo en medio a base de huevo, el crecimiento presenta colonias lisas y rugosas, amarillas, que aparecen de 3 a 5 días (33).

Este microorganismo no suele ser patógeno para los seres humanos. Sin embargo, se le ha podido encontrar en muestras clínicas (esputo) (33).

3.4. DIAGNÓSTICO DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.

Diagnóstico clínico

Para el diagnóstico de enfermedad pulmonar producida por micobacterias no tuberculosas, se recomienda utilizar los criterios recientemente revisados por la American Thoracic Society (ATS), basados en los datos clínicos, radiológicos y bacteriológicos:

1. Hallazgos clínicos:

a) Síntomas y signos compatibles (tos, fiebre, pérdida de peso, hemoptisis, disnea) con deterioro del estado clínico.

b) Exclusión de enfermedades o tratamientos de otras patologías que pudieran producir un deterioro clínico.

2. Radiológicos:

– En radiografía simple de tórax:

a) Infiltrados con o sin nódulos.

b) Cavitación.

c) Nódulos únicos o múltiples.

– En tomografía computarizada de alta resolución del tórax:

a) Nódulos múltiples de tamaño pequeño.

b) Bronquiectasias multifocales con o sin pequeños nódulos pulmonares.

3. Bacteriológicos. Siempre que se cumpla uno o más de los siguientes apartados:

a) Siempre que se puedan obtener, al menos, 3 muestras de esputo o lavado broncoalveolar (LBA) en un año:

Tres cultivos positivos con baciloscopias negativas, ó 2 cultivos positivos y una baciloscopia positiva.

b) Ante la incapacidad de obtener esputos, un lavado bronqueoalveolar (LBA):

– Con cultivo positivo (2+, 3+, 4+), ó cultivo positivo con una baciloscopia positiva (2+, 3+, 4+).

c) Biopsia:

– Cualquier crecimiento en los cultivos de muestras obtenidas a partir de biopsias broncopulmonares.

– Granulomas y/o visión de bacilos ácido-alcohol resistentes en una biopsia pulmonar con uno o más cultivos positivos de esputo o LBA.

– Cualquier crecimiento obtenido de muestras extrapulmonares estériles.

En pacientes inmunodeprimidos se aceptan los mismos criterios, con excepción de considerar con valor diagnóstico, un cultivo positivo con crecimiento de 1+ o más.

Diagnóstico de laboratorio.

Obtención de la muestra.

Las micobacterias pueden aislarse de esputo, orina, sangre y LCR, de biopsias de tejidos incluyendo hígado, médula ósea y nódulos linfáticos (18).

Los resultados de los cultivos pueden variar, ser positivos un día y negativos otro, por lo cual, se deben recolectar por la mañana tres muestras de origen pulmonar o renal (18).

Siempre que se practique una biopsia deberá remitirse un fragmento al servicio de patología, teniendo en cuenta que para el laboratorio de microbiología la muestra

debe enviarse sin fijadores, ni conservadores, aunque puede humedecerse, si es necesario, en agua destilada. No conviene emplear suero salino, dado que las micobacterias no tuberculosas son sensibles a este medio, ni agua del grifo por la presencia de micobacterias saprófitas y, por lo tanto, pueden dar falsos positivos. En las lesiones cutáneas se debe limpiar con alcohol antes de aspirar la muestra debajo del borde de la lesión (32).

El transporte rápido al laboratorio, es fundamental para evitar el sobrecrecimiento de flora acompañante, por lo que la conservación deberá hacerse a 4°C, si se retrasa la entrega más de 1 h (excepto muestras de sangre) (32).

Bioseguridad

Los estudios se realizan en una cabina de seguridad microbiológica clase III, en una habitación con presión de aire ligeramente negativa, y un extractor exterior. El personal deberá portar gorra, bata, mascarilla y guantes (18).

En todas las áreas de trabajo, se deben instalar recipientes conteniendo desinfectantes; como mezclas fenólico-jabonosas que emplean o-fenilfenol u otros derivados fenólicos, con periodos de contacto de 10 a 30 minutos; formaldehído, al 3-8%; glutaraldehído alcalino al 2%; fenol al 5-10% (18).

Descontaminación

Se utiliza hidróxido de sodio al 3 ó 4%, ácido oxálico al 5%. Aunque existen descontaminantes suaves como fosfato trisódico solo o combinado con cloruro de benzalconio (18).

Para satisfacer la necesidad de recuperar micobacterias para las pruebas de sensibilidad, se recomienda emplear una solución de NaOH al 2% y N-acetil-cisteína

(NALC), que actúa como agente mucolítico, sin actividad antibacteriana, que licua el moco rompiendo los puentes disulfuro. Posteriormente, las micobacterias se pueden recuperar por centrifugación. Una ventaja que proporciona este procedimiento es que se puede adicionar un amortiguador de fosfatos, el cual sirve para lavar el espécimen, diluir las sustancias tóxicas y disminuir el peso específico de la muestra, con lo que la centrifugación es más efectiva (18).

Es necesario eliminar de las muestras los microorganismos contaminantes que interfieren en la recuperación de las micobacterias, así como conseguir la licuefacción de los restos orgánicos, para que los agentes descontaminantes puedan destruir las bacterias no deseadas, las micobacterias son más resistentes a los ácidos y bases fuertes, lo que permite utilizar estas técnicas de digestión-descontaminación. Sin embargo, pueden dar lugar a falsos negativos (exceso de descontaminación) o a un número elevado de contaminaciones (por defecto de descontaminación).

Se acepta un índice de contaminación en medios sólidos entre un 3 a 5%, y para medios líquidos depende del sistema utilizado (32).

Los métodos de digestión-descontaminación más usados son los de Petroff (NaOH 4%), Taquet y Tison (laurilsulfato sódico 3% y NaOH 1%) y Kubica (N-acetil-L-cisteína y NaOH) (32).

Centrifugación

Los lípidos tienen la característica de hacer muy bajo el peso específico del microorganismo, por lo que el peso específico de la suspensión debe mantenerse tan

bajo como sea posible. De forma correspondiente, la fuerza centrífuga debe ser tan alta como resulte práctico (18).

Temperatura de incubación

Diferentes especies con significado clínico, pueden demostrar variación en su crecimiento de acuerdo a la temperatura a la cual se está desarrollando (18).

Las especies que tienen predilección por la piel, como *M. marium*, *M. ulcerans* y *M. haemophilum*, crecen mejor a la temperatura de la piel 30 a 32°C y muy pobremente a 37°C. *M. tuberculosis* crece mejor a 37°C. *M. xenopi*, que no infecta a humanos crece mejor a 42°C, al igual que *M. avium* pues esa es la temperatura del cuerpo de las aves (18).

Las micobacterias crecen mejor a una atmósfera con 3 al 11% de CO₂.

M. szulgai no encuadra en la clasificación de Runyon debido a que es escotocromógeno cuando se incuba a 37°C y fotocromógeno se hace a 22 a 24°C (18).

Crecimiento lineal

Fisher y cols, en 1951 fueron los primeros en descubrir el crecimiento lineal de las micobacterias empleando *M. tuberculosis*. Bajo ciertas circunstancias, en que la micobacteria se divide por fusión binaria y hasta que presenta un crecimiento exponencial. Sin embargo, cuando las micobacterias son cultivadas en medio líquido y se añade Tween 80 al inicio del crecimiento exponencial, sigue un crecimiento lineal, en el cual, el número de bacilos aumenta en un tiempo constante (36).

Fisher y cols, y Fisher y Kirchheimer opinan que este crecimiento peculiar es único de micobacterias. Este incremento en el número de bacilos es muy lento cuando se

compara al obtenido por crecimiento exponencial lo que demuestra el lento crecimiento de las micobacterias (36).

Volk y Myrvik en 1953 mencionaron que el crecimiento lineal no era una manera peculiar de crecimiento, ya que solo es una consecuencia de la privación de oxígeno. Estos autores demostraron que los mismos cultivos con crecimiento lineal cuando eran oxigenados (por agitación constante), el crecimiento cambia de lineal a exponencial. Por esto, en el caso de bacilos tuberculosos, la atmósfera de oxígeno es esencial para el crecimiento. Cuando la cantidad de oxígeno es menor a la mínima necesaria, los bacilos detienen el crecimiento y el crecimiento lineal se presenta en las micobacterias o en otras bacterias en las cuales les falta algún nutrimento (36).

3.5. Pruebas para la identificación bioquímica

Acumulación de niacina

Todas las micobacterias forman niacina como un derivado metabólico, pero la mayor parte de las especies, poseen una enzima que convierte la niacina libre en ribonucleotido de niacina (18).

M. tuberculosis y algunas subespecies de *M. chelonae* y *M. simiae* no pueden metabolizar la niacina, solo acumularla (10).

El ácido nicotínico reacciona con bromuro de cianógeno en presencia de una amina (anilina) para formar un compuesto amarillo (18).

Hasta hoy, es bien sabida la gran utilidad que representa la prueba de niacina en la identificación de micobacterias patógenas. Desde el inicio de esta prueba por el

método de Konno en el cual la anilina y el bromuro de cianógeno eran utilizados, hasta las modificaciones realizadas por Runyon y cols; algunos otros métodos se han ido introduciendo a lo largo del tiempo obteniéndose ventajas en cada uno de ellos. La bencidina y toluidina también han sido utilizadas, y los resultados se han comparado con los de otros investigadores. Una ventaja fundamental de este método son los colores que se pueden apreciar después de realizar la prueba, por ejemplo la bencidina y toluidina presentan un color rosa o rojo coral, comparado con el amarillo que se da en la prueba de anilina (23).

Ya que el principal reactivo de esta prueba es el bromuro de cianógeno, este compuesto químico presenta un gran peligro si no es utilizado con precaución, por lo cual, el uso de una mascarilla protectora es indispensable para la realización de esta prueba (23).

La niacina (ácido nicotínico) es un producto del metabolismo de la biosíntesis del glicerol y el ácido aspártico, por todo el género *Mycobacterium*. Sin embargo, algunas especies (entre ellas *M. tuberculosis* y algunas cepas de *M. bovis*) carecen de la enzima responsable de degradar este compuesto hasta el complejo ribonucleótido-niacina, por lo que lo acumulan en el medio de cultivo como un compuesto soluble en agua (19).

Reducción de nitratos a nitritos.

La presencia de la enzima nitrorreductasa constituye una característica diferencial, las micobacterias con esta enzima catalizan la reacción:



La presencia de nitrito en la prueba es detectada por el agregado de los reactivos sulfanilamida y n-naftiletilenediamina. Se forma un color rojo diazonio (18).

La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) y en gas nitrógeno, tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como aceptor de H^+ y la mayoría de las bacterias aerobias sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno, en la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas (18).

Los nitritos presentes en el medio se detectan al agregar sulfanilamida y α -naftilendiamina a pH ácido, esto da la formación de un color rojo debido a una sal de diazonio (36).

Actividad catalasa

La mayor parte de las micobacterias producen la enzima catalasa, pero varían en la cantidad producida. Además, algunas formas de catalasa son inactivadas por calentamiento a 68°C durante 20 minutos y otras son estables (18).

Los microorganismos productores de la enzima catalasa tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre:



La prueba de la catalasa micobacteriana difiere de la usada para detectar catalasa en otros tipos de bacterias porque se usa un 30% de peróxido de hidrogeno en una

solución detergente fuerte (Tween 80 al 10%) en lugar de la usual al 3%. El detergente ayuda a dispersar las micobacterias conglomeradas, hidrófobas de los agregados de bacilos individuales (18).

Long, E. R puntualiza que Hahn en 1897 es el primero en describir la actividad de la catalasa en las micobacterias y que en medio de Middlebrook, puede estar ausente en ciertas mutantes de bacilos tuberculosos resistentes a la Isoniazida.

También sucede algo parecido en *M. kansasii*, que demuestra tener datos un poco imprecisos en la actividad en aquellas bacterias que se agrupaban en el medio en forma de racimos, más aún que por el calor que se usaba para la prueba semicuantitativa.

Para la observación de esta enzima en micobacterias se procede de dos formas una es determinar si la enzima es termoestable o no y la catalasa semi cuantitativa, que significa medir la columna de burbujas que se producen. Además, sirve para identificar cepas resistentes a Isoniacida (INH), ya que se conoce que una delección del gen responsable de la catalasa (*katG*) suele implicar la adquisición de resistencia a este antifímico.

Inhibición del crecimiento por hidracida del tiofeno-2-carboxílico

La inhibición del crecimiento por la hidracida del ácido Tiofén-2-carboxílico (T₂H), es una prueba útil para distinguir entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Este compuesto inhibe el crecimiento de *M. bovis* sin afectar el crecimiento de *M. tuberculosis* a concentraciones de 5 µg/mL en el medio de cultivo (36; 10).

Hidrólisis del Tween 80.

Ciertas micobacterias poseen una lipasa que divide el Tween 80 en ácido oléico y sorbitol polioxietilado, lo cual modifica las características ópticas de la solución de un amarillo pajizo (producido por el paso de la luz a través de la solución del Tween intacto) a rosado. El cambio de color indica la hidrólisis o destrucción de la molécula del Tween 80 (36).

Esta prueba sirve para identificar *M. kansasii* que puede producir resultado positivo en apenas 3 a 6 horas, y en la diferenciación entre *M. gordonae* (+) y *M. scrofulaceum* (-) en la prueba estándar de 10 días (18).

Prueba de arilsulfatasa

Utilizada para identificar microorganismos del complejo *M. fortuitum-chelonei* (18).

La arilsulfatasa es una enzima que actúa sobre la sal tripotásica del disulfuro de fenoltaleína, dando fenoltaleína libre. El desarrollo de color púrpura indica resultado positivo (18).

Pirazinamidasa.

La deaminación de la pirazinamidasa a ácido pirazinoico en 4 días es una característica fisiológica útil mediante la cual *M. marium* (+) puede diferenciarse de *M. kansasii* (-) (18).

Reducción de telurito

M. terrae y *M. xenopi* pueden reducir el telurito de potasio en un tiempo mayor a 5 días (18).

Las micobacterias reducen las sales de telurio a telurio metálico; por intermedio de la telurito reductasa (forma soluble), que actúa como un aceptor artificial de electrones y se reduce a telurio metálico de color negro (18).

Actividad de la ureasa

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se denomina carbamida. La hidrólisis de la urea es catalizada por la ureasa, la cual es una enzima importante vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. La ureasa es considerada una enzima constitutiva dada que es sintetizada por ciertas bacterias sin tener en cuenta la presencia o ausencia de su sustrato, la urea. Esta prueba determina la capacidad de un organismo de hidrolizar la urea, formando dos moléculas de amoníaco que hacen que el medio se alcalinice y por consiguiente que se pueda detectar con un indicador ácido-base (31).

Crecimiento en agar MacConkey

Los miembros del complejo *M. fortuitum-chelonei*, son capaces de crecer en agar de MacConkey, el cual no contiene cristal violeta (18, 20).

Tolerancia al 5% de cloruro de sodio

De las bacterias de crecimiento lento, solo *M. triviali* crece, y de las micobacterias de crecimiento rápido solo *M. chelonae* subespecie *chelonae* no crece en presencia de cloruro de sodio al 5% (18; 8).

Acido p-nitrobenzoico (PNBA)

El crecimiento en un medio que contenga PNBA es útil para diferenciar el complejo MTB (*M. tuberculosis*) que no crece de las MNT que si lo hacen (10).

Captación de hierro

La capacidad de captación de hierro de un reactivo que contiene hierro inorgánico, ayuda a diferenciar *M. fortuitum* y *M. phlei* (+) de *M. chelonae* (-) (18).

3.6. Análisis cromatográfico

Debido a la importante constitución lipídica de las micobacterias (20 a 40% de su peso seco), el estudio de estos lípidos mediante diferentes sistemas (cromatografía de capa fina, cromatografía de gases y cromatografía de alta resolución HPLC) ha proporcionado una excelente vía de identificación (32).

La cromatografía de gas líquido usa gas hidrógeno en la fase móvil y líquido en la fase estacionaria, para la identificación de MNT (10).

La columna de HPLC separa por cromatografía el éster p-bromofenacilo derivado de los ácidos micólicos extraídos por saponificación de las micobacterias con una sensibilidad del 99.8% como MTB, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. gastri*, *M. kansasii*,

M. szulgai, *M. gordonae* y *M. asiaticum*. No obstante, aunque la técnica es rápida son necesarios 1×10^6 organismos para el análisis, por ello el uso de esta técnica se aplica solo para algunas muestras. La técnica de HPLC puede distinguir entre el BCG de otros miembros del complejo MTB, pero no puede separar *M. avium* de *M. intracellulare*, lo cual solo se realiza por métodos moleculares (10).

Son técnicas rápidas (menos de 2 h), pero son técnicamente complejas y requieren una infraestructura muy cara, por lo que se usan en laboratorios de referencia (32).

3.7. Análisis químico de la pared celular micobacteriana

Ácidos micólicos

Los ácidos micólicos son de un gran peso molecular, los ácidos grasos con un alcohol en la posición 3 sustituidos en el carbono 2 con una cadena alifática, la masa molecular de este ácido varía dependiendo el número de carbonos que puede ser de 60 a 90. La pirólisis de los ésteres metílicos de los ácidos micólicos produce largas cadenas de meroaldehídos y ácidos grasos con ésteres metílicos con cadenas de 22 a 26 átomos de carbono. Este método es muy usado para la separación de géneros que contienen ácidos micólicos y poder separar entre el género *Tsukamurella* y *Mycobacterium* (15).

Los metanolizados de los ácidos micólicos son de utilidad y se basan en la presencia o ausencia de grupos funcionales en la cadena de átomos de carbono, en base a las características polares de estos grupos y con un método de cromatografía en capa fina (TLC) (15).

Cinco tipos diferentes de ácidos α -micólicos en la cadena son identificados y separados usando TLC argéntica, cromatografía de gases y espectroscopia de masas. Estos ácidos son:

- diciclopropanoilos
- monociclopropanoil monoéico
- dienoico, y
- dienoico metilado.

Los ácidos α -micólicos generalmente contienen solo uno o dos enlaces dobles con algún grupo ciclopropanoilo (15).

3.8. MÉTODOS GENÉTICOS

Se estima que el tamaño del genoma micobacteriano varía de 3 a 5.5×10^9 daltons, en comparación con el genoma de *E. coli* el cual tiene 2.5×10^9 daltons (15).

La identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una rápida identificación. Sus principales ventajas consisten en una aplicación universal en todos los aislamientos, detección directa en la muestra, reconocimiento preliminar de nuevos taxones, identificación en especies de difícil cultivo, gran seguridad biológica y una adecuada relación costo-beneficio (32).

Identificación de micobacterias con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método que fue descubierto en 1983 por el científico estadounidense Kary B. Mullis lo cual le valió el premio nobel de química en 1993, esta técnica dejó grandes avances en biología molecular, ya que

esto hace posible, la síntesis de grandes cantidades de un segmento específico de ADN, de esta forma se consigue copiar millones de veces y en un par de horas el fragmento a sintetizar. El sustrato puede provenir de muestras clínicas como tejidos, semen, lavados bronquiales, exudados, raíces de cabello o cejas, sangre, etc. (28).

El PCR es un método de biología molecular de síntesis *in vitro* de ADN, altamente, específico, rápido, sensible y versátil. Por el cual, un segmento específico de éste, es amplificado al ser delimitado por un par de cebadores. Esto se logra de forma exponencial a través de ciclos repetidos en diferentes periodos de tiempo y temperatura., obteniéndose así millones de copias de la secuencia deseada (28).

La reacción consta, por lo regular, de casi treinta ciclos repetitivos, conformados cada uno de tres pasos. El primero de ellos consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo. Esto se logra incubando el ADN a una temperatura cercana a 95°C, por minuto. En el segundo paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla) a una temperatura que facilite el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambos ADNs. La temperatura empleada, depende de la temperatura de fusión de los iniciadores, la que varía entre 50 y 60°C; y finalmente la extensión de la cadena con el empleo de la polimerasa. Paso en el que se extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos conforme a la cadena molde.

Requisitos para realizar una PCR

Para efectuar la PCR se realiza una mezcla en un tubo de ADN con la secuencia a amplificar, los cebadores o iniciadores, que se alinearán a la cadena sencilla de ADN,

cuatro desoxirribonucleosidos trifosfatados; dATP, dGTP dCTP y dTTP (dNTPs), amortiguador de la reacción y la enzima ADN polimerasa termoestable.

Los cebadores; tendrán de preferencia una longitud de 18 y 30 nucleótidos, con un contenido de G y C de 40 y 75% y su concentración estará entre 0.1 y 0.5 μM . Deberán de carecer de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí, a estos se adicionan los cuatro dNTPs, cuya variación en su concentración afecta la especificidad de la reacción. Concentraciones altas disminuyen la fidelidad con la que la polimerasa trabaja, llegando incluso a inhibir su actividad; los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos deben llevar cierta relación siendo la concentración de Mg^{2+} 0.5 a 1.0 mM superior a la concentración de dNTPs. Entre los adyuvantes que generalmente aumentan la especificidad de la reacción están DMSO, añadido para disminuir la estructura secundaria del ADN; Tritón X-100, Tween 20, usados para estabilidad de la enzima y polietilenglicol, glicerol, formamida y seroalbumina bovina, que, aunque son importantes se puede prescindir de ellos, el ion Magnesio o el Manganeso son importantes, ya que el MgCl_2 interviene en el rendimiento y la especificidad de la reacción. En general concentraciones insuficientes de Mg^{+2} , dan lugar a baja eficiencia en la reacción, en tanto que a altas concentraciones de este, genera una pobre especificidad en la reacción (17).

El diagnóstico convencional de las micobacterias tiene como desventaja la baja sensibilidad y especificidad del análisis microscópico, su límite inferior de detección es de 10^4 bacilos por mL de muestra, y el lento crecimiento de las micobacterias. Sin

embargo, la PCR permite la identificación rápida y específica con un límite inferior de detección de 1a100 bacilos por mL de muestra.

Entre los métodos de descontaminación hasta el protocolo estándar de NaOH-N-acetilcisteína y el protocolo del lauril sulfato de sodio. La ruptura celular puede hacerse por un tratamiento térmico, mecánico o mixto.

Los productos de la PCR pueden visualizarse por la hibridación del producto amplificado con una sonda específica de ácido nucleico y detección colorimétrica por electroforesis en gel de poliacrilamida y electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Como consecuencia del incremento en el número de micobacterias oportunistas patógenas, se ha hecho necesaria la aplicación de esta metodología, con el objeto de realizar un diagnóstico definitivo. Procedimiento que es acompañado de la secuenciación directa del *16S ADNr* amplificado (figuras 6-9). Considerada una metodología rápida, que permiten obtener resultados de identificación definitivos y no ambiguos (17).

Es necesario considerar que existen otros blancos que pueden ser amplificados. Sin embargo, *16S ADNr* permite la identificación a nivel de especie, al ser portador de regiones hipervariables, que permiten realizar una diferenciación no solo a nivel de las especies relacionadas.

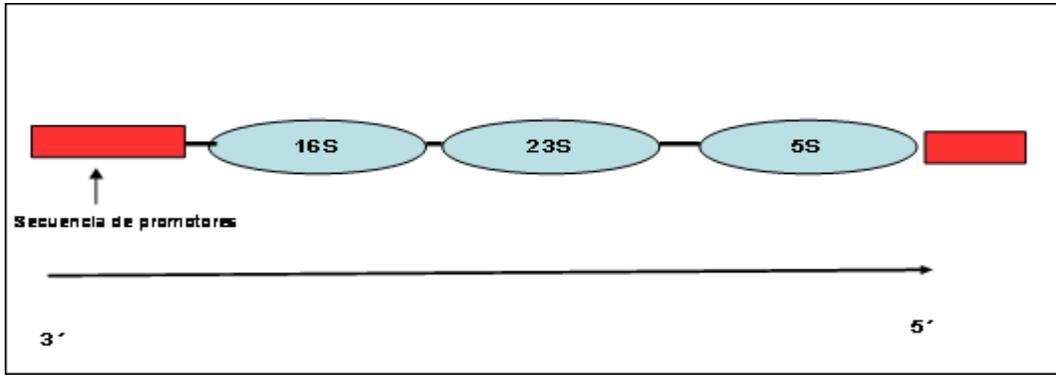


Figura 6. Operon ribosomal.

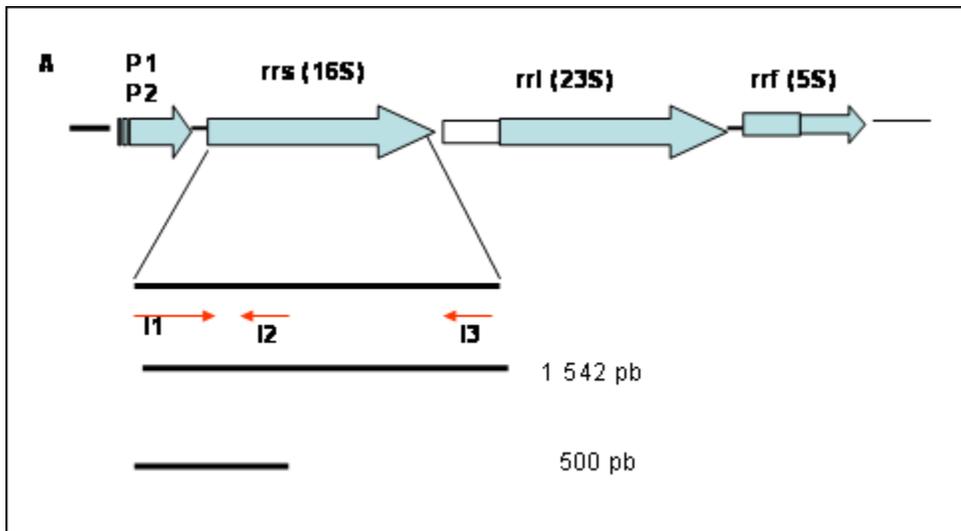


Figura 7. Operon ribosómico (rrn).

4. METODO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Material biológico: se estudiaron 34 cepas provenientes de 34 muestras clínicas de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría de México. Las muestras estudiadas, incluyeron: lavado gástrico, expectoración, orina y autopsia (ver tabla 3).

Tabla 3. Procedencia de las 33 muestras obtenidas para el estudio, de una muestra se ignora la procedencia a nivel clínico.

CLASE DE MUESTRA BIOLÓGICA	TOTAL DE MUESTRAS
Lavado gástrico	11
Expectoración	1
Orina	19
Autopsia	2

Cepa de referencia: *Mycobacterium gordonae.*, proporcionada y secuenciada por el Dr. J.A. González-y-Merchand. (Depto. De Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.) *Mycobacterium fortuitum* donada por el cepario de la Facultad de Química, UNAM, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv proporcionado por INP y *Escherichia coli* del cepario del Depto. De Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Tinción de Ziehl Neelsen: a todas las muestras se les efectuó la tinción de Ziehl Neelsen, para corroborar la pureza microscópica.

Medios de cultivo: la propagación y cultivo de las cepas se realizó en el medio de Lowenstein-Jensen (LJ) y los frascos de MB/Bact (Caldo Middlebrook 7H9), con suplemento.

Siembra

Se inoculó la muestra obsequiada por el laboratorio de Biología de la Facultad de Química de la UNAM (ya descontaminada y concentrada) en el medio LJ, se incubo a 37°C, durante 3 semanas con observación continua. Para el caso del Medio MB/Bact, este, fue utilizado para resembrar la cepa control de *M. gordonae*.

Todos los medios, al finalizar el tiempo de incubación, fueron sometidos a tinción de Ziehl Neelsen. Posteriormente, volvieron a sembrarse e incubarse para determinar su fotorreactividad y obtener su clasificación correspondiente a Runyon.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas se realizarón y revelarón de acuerdo al manual de pruebas bioquímicas de Koneman (18).

Niacina

El procedimiento para realizar esta determinación es:

- 1.- A un cultivo puro en el medio de Lowenstein-Jensen con crecimiento óptimo (15 días) se le agrega 1 a 2 mL de agua o solución salina isotónica estéril para que recubra el crecimiento del microorganismo.
- 2.- En forma inclinada se deja reposar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Se toman 0.5 mL y se pasan a un tubo con tapón de rosca de 13 X 100 estéril.
- 4.- Se agrega 0.5 mL de anilina 4% y 0.5 de bromuro de cianógeno al 10%.
- 5.- Observar la formación de un color amarillo para una prueba positiva e incolora para una prueba negativa.

6.- Terminada la observación, hay que agregar a todos los tubos de la prueba, hidróxido de sodio al 4%, para inactivar el bromuro de cianógeno.

Reducción de nitratos

Preparación:

1.- Sustrato 0.01 M de nitrato de sodio en 0.022 M de amortiguador de fosfato, pH 7.0.

NaNO₃ 0.085 g.

KH₂PO₄ 0.117 g.

Na₂HPO₄ 0.485 g.

H₂O dest. 100 mL.

2.- Colocar:

Reactivo No.1: añadir 50 mL de HCL concentrado a 50 mL de agua destilada.

Reactivo No.2: disolver 0.2 g de sulfanilamida ó ácido sulfanílico a 100 mL de agua destilada.

Reactivo No.3: disolver 0.1 g de dihidrocloruro de N-naftilendiamina en 100 mL de agua destilada.

Almacenar los reactivos a 4°C y en oscuridad. Si se forman precipitados ó algún color, se desecha.

Procedimiento:

1.- Usar cultivo de tres a cuatro semanas de crecimiento.

2.- Inocular los tubos del medio de cultivo con la cepa problema.

3.- Incubar a 37°C en baño maría por dos horas.

4.- Añadir una gota del reactivo # 1.

5.- Añadir dos gotas del reactivo # 2.

6.- Añadir tres gotas del reactivo # 3.

Positivo. Desarrollo de color rojo.

Negativo. Sin desarrollo de color, esto puede indicar que la prueba es negativa o que se ha producido una reducción de los nitratos hasta nitrógeno. Para confirmar esta aseveración, fue necesario agregar una pequeña cantidad de polvo de zinc a la mezcla, esto redujo los nitratos en caso de que no se hubieran reducido. En este momento una prueba positiva no desarrollará color y una prueba negativa si desarrollará color.

Catalasa 68°C

Reactivos:

Amortiguador de fosfatos 0.067 M, pH= 7

Una mezcla de Tween 80 al 10% y H₂O₂ al 30% (recién preparada).

Procedimiento:

1.- Añadir 0.5 mL del amortiguador de fosfatos en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca y esterilizar a 121°C por 15 min.

2.- Suspender varias colonias en el amortiguador.

3.- Colocar los tubos en baño María a 68°C por 20 min.

4.- Enfriar la suspensión a temperatura ambiente y añadir 0.5 mL de Tween-H₂O₂.

5.- Observar la formación de burbujas.

Catalasa semicuantitativa

Materiales:

Agar Lowenstein-Jensen en tubos de 16 x 150 con tapón de rosca con 8 mL sin inclinar.

Tween-Peróxido:

Preparar una solución de peróxido de hidrógeno al 30% y Tween 80 al 10% (recién preparada).

Procedimiento:

- 1.- Inocular la superficie del tubo con el medio de cultivo e incubar a 37°C por 5 días.
- 2.- Añadir 1 mL de Tween-Peróxido.
- 3.- Dejar los tubos a temperatura ambiente por 5 min.
- 4.- Medir en milímetros la columna de burbujas arriba de la superficie del medio.

> 45 mm reacción de catalasa positiva muy fuerte.

< 45 mm reacción de catalasa positiva media.

Negativa sin burbujas.

Crecimiento en T₂H (5 µg/mL)

Sustrato:

En el medio Middlebrook 7H11 se le agregan 5 µg/mL de T₂H en tubos de 16 X 150.

Procedimiento:

1. Usar cultivo de tres a cuatro semanas de crecimiento.
2. Inocular los tubos del medio de cultivo con una suspensión de la cepa problema.
3. Incubar a 35°C por tres semanas o antes si hay desarrollo.

Positivo. Medio con desarrollo.

Negativo. Medio sin desarrollo.

Hidrólisis del Tween 80

Reactivos:

100 mL de amortiguador de fosfatos 0.15 M.

Na₂HPO₄ - 2.129 g.

KH₂PO₄ - 2.041 g.

0.5 mL de Tween 80.

2.0 mL de una solución acuosa de rojo neutro al 0.1%

pH 6.8 - 7

Procedimiento:

- 1.- Repartir 2 mL del sustrato en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca.
- 2.- Esterilizar a 121°C por 10 minutos (su color debe ser ámbar).
- 3.- Enfriar e inocular el sustrato. Puede almacenarse sin inóculo en la oscuridad en refrigeración.
- 4.- Incubar de 35 a 37°C hasta por 12 días, hacer lecturas a las 24 h, 5 días y hasta 10 a 12 días.

Positivo: cambio de color a rosa o rojo.

Negativo: tubo con sustrato no inoculado.

Arilsulfatasa

Sustrato:

100 mL de agar base Dubos oleico.

1 mL de glicerol.

65 mg de tripotasio de fenolftaleína disulfuro.

pH 6.8 a 7.0

Reactivo:

10 g Na_2CO_3 en 100 mL de agua destilada.

Procedimiento:

- 1.- Calentar el sustrato a ebullición, repartir en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca y esterilizar a 121°C .
- 2.- Inocular el medio con una porción de la cepa.
- 3.- Incubar a 37°C por 3 días.
- 4.- Añadir 1 mL de Na_2CO_3 (recién preparado).
- 5.- Observar la formación de un color rosa indicando fenolftaleína libre.

Hidrólisis de urea

Reactivos:

Peptona (neopeptona)	1 g.
NaCl	5 g.
KH_2PO_4	2 g.
Glucosa (0.1%)	1 g.
Urea	20 g.
Rojo de fenol	0.012 g.
H_2O destilada	1000 mL.

pH 6.8 a 7

Preparación:

Disolver todos los ingredientes excepto la urea en el 85% del volumen total y esterilizar a 108°C de 7 a 10 min. La urea se disuelve en el 15% del agua destilada restante y se esteriliza por filtración, mezclar en condiciones estériles.

Procedimiento:

- 1.- Colocar 2 mL de urea en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca estériles.
- 2.- Inocular los tubos con cultivo de 3 a 4 semanas.
- 3.- Incubar a 37°C por 3 días.

Positivo: Cambio de color del medio de violeta a morado intenso.

Negativo: Sin cambio de color.

Tolerancia al cloruro de sodio

Sustrato:

En el medio L-J se prepara con cloruro de sodio al 5% en tubos de 16 X 150.

Procedimiento:

1. Usar cultivo de tres a cuatro semanas de crecimiento.
2. Inocular los tubos del medio de cultivo con una suspensión la cepa problema.
3. Incubar a 35°C por tres semanas o antes si hay desarrollo.

Positivo. Medio con desarrollo.

Negativo. Medio sin desarrollo.

Crecimiento en MacConkey sin cristal violeta

Sustrato:

Se prepara el MacConkey sin cristal violeta en cajas de Petri.

Procedimiento:

1. Usar cultivo de tres a cuatro semanas de crecimiento.
2. Inocular las cajas del medio de cultivo con la cepa problema.
3. Incubar a 35°C por siete días.

Positivo. Medio con desarrollo.

Negativo. Medio sin desarrollo.

4.2. Material y Métodos para PCR

Extracción de ADN.

La extracción de ADN para las 34 cepas en estudio se realizó de acuerdo a la técnica de extracción reportada por Kirschner (17).

La siguiente metodología se realizó con las normas de seguridad adecuadas, en la campana de flujo laminar nivel III (Veco S.A. de C.V). Las cepas utilizadas (34 muestras) fueron sembradas en medio LJ, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL., en cada uno y por separado 320 μ L de amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, EDTA 62.5 mM, SDS 20%, 2-mercaptoetanol 10%) y una asada de las muestras. Para inactivar las bacterias se colocaron los tubos en un termobloque a 80°C durante 15 min, hecho esto se mantuvieron las cepas 1 h a temperatura ambiente (TA) después se adicionó a cada tubo 41 μ L de lisosima (3.3% en TE pH 8.0) para facilitar la acción de está se incubó a 37°C, después se centrifugó (Microcentrífuga, Eppendorf) a 14,000 rpm durante 15 min, seguido se cuantificó el sobrenadante para adicionar proteinasa K a una concentración de 200 μ g/mL, se mezcló la solución y luego se incubó a 65°C, 15 min después se realizaron los lavados con 500 μ L de: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) en los cuales se mezcló por inversión durante 30 min , entre cada lavado se centrifugó 15 min a TA, de esto solo se extrajo la fase acuosa, se realizó otro lavado con 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se mezcló 5 min y se centrifugó a TA , se

adicionó 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se dejó reposar toda la noche a -20°C. Posterior a esto se centrifugó 15 min a TA, se decantó y dejó secar por evaporación, finalmente se resuspendió en 50 µL de agua MilliQ y se determina su concentración, para esto, se realizó una electroforesis, (Cámara de electroforesis BIO-RAD, SUB-Cell GT, fuente de poder: BIO-RAD, Power/pac 200) en geles de agarosa al 1%, la muestra fue teñida con colorante de corrimiento (azul de bromo fenol 0.25%, xilen cianol 25% y ficoll 400 25%) con bromuro de etidio (Sigma) a una concentración final de 0.1 µg/mL con diferentes concentraciones del fago λ (GIBCO BRL ®, US) de 20, 40, 60, 80 y 100 ng/µL, el gel se observó en el Fotodocumentador (Syngene).

PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

La metodología de PCR utilizada para la amplificación del gen *16S ADNr*, para las 34 cepas en estudio fue la descrita por Kirschner, utilizando los PRIMERS: Primer #285, 5'GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG3' (Sigma-Aldrich Química, S.A. de CV), Primer #264, 5'TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA3' (Sigma- Aldrich Química, S.A. de CV), Primer # 271, MNT-1, 5'CTT AAC ACA TGC AAG TCG AAC 3' (Sigma-Aldrich Química, S.A. de CV) y Primer # 244, MNT-2, 5'CCC ACT GCT GCC TCC CGT AG 3' (Sigma Aldrich Química, S.A.de CV).

Una mezcla para 10 reacciones de PCR debe contener: 50 µL amortiguador 10X: 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM, MgCl₂, 10 µL de gelatina, Tritón 1%, BSA 1.5 mg/mL (Biogénica), 80 µL dNTP's 1.25 mM cada uno, (Applied Biosystems de México, S.A. de R.L. de CV), 10 µL primer #285 (20 pmol), 10 µL primer #264 (20

pmol), 297.5 μL de agua Milli Q, 2.5 y 5 μL de Taq polimerasa (recombinante), concentración 5 U/ μL (Fermentas).

Ya obtenida la mezcla, se colocó 45 μL a cada tubo eppendorf de 1,500 μL y 5 μL de muestra problema, este proceso se realiza en la campana PCR-UVP (Ultraviolet Steriking PCR Workstation), previamente sanitizada.

Amplificación:

En la amplificación del fragmento mayor (1,037pb), se empleó la siguiente programación del termociclador (Swiftmaxi): se realizó un ciclo de 5 minutos a 94°C, y 40 ciclos un minuto a 94°C, dos minutos a 64°C y dos minutos a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

En la amplificación del fragmento pequeño (332 pb), se empleó la siguiente programación del termociclador: se realizó una desnaturalización inicial con un ciclo de 5 minutos a 94°C, y 40 ciclos de un minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C y un minuto a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Producto que fue almacenado a 4°C.

Observación de los fragmentos obtenidos:

Los fragmentos obtenidos de la amplificación fueron observados después de realizar electroforesis, la que se realizó en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, usando también marcadores de peso molecular DNA 100 pb (Invitrogen).

La concentración del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, comparando con diferentes concentraciones del fago λ (GIBCO BRL ®, US) de 20, 40 y 60 ng/ μL .

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DEL PCR (Equipo QIAquick PCR Purification Kit. QIAGEN).

A los productos de PCR de 332 pb, se les agregó 2 μ L de amortiguador dentro del tubo de la muestra. Colocando todo el contenido del tubo en un gel de agarosa al 1.5%, se colocó en un pozo el marcador de peso molecular, posteriormente se corrió el gel a 100V hasta que se terminó el corrimiento, seguido se cortó la agarosa donde se encuentra el fragmento que se quiere purificar, y se puso en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se pesaron los fragmentos del tubo, sin exceder de 400 mg/tubo. Se agregó 3 volúmenes de amortiguador QG por volumen de gel en el tubo y para los geles de mayor peso 6 volúmenes, posteriormente, se dejó Incubar a 50°C durante 10 minutos o hasta la disolución completa del agar, luego se colocó la columna en un tubo de colección de 2 mL, después se agregó hasta 800 μ L de muestra y centrifugó a 11,000 rpm durante un minuto hasta finalizar con la muestra, después se lavó con 750 μ L de amortiguador PE la columna, y se centrifugó a 11,000 rpm 1 minuto, luego se colocó la columna en otro tubo eppendorf de 1.5 mL. Se eluyó el ADN con 30 μ L de agua Milli Q o amortiguador EB, colocándose después en el centro de la columna, finalmente se deja reposar 1 minuto y nuevamente centrifugar a 11,000 rpm durante 1 minuto posteriormente se deja correr las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, y se obtiene la concentración de ADN purificado como se mencionó anteriormente, se descartó el líquido del tubo y volvió a colocar en el tubo de colección. El material obtenido fué enviado para su secuenciación al instituto de Fisiología celular, UNAM en un aparato ABI (Applied Biosystems). Posteriormente las secuenciación obtenida fue reconocida con *Blast* (NCBI) y alineada con *Clustal W2*.

4.3. RESULTADOS

Se efectuó la identificación bioquímica de las 34 cepas, la cual se realizó por triplicado, identificándose: 12 cepas de *M. gordonae*, 8 de *M. szulgai* y 4 de *M. flavescens*. Las 10 cepas restantes, no pudieron ser identificadas por este método de identificación.

Tabla 4: Resultados obtenidos a partir de las pruebas bioquímicas. M= muestras, C68=catalasa a 68°C, CS=catalasa semicuantitativa, N= nitratos, U=urea, S3= tolerancia a cloruro de sodio en 3 días, S10= tolerancia a cloruro de sodio en diez días, S21= tolerancia a cloruro de sodio en 21 días, T24= tween a 24 h, T5= tween a 5 días, T11= tween a 11 días, MC= MacConkey.

M	C68	CS	N	U	S3	S10	S21	T24	T5	T11	T11	T11	MC	42°C	RESULTADOS	PROCEDENCIA
1	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Urocultivo
2	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Urocultivo
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Urocultivo
2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	M gordonae	Urocultivo
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M szulgai	Lav. gástrico
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Lav. gástrico
7	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M szulgai	Urocultivo
4	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Urocultivo
5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Expectoración
6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Lav. gástrico
12	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Lav. gástrico
13	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	M szulgai	Autopsia
14	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Urocultivo
7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Urocultivo
16	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	M sp	Autopsia
17	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Urocultivo
18	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	M szulgai	Urocultivo
19	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	(+/-)	++	-	+	M flavescens	Lav. gástrico
20	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M flavescens	Urocultivo
8	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Lav. gástrico
22	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Urocultivo
23	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Urocultivo
24	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M szulgai	Urocultivo
25	-	-	+	+	+	+	+	+	-	(+/-)	++	-	(+/-)	+	M flavescens	Lav. gástrico
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	(+/-)	+	-	-	M gordonae	Lav. gástrico
27	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	M szulgai	Lav. gástrico
29	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M szulgai	Lav. gástrico
10	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	M gordonae	Lav. gástrico
32	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	M flavescens	Urocultivo
33	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	M sp	Urocultivo
39	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M szulgai	Urocultivo
11	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Urocultivo
42	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M sp	
12	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M gordonae	Urocultivo

Tabla 5: Resultados obtenidos a partir de las pruebas bioquímicas para *M. gordonae*. M= muestras, C68=catalasa a 68°C, CS=catalasa semicuantitativa, N= nitratos, U=urea, S3d= tolerancia a cloruro de sodio en 3 días, S10d= tolerancia a cloruro de sodio en diez días, S21d= tolerancia a cloruro de sodio en 21 días, T24h= tween a 24 h, T5d= tween a 5 días, T11d= tween a 11 días, MC= MacConkey.

CEPAS Y PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS																								
M	C68	CS	N	U	S3d	S10d	S21d	T24h	T5d	T11d	T11d	T11d	MC		RESULTADOS	PROCEDENCIA								
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-/+)	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Urocultivo	
2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	(+/-)	+	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Urocultivo
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	(-/+)	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Lav. Gástrico
4	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-/+)	-	-	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Urocultivo
5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Expectoración
6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Lav. Gástrico
7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Urocultivo
8	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	(+/-)	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Lav. Gástrico
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	+	-	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Lav. Gástrico
10	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	+	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Lav. Gástrico
11	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	+	-	-	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Urocultivo
12	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(-/+)	-	-	-	-	-	-	<i>M. gordonae</i>	Urocultivo

Con el fin de confirmar la especie a través de biología molecular, se seleccionaron las 12 cepas de *M. gordonae* para ser analizadas por PCR, utilizándose como blanco al *16S ADN_r*, y su subsecuente secuenciación. Los productos obtenidos por lisis celular, se observan en las figuras 10-14.



Figura 10. Extracción fenólica del ADN bacteriano. Carriles del 1 al 4, corresponde al fago λ a concentraciones de 1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 µL. Carriles del 5 al 15 corresponde al ADN obtenido de la lisis celular.



Figura 11. Extracción de muestras (triplicado). Carriles 1 a 4 corresponden a diferentes concentraciones de fago λ : 1 μ L, 2 μ L, 8 μ L y 10 μ L, Carriles del 5 al 7 muestra 1, carril 8 a 10 muestra 2, carril 11 a 13 muestra 3 y carril del 14 al 17 muestra 4.

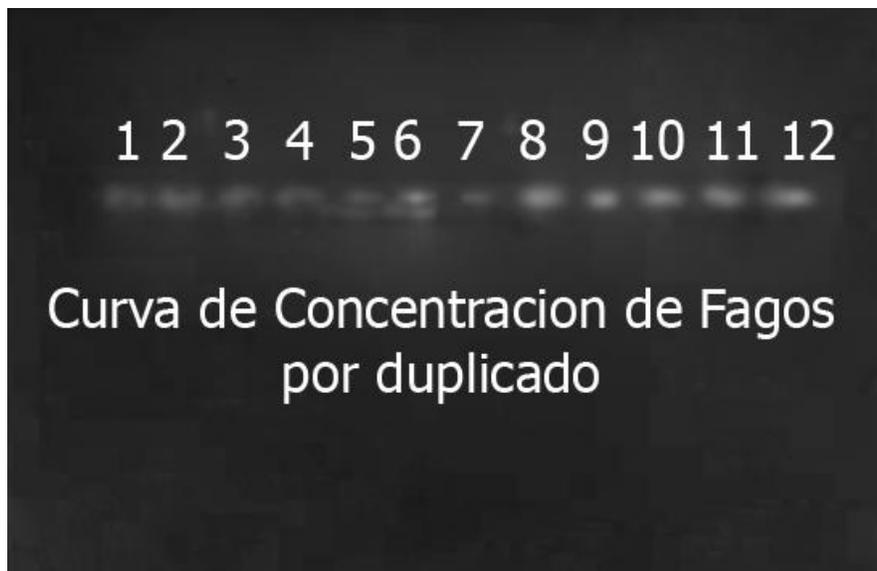


Figura 12. Curva de fagos Carriles 1 a 12 corresponden a diferentes concentraciones de fago λ : 10, 20, 40,60, 80 y 100 ng (muestras por duplicado).

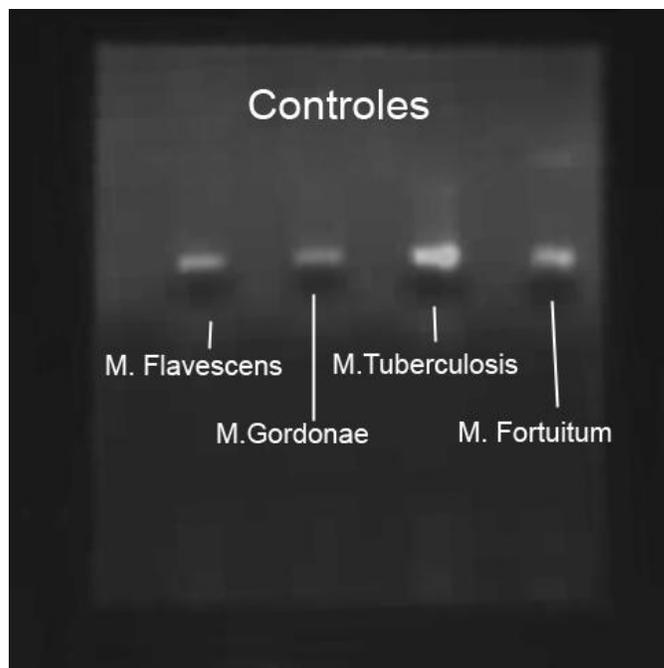


Figura 13. Extracción de ADN (controles): carril 1 corresponde a *M. flavescens*, carril 2 corresponde a *M. gordonae*, carril 3 corresponde a *M. tuberculosis* y carril 4 a *M. fortuitum*.

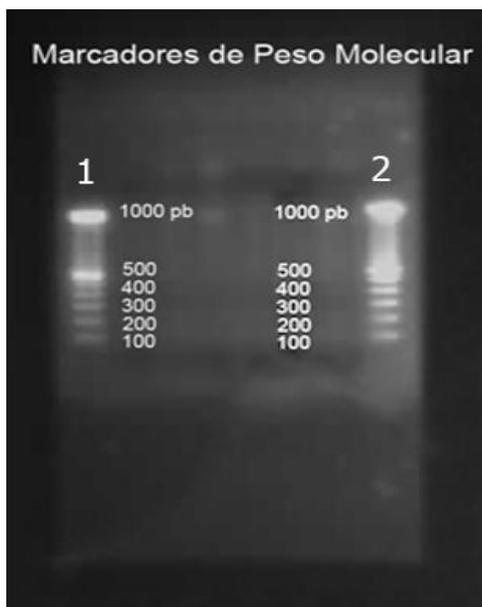


Figura 14. Carril 1 y 2 corresponden al Marcador de peso molecular de 1000 pb (Ladder, Fermentas).

De las doce cepas identificadas como *M. gordonae*, se obtuvo por PCR un fragmento de 1,035 pb en las cepas amplificadas y un fragmento de aproximadamente 330 pb, figura 15,16 y 17.

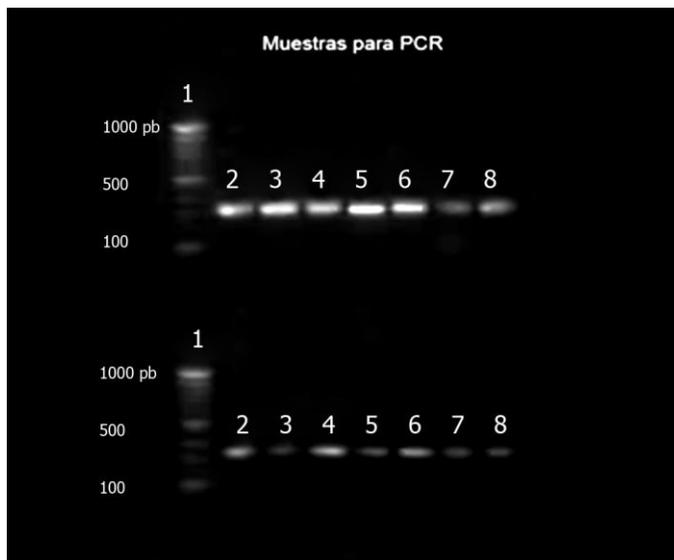


Figura 15. Muestras de PCR. Carril 1 corresponde al peso molecular en los dos geles (superior e inferior). Carriles 2 al 8 corresponden a 7 muestras de *M. gordonae* en ambos geles.

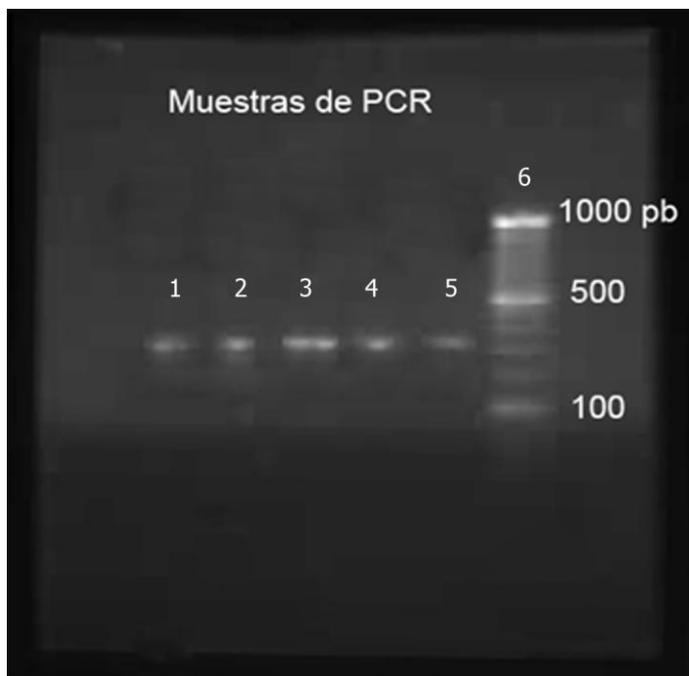


Figura 16. Muestras de PCR. Carril 1 a 5 muestras de *M. gordonae*, carril 6 corresponde al marcador de peso molecular.



Figura 17. Muestras con marcador de peso molecular, muestras y fago λ . Carril 1 Y 16 corresponden al marcador de peso molecular, carriles del 2 al 10 muestras de *M. gordonae*, carril 11 a 15 muestras de fago λ a concentración de 1, 2, 4, 8 y 10 ng.

El fragmento final de 330 pb fue purificado con el cual se logró obtener un producto mayor de 100 ng/ μ L, como puede observarse en la figura 18 en la que se encuentra representado el material obtenido de las cepas 1 a la 10.

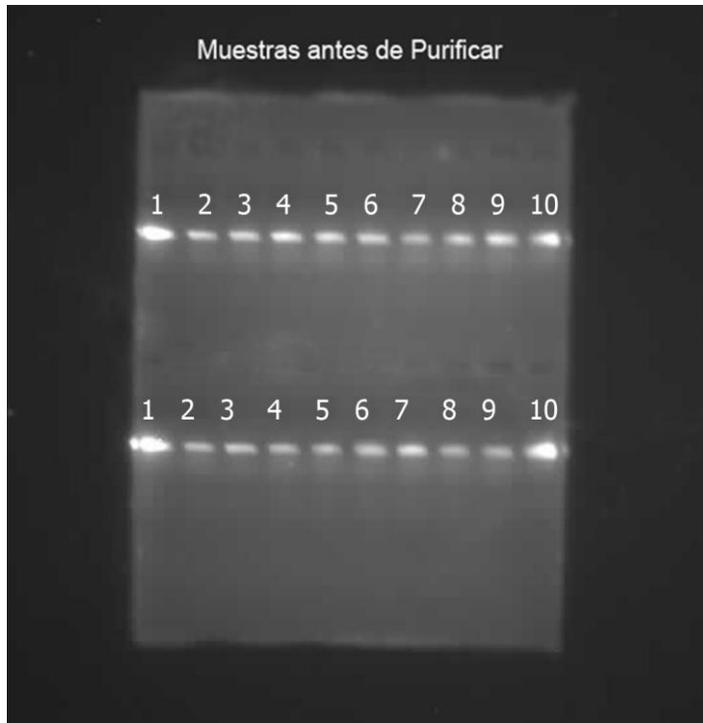


Figura 18. Muestras antes de purificar. Carril 1 a 10 muestra los productos de PCR de las muestras de *M. gordonae* para ser purificadas.

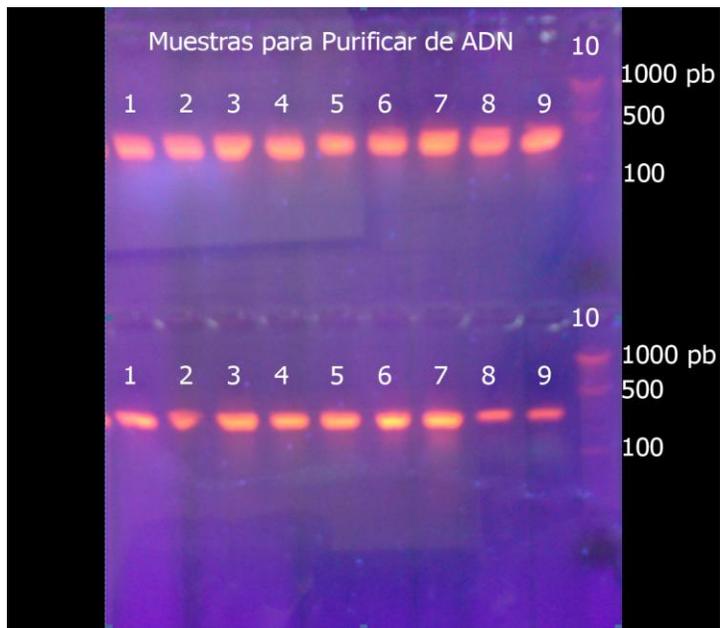


Figura 19. Productos para purificar (muestras en luz UV): carriles 1 a 9 corresponden a los productos que van a ser purificados de 9 muestras de *M. gordonae*, carril 10 corresponde al marcador de peso molecular.



Figura 20. Imagen de los fragmentos llevados a secuenciar. Carril 1 y 12 Marcador de PM, Carril 2 al 11 muestras, Carriles 13 al 16 muestras de fago λ a concentraciones de 20, 40, 60 y 80 ng.

Del material secuenciado presentamos el hallazgo obtenido, el cual corresponde a *M. gordonae*.

RESULTADOS CORRESPONDEN A: *Mycobacterium gordonae*

Secuencias obtenidas:

>1 *M. gordonae*

```
CTTCGGGGTACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCCTACACATCGGGATAAGCCTGGGAAACTGG
GTCTAATACCGAATAGGACCACAGGACACATGTCCTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCGTA
TCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAACCCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGG
```

>Mtb complex

TGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGTTGTGGTGGAAAGCGCTTTA
GCGGTGTGGGATGAGCTTGTGGTGGGGTGACG.

Tomada de Kirschner P, Meier A and Böttger EC. Genotypic identification and detection of Mycobacteria-Facing novel and uncultured pathogens. In: Persing DH et al (ed) Diagnostic Molecular Microbiology .1993, pp. 173-190.

Del análisis de alineación de la secuencia de nucleótidos de las cepas problemas de *M. gordonae* con la del complejo *M. tuberculosis* observamos lo siguiente:

```
1          GGAGCCTTCGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAATCTGCCCTGC 60
Mtb       -----TGATCTGCCCTGC 13
          * *****

1          ACATCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCACAGGACACATGTC 120
Mtb       ACTTCGGGATAAGCCTG-----CGGATAGGACCACGGGATGCATGTC 55
          ** ***** ** ***** *** *****

1          CTGTG-----GTGGAAAGC--TTTTGCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGT 173
Mtb       TTGTGTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGGATG-----AGCTTGT 100
          ****      ***** ** ***** *****

1          TGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCCACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCC 233
Mtb       TGGTGGGGTGACG-----
          ***** *

1          ACACTGGGACCGAGAT 249
Mtb       -----
```

Figura 21. Cepa número 1 de *M. gordonae* y *M. tuberculosis*.

En base a estos resultados se construyó una tabla con los cambios observados en las primeras 75 pares de bases:

Tabla 6. Resultado de la alineación de nucleótidos entre *M. gordonae* y Complejo *M. tuberculosis*.

Posición	130	144	179	192	194	196	197	204
Nucleótido <i>M. gordonae</i>	A	A	A	A	A	C	A	C
Nucleótido Complejo <i>M. tuberculosis</i> .	G	T	G	G	G	T	G	T

Los nucleótidos y la posición de estos orientan a la determinación de *M. gordonae* II, comparados con los del Complejo *M. tuberculosis*.

4.4. ANALISIS DE RESULTADOS

Los miembros pertenecientes al género *Mycobacterium*, son un grupo amplio, del cual *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, es frecuentemente identificado a nivel clínico. Si embargo, no es raro el aislamiento e identificación de micobacterias diferentes a *M. tuberculosis*, las cuales pueden ser aisladas de diversas muestras clínicas y del ambiente.

El diagnóstico de las micobacterias se basa en el hallazgo clínico y radiológico, los cuales no son específicos de la enfermedad, hay que considerar que el tratamiento también es fundamental para la evolución del paciente y la correcta identificación del microorganismo es indispensable pues las MNT requieren diferente tratamiento comparado con el de *M. tuberculosis*, (21) lo que hace necesario el diagnóstico microbiológico, para su correcta identificación, que se basa específicamente en el aislamiento del microorganismo en un medio de cultivo y su posterior identificación de especie por pruebas bioquímicas, este procedimiento tiene como principales

desventajas el tiempo requerido para todas las pruebas y que el resultado de la identificación depende en gran medida del número de organismos presentes en la muestra, el tipo de muestra y la técnica o método empleado, todos estos procedimientos convencionales tardan varias semanas y en algunos casos la identificación de especies no es concluyente (12).

En este trabajo se recolectaron micobacterias, provenientes de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría de México, obtenidas de lavado gástrico, urocultivo, biopsia y expectoración; las cuales fueron descontaminadas por los procedimientos habituales.

Inicialmente se realizó el método de identificación microscópica y macroscópica, en base a la tinción de Ziehl-Neelsen, y cultivo para el aislamiento. Tomando en cuenta el tiempo de incubación y la atmósfera de CO₂ presente; así como en las características de crecimiento, se estableció una división, entre las micobacterias de crecimiento lento (más de 7 días) y rápido (menos de 7 días) con su capacidad de pigmentación: fotocromógenas, escotocromógenas, y no cromógenas. Con esto se concluyó que las especies eran escotocromógenas y de crecimiento lento. La investigación se enfocó a estas micobacterias y se descartaron para este estudio, todas las que presentaban características diferentes a estas.

La baciloscopia; necesita una concentración mayor a 10⁴ bacterias para dar un dato positivo, es una técnica rápida, económica e inespecífica, se obtienen baciloscopias positivas en el 50% de los casos en muestras que contienen entre 5,000 y 10,000 BAAR/mL y aumenta su sensibilidad hasta 30% cuando hay 50,000 o más BAAR / mL (21).

Con este método, no se puede identificar la especie de micobacteria por lo que algunas ocasiones es posible que se reporten falsos positivos (21). El método fluorométrico es más sensible pero menos específico (3).

El cultivo tarda entre 2 y 8 semanas para dar un diagnóstico positivo (15). En la práctica se observa una sensibilidad de aproximadamente 10^2 bacilos/mL (3). La sensibilidad de los cultivos in vitro es alta cuando se trata de muestras de expectoración, sin embargo, la sensibilidad disminuye cuando se trata de muestras extrapulmonares (3).

Con los datos obtenidos se realizaron las pruebas bioquímicas pertinentes, capaces de discernir entre una especie y otra. Las pruebas características realizadas fueron catalasa termoestable a 68°C, catalasa semicuantitativa, crecimiento en cloruro de sodio al 5%, crecimiento en agar MacConkey sin cristal violeta, reducción de nitratos, hidrólisis de Tween 80, crecimiento a temperatura de 28, 37 y 42°C, e hidrólisis de urea. Con estas pruebas se pudieron diferenciar especies como *M. xenopi*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. szulgai* y *M. flavescens*.

Realizando cada una de las pruebas anteriores por triplicado se descartaron 2 especies *M. xenopi*, que presenta una prueba de catalasa semicuantitativa que no fue observada en ninguna de las muestras, así como, la prueba de Hidrólisis de Tween. De la misma forma se descartó *M. scrofulaceum*, pues no hubo una relación que pudiera hacer una identificación adecuada de este microorganismo. De esta manera se obtuvo un total de 24 cepas identificadas fenotípicamente, de las cuales, 12 cepas pertenecieron a la especie *M. gordonae*, (prueba bioquímica declarativa: reducción de nitratos), 8 a *M. szulgai*, (prueba bioquímica declarativa: crecimiento a

temperatura de 42°C) y 4 a *M. flavescens*, (prueba bioquímica declarativa: crecimiento en cloruro de sodio al 5%), con lo que se obtuvo una identificación presuntiva. Las micobacterias restantes no se pudieron identificar por medio de pruebas bioquímicas, por lo cual se considera que deben ser analizadas por otros métodos de identificación.

El fenotipo de las especies no es absolutamente estable pues exhibe variabilidad en base a las pruebas bioquímicas lo que hace difícil llegar al diagnóstico de especie a través de la caracterización fenotípica (33, 17 y 30).

Por lo que la identificación por pruebas bioquímicas de pronto puede ser ambigua y confundir los datos, haciéndolos no reproducibles. Por lo que el fenotipo de las especies no es absolutamente propio y puede exhibir remarcada variabilidad (30). Las variaciones fenotípicas en la prueba pueden resultar en la asignación de un taxón de diferentes especies, así bien como en un falso resultado, esto puede atribuirse a la interpretación errónea de pruebas bioquímicas (30).

Cabe mencionar que a todas las muestras se les había realizado la identificación por PCR para determinar el género *Mycobacterium*, empleándose los iniciadores GAG-ATC-GAG-CTG-GAG-GAT-C y AGC-TGC-AGC-CCA-AAG-GTC-TT, que permitieron la amplificación de un producto de 382 pb que forma parte del gene de la proteína 65 kDa (trabajo previo no publicado).

La identificación genotípica es considerada la mejor alternativa para una rápida y confiable identificación. Por lo que el uso de PCR, presenta como ventajas la aplicación universal en todos los aislamientos, detección directa en muestra,

reconocimiento preliminar de nuevos taxones, identificación en especies de diferentes cultivos, seguridad biológica y una adecuada relación costo-beneficio.

El *16S ADNr* presenta regiones comunes a todos los organismos pero contiene variaciones en zonas específicas, es de estructura y función constante, pero con suficiente variabilidad para diferenciar no solo los organismos más alejados sino también los más próximos.

La identificación de la bacteria a nivel de especie no requiere necesariamente de la secuenciación del *16S ADNr* completa, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 pares de bases (pb) (26).

En contraste al fenotipo y genotipo por rasgos del *16S ADNr*, este maneja una propiedad estable y específica para los microorganismos a nivel de especie, para el propósito de identificación las regiones hipervariables son particularmente útiles.

La determinación de la secuencia en la región hipervariable A es el estándar de rutina en la identificación de micobacterias por *16S ADNr* y la región B es para especies que no pueden ser identificadas en la región hipervariable A (30).

Por este motivo con el fin de determinar con certeza la especie de las micobacterias identificadas fenotípicamente se procedió a la amplificación del *16S ADNr*, macromolécula utilizada en taxonomía bacteriana y considerada una molécula muy antigua presente en todas bacterias actuales. Es referido en la literatura la no necesidad de la secuenciación del *16S ADNr* completo, ya que la variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, considerado suficiente para la correcta identificación de un aislado clínico. En nuestro caso la amplificación del segmento de

330 pb del 16S ADNr, y su secuenciación directa, nos permitió determinar la especie *M. gordonae* II, a través de la detección de las secuencias firmas.

El procedimiento completo para el estudio de este segmento, requiere menos de 36 horas desde que se recolecta el cultivo hasta la identificación. Con los instrumentos adecuados, la reacción es realizada entre 2 a 3 horas, permitiendo que el procesamiento de la muestra y la identificación se realice en 2 días después del aislamiento del cultivo puro (26).

El PCR que tiene especificidad del 98 al 100% con una sensibilidad mayor de 95% (12). Existen falsos positivos debido a la contaminación de los reactivos o personal mal capacitado (14,28).

Puede ser más sensible que el cultivo en la detección de pocos microorganismos lo cual ha sido descrito por varios autores (25).

Para optimizar la técnica cuando hay bandas adicionales y no corresponden con el fragmento requerido se puede arreglar optimizando algunos parámetros como la temperatura de hibridación, disminuir la concentración de Taq polimerasa, disminuir el tiempo de hibridación y elongación, así como el número de ciclos (25).

Se puede evitar la contaminación con reactivos, inactivación fotoquímica y experiencia en el laboratorio, cuando ocurren falsos negativos los resultados son causados por inhibidores de la ADN polimerasa, todo esto se evita asumiendo un control de calidad así como el monitoreo a lo largo del proceso.

4.5. Conclusión

Se llega entonces a las siguientes conclusiones: 1) las variaciones en las pruebas fenotípicas pueden resultar en la asignación de una especie diferente o no dar la identificación debido a la discrepancia en los resultados, 2) los resultados indican que la identificación tradicional puede no ser totalmente la apropiada para el reconocimiento de una especie patógena, esto debido a la variabilidad fenotípica de este género, 3) la determinación de la secuencia *16S ARNr* es en definitiva un método útil en la identificación comparado en tiempo con los métodos de identificación convencional, el método molecular provee de rapidez e incluso puede realizar la identificación de patógenos no descubiertos, 4) este método puede ser estandarizado para la identificación de los microorganismos a nivel laboratorio clínico en un tiempo de 24 a 36 horas y sería realmente útil para microorganismos de crecimiento lento como las micobacterias.

Los laboratorios de diagnóstico y referencia ya no deben permitir que su posición (dentro de la lucha contra enfermedades) sea dictada por los resultados que se proveen de manera limitada o con una duración de 2 a 4 semanas o hasta meses por las técnicas tradicionales (13).

El nuevo papel sería implementar procedimientos que permitan diagnosticar a un paciente en periodos más cortos de tiempo con una baciloscopia negativa, con una infección extrapulmonar, con una infección latente y con resistencia con algún antibiótico, disminuyendo así la propagación de enfermedades y la generación de bacterias resistentes, considerando las particularidades de las cepas bacterianas prevalentes en las zonas geográficas y las condiciones socioeconómicas de cada

país y cada uno debe establecer sus estrategias (13) que permitan distinguir costos y finalmente desarrollar centros de capacitación de personal. Los beneficios de proveer nuevos y más eficaces sistemas de diagnóstico serían de gran utilidad en la salud pública de la población (15).

Y que en cada diagnóstico se evalúe la comunidad y situación económica de los análisis costo-beneficio para evaluar la técnica de diagnóstico.

La ventaja de la PCR se da entonces en estudios epidemiológicos, para determinar la incidencia de bacterias no tuberculosas en la población mundial y su relevancia en enfermedades pulmonares y adquirir un mayor conocimiento de los reservorios de infección o de las rutas de transmisión así como para la comprensión de los mecanismos del proceso infeccioso (2).

BIBLIOGRAFÍA.

1. Allen B. 1998. *Mycobacteria*. Parish T, Stoker N. G. (ed). Methods in Molecular Biology; 101: 15-30. *Mycobacteria Protocols*. Edit. Humana Press Inc, Totowa, N.Y.
2. American Thoracic Society. 1997. Diagnosis and treatment of disease caused by Nontuberculous *Mycobacteria*. *Am J Respir Crit Care Med*; 156 (suppl): S1-S25.
3. Barrera R, Lizano M, Montaña L. 1992. Sondas de DNA para el diagnóstico de tuberculosis: ¿utopía o realidad? *Rev Inst Enf Resp Mex*. 5 (1):7-12.
4. Belisle J and Sonnenberg M. 1998. Isolation of Genomic DNA from *Mycobacteria*. In: Parish T, Stoker N. G. (ed). Methods in Molecular Biology, 101:31-42 *Mycobacteria Protocols*. Edit. Humana Press Inc, Totowa, N.Y.
5. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H and Böttger E. 1990. Detection and identification of *Mycobacteria* by Amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*. 28 (18): 1751-1759.
6. Brennan P. 1989. Structure of *Mycobacteria*: Recent Developments in Defining Cell Wall Carbohydrates and Proteins. *Rev Inf Dis* 11 (Supp 2): S420-S430.
7. Butler R.W and Kilburn J. O. 1988. Identification of Major Slowly Growing Pathogenic *Mycobacteria* and *Mycobacterium gordonae* by High-Performance Liquid Chromatography of Their Mycolic Acids. *J Clin Microbiol*. 26(1):50-53.
8. Conville P and Witebsky F. 1998. Variables Affecting Results of Sodium Chloride Tolerance Test for Identification of Rapidly Growing *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol*. 36 (6):1555-1559.
9. Crespo M.P, Corral R and Alzate A.1997. *Micobacterias no tuberculosas en personas VIH positivas y en personas sin factores de riesgo a la infección*. *Colombia Médica*. 28 (3):136-144.
10. Drobniwoki F. A. and Uttley A. 1988. *Mycobacterial Speciation*. Parish T, Stoker N. G. (ed). Methods in Molecular Biology, 101:323-347. *Mycobacteria Protocols*. Edit. Humana Press Inc, Totowa, N.Y.
11. Gangadharam P. and Droubi A. 1971. A Comparison of Four Different Methods for Testing the Production of Niacin by *Mycobacteria*. *Amer Rev Resp Dis.*, 104:435-436.
12. García R, Lara A, Nájera M.C, Arzate P.1999. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en niños, con empleo de dos sistemas de cultivo y su confirmación con la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Enf Inf Ped*.13 (50): 323-328.
13. Good R. 1981. The Genus *Mycobacterium*-medical. In: Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel (ed) *The Prokaryotes*. 2ª ed.2:1238-1270. Edit. Springer-Verlag.
14. Guevara G, Juárez A, Zenteno R. 2003. Tuberculosis y la importancia de incorporar, nuevas metodologías de diagnóstico. *Med UNAB*. 6 (16): 46-51
15. Hartmans S and de Bont J. 1981. The Genus *Mycobacterium*-Nonmedical. Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel (ed). *The Prokaryotes*. 2ª ed.2: 1214-1237 Edit. Springer-Verlag.
16. Kato M, Bobadilla y cols. 2002. Eficacia e impacto de la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. *Revista de Inv Clin*. 54 (6):509-514.
17. Kirschner P, Meier A and Böttger EC. Genotypic identifications and detection of *Mycobacteria*-Facing novel and uncultured pathogens. Persing DH et al (ed) *Diagnostic Molecular Microbiology* .1993, pp: 173-190.
18. Koneman W, Stephen A, Sommers and Herbert M. 1985 *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Panamericana. Capitulo 13 pp. 622-653,868,885-892
19. Konno K, Oizumi K, Shimizu Y, Tamagawa S and Oka S. 1965 Niacin Metabolism in *Mycobacteria*. *Amer Rev Resp Dis*. 93 (1):41-46.
20. Kubica G and Vitvitsky J. 1974. Comparison of Two Commercial Formulations of the MacConkey Agar Test for *Mycobacteria*. *App Microbiol*. 27 (5): 917-919.
21. Laniado R, Enriquez M, Licea A. 2001. Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Micobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de PCR. *Rev.Inst Nal Enf Resp*. México 27 (1):22-26.

22. Liu J, Barry III C, Besra G and Nikaido H. 1996. Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall. *J Biol Chem.* 271 (47): 29545-29551.
23. Pattisapo R, Abdo J. 1970. A comparison of four different methods for testing the production of niacin by mycobacteria. *Amer Rev Resp Dis.* 104 (4):434-437.
24. Patrick R Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover. *Manual of Clinical Microbiology.* Eighth Edition. ASM Press. Washington, DC. 2003.
25. Puerto G, Castro C and Ribon W. 2007. Reacción en cadena de la polimerasa: una contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. *Asociación colombiana de Infectología* 11 (2): 87-94.
26. Rodicio M, Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN16s: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica.
27. Rodríguez A, Palma S, Maestre J y cols. 2000. Detección de micobacterias en muestras clínicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Biomed* 11:257-282.
28. Rodríguez I and Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 7(3): 323-332.
29. Sosa M. 2004. Las nuevas técnicas de la Biología Molecular aplicadas en la medicina genómica. *La Salud en Durango.* 5 (1). Nov 2003-abril 2004.
30. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts G and Bottger E. 1996. Two-Laboratory Collaborative Study on Identification of *Mycobacteria*: Molecular versus Phenotypic Methods. *J Clin Microbiol* 34 (2): 296-303.
31. Urabe K and Saito H. 1964. The urease activity of mycobacteria. *Amer Rev Resp Dis* 90 (2): 266-267.
32. Váldez F, Cid A. 2004. Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr*, 95 (6):331-357.
33. Wayne L and Kubica G. 1986. The Mycobacteria. Sneath P, Mair N, Sharpe E and Holt J. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol. 2. Edit. Williams and Wilkins, pp: 1436-1457
34. Youmans Guy P. 1979. Appendix: Identification procedures. Guy P, Youmans (ed). *Tuberculosis.* Ed. W.B Saunders Company. U.S.A. pp 425-34.
35. Youmans Guy P. 1979. Disease due to Mycobacteria Other than *Mycobacterium tuberculosis.* Guy P, Youmans (ed). *Tuberculosis.* Ed W.B Saunders Company. U.S.A. pp 386-401.
36. Youmans Guy P. 1979. The Morphology and Metabolism of Mycobacteria. Guy P, Youmans (ed). *Tuberculosis.* Ed W.B Saunders Company. U.S.A. pp 35-41.
37. Youmans Guy P. 1979. Virulence of Mycobacteria. Guy P, Youmans (ed). *Tuberculosis.* Ed W.B Saunders Company. U.S.A. pp: 194-201.
38. Zumla A and Grange J. 2002. Non tuberculous mycobacterial pulmonary Infections. *Clin Chest Med.* 23: 369-376.

TABLA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	<i>M. agri</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. austroafricano</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. fallax</i>
Acetamina (Fte. N)	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Alantoinamidasas	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Arabinosa	ND	ND	+	ND	-	-	ND	ND	-	ND
Ác.p-aminosalicílico	-	-	-	-	+/+	-	-	-	-	ND
Ác. picrico, 2 mg/mL	+	+	+	+	+'/'-	+	+	+		-
Ariulfatasa (3 d)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Benzamida								-	-	ND
Catalasa (45mm)					+					
Catalasa termoestable					+					
Cloruro de sodio 5% (3d)	ND	ND	+	+	+	+	ND	+	ND	-
Cloruro de sodio 5% (14d)	ND	ND	+	+	+	+	ND	+	ND	-
Cloruro de sodio 5% (21d)	ND	ND	+	+	+	+	ND	+	ND	-
Dulcitol	ND	ND	-	ND	-	-	ND	ND	-	ND
α-Estearato	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Beta-Estearato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fosfatasa ácida	-	+	-	-	+	+	-	+	-	ND
Hidroxilamina-HCl 125 mg/MI	ND	ND	+	ND	-	+	ND			

Captación de Hierro									ND	ND	-
Inositol					-						
Isonicotinamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mac Conkey sin cristal violeta	ND	ND	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	-
Manitol	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
NH ₂ OHCL (500 µg/mL)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	ND
Niacina					+						
Nicotinamida (Fte. N)	+	-	+	+	+	+	+	+			
Nitratasa									+	+	-
Nitrito (Fte. N)	+	-	+	+		+	+	+	+	+	+
Oxalatos (captación)	ND	ND	-	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
Pigmento	N	S	S	S	N	N	S	N	S	S	N
Pironina B 0.01% (crec)	ND	ND	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Succinamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCH (1 µg/ml)					-						
Temperatura 28°C					+						
Temperatura 30°C					+						
Temperatura 37°C	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Temperatura 42°C			+	-							

Temperatura 45°C	-	-	-	-		-	-	-	-	+
Temperatura 52°C			-	-						
Tetraciclina (Fte. N)			+	-						
Tiacetazona						-		+		
Towidina azul 300 µg			+	-		+				+
Tween 80 5d hidrólisis	-	+	-	-		+	-	+	-	-
Tween 80 11d hidrólisis	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Tween 80 24 h hidrólisis	-	+	-	-		+	-	+	-	-
Urea (Fte. N)	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-

PRUEBAS BIOQUIMICAS	<i>M. kansasii</i>	<i>M. lepraemorium</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. microtii</i>	<i>M. nonchomogenicum</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. simiae</i>
Ac-p-nitrobenzoico 0.5 mg/ml	+		+	+				+		+
Ác. picrico, 2 mg/mL	-		-	-				-		+
Ariisulfatasa (3 d)	-		-	+		-	+		-	-
Catalasa (45mm)	+		-	-		+	+	+		+
Catalasa termoestable	+		+	-		+	+		+	+
Cloruro de sodio 5% (3d)	+									

Cloruro de sodio 5% (14d)	+									
Cloruro de sodio 5% (21d)	+									
α-Estearato	-		+	-				+		+
Etambutol (1 µg/mL)	+			+		-		+		+
Etambutol (5 µg/mL)	+			+	-	-		+	-	+
Fosfatasa ácida	+		-	+				-		-
A-Galactosidasa	-		-	-				-		-
Hidroxilamina-HCl 0.5 mg/mL	+		+	+				+		+
Hidroxilamina-HCl 125 mg/mL	+	-	+	+	-	+		+	+	+
Isoniazida 1 µg/mL	+		+	+		-		+		+
Isoniazida 10 µg/MI	+		-	+		-		+		+
Niacina	-		-	+		-	-	-	-	+
Nitrito (Fte. N)	+		-	-		+	-	+	-	-
Oxígeno (preferencia)	-		-	-		-	-		-	-
Peroxidasa	+			+	+		-	+		
Pigmento	F		N	F		N	S	S	N	F
Pirazinamidasa en agar	-		+	+		-	+	+	+	+
Piruvato	+	-				+	-	-		+
TCH (1 µg/mL)	+		-	-		-	-	+	-	-
Teluritos 3d red	-			-		-		-		
Teluritos 9d red	+					+		+		

Temperatura 28°C	+		+	+		+	+		-	+
Temperatura 30°C	+		+	+	-	+	+	+	-	+
Temperatura 37°C	+		+	+	+	+	+		+	+
Temperatura 42°C				-	+					
Temperatura 45°C	-		-	-	-	-	-	-	-	-
Temperatura 52°C				-	-					
Tiacetazona	-		+	+				+		+
Tween 80 5 d hidrólisis	+		+	+	-	+	-	-	+	-
Tween 80 11d hidrólisis	+		+	+		+	-	-	+	-
Tween 80 24 h hidrólisis	+		+	+		+	-	-	+	-
Urea (Fte. N)	-		+	+		-	+	+	-	+

PRUEBAS BIOQUIMICAS	<i>M. szulgai</i>	<i>M. térrea</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. xenopi</i>
Ac-p-nitrobenzoico 0.5 mg/ml	+	+		-		+
Ác. picrico, 2 mg/mL	-	ND		-		-
Ariilsulfatasa (3 d)	+	-	-	-		+

Catalasa (45mm)	+	+	+	-		-
Catalasa termoestable	+	+	+	-		+
Cloruro de sodio 5% (3d)	-	-	+	-		-
Cloruro de sodio 5% (14d)	-	-	+	-		-
Cloruro de sodio 5% (21d)	-	-	+	-		-
α-Estearato	+	+		+		+
Etambutol (1 µg/mL)		-			+	+
Etambutol (5 µg/mL)	-	-		-		+
Fosfatasa ácida	+	+		+		-
A-Galactosidasa	-	+		ND		-
Hidroxilamina-HCl 0.5 mg/mL	-	+		-		-
Hidroxilamina-HCl 125 mg/mL	+	+		-		
Isoniazida 1 g/µg/mL	ND	+		-		-
Isoniazida 10 µg/mL	-	+		-		-
Niacina	-	-	-	+		-
Nitrito (Fte. N)	+	+	+	+		-
Oxígeno (preferencia)	-	-	-	+		-
Peroxidasa				+		
Pigmento	S	N	N	N		S

Pirazinamidasas en agar	+	+	+	+		+
Piruvato		-				+
TCH (1 µg/mL)	-	-	-	-	-	-
Teluritos 3d red		-	-	-		-
Teluritos 9d red		+	-	-		+
Temperatura 28°C	+	+	+	-		-
Temperatura 30°C	+	+	+	-		-
Temperatura 37°C	+	+	+	+		+
Temperatura 42°C				+		
Temperatura 45°C	-	-	-	-		
Temperatura 52°C				-		
Toluidina azul 300 µg		+		-		+
Tween 80 5d hidrólisis	+	+	+	-		-
Tween 80 11d hidrólisis	+	+	+	-		-
Tween 80 24 h hidrólisis	+	+	+	-		-
Urea (Fte. N)	+	-	-	+		-

PRUEBAS BIOQUIMICAS	<i>M. agri</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. austro-africanum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. chubu-ense</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. fallax</i>
Acetamina (Fte. N)	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Alantoinidasa	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Arabinosa	ND	ND	+	ND	-	-	ND	ND	-	ND
Ac.p-aminosalicilico	-	-	-	-	+/'+	-	-	-	-	ND
Ac. picrico, 2 mg/mL	+	+	+	+	+/'-'	+	+	+		-
Arilsulfatasa (3 d)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Benzamida								-	-	ND
Catalasa (45mm)					+					
Catalasa termoestable					+					
Cloruro de sodio 5% (3d)	ND	ND	+	+	+	+	ND	+	ND	-
Cloruro de sodio 5% (14d)	ND	ND	+	+	+	+	ND	+	ND	-
Cloruro de sodio 5% (21d)	ND	ND	+	+	+	+	ND	+	ND	-
Dulcitol	ND	ND	-	ND	-	-	ND	ND	-	ND
α-Estearato	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Beta-Estearato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fosfatasa ácida	-	+	-	-	+	+	-	+	-	ND
Hidroxilamina-HCl 125 mg/ml	ND	ND	+	ND	-	+	ND			
Captación de Hierro								ND	ND	-
Inositol					-					

Isonicotinamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mac Conkey sin cristal violeta	ND	ND	-	ND	+	-	ND	ND	ND	-
Manitol	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
NH ₂ OHCL (500 µg/mL)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	ND
Niacina					+					
Nicotinamida (Fte. N)	+	-	+	+	+	+	+			
Nitratasa								+	+	-
Nitrito (Fte. N)	+	-	+	+		+	+	+	+	+
Oxalatos (captación)	ND	ND	-	ND	-	-	ND	ND	ND	ND
Pigmento	N	S	S	S	N	N	S	N	S	N
Pironina B 0.01% (crec)	ND	ND	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Succinamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCH (1 µg/mL)					-					
Temperatura 28°C					+					
Temperatura 30°C					+					
Temperatura 37°C					+					
Temperatura 42°C	+		-	-	+"/"-	-	-	-		-
Temperatura 45°C	+	-	-	-	-"/-	-	-	-	-	-
Temperatura 52°C	-	-	-	-	-"/-	-	-	-	-	-

Trehalosa	-								-	-	-
Tween 80 5d hidrólisis					+						
Tween 80 11d hidrólisis					+						
Tween 80 24 h hidrólisis					+						
Urea (Fte. N)					+						
Verde de malaquita	ND	ND	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
Xilosa	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-

PRUEBAS BIOQUIMICAS	<i>M. flavescens</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. morio-kaense</i>	<i>M. neo-aurum</i>	<i>M. obu-ense</i>	<i>M. para-fortuitum</i>	<i>M. pere-grinum</i>	<i>M. phlei</i>
Acetamina (Fte. N)	-	+		-	-	+		-	+	+
Alantoinamidasas	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Arabinosa	-	ND	ND	ND	ND	+	ND			+
Ác.p-aminosalicílico	-	+	ND	+	-	-	-	-		-
Ac-p-nitrobenzoico 0.5 mg/ml	+									
Ác. picrico, 2 mg/mL	+	+	-	+	+	+		+	+	+
Arisulfatasa (3 d)	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Benzamida	-	-	-	-	-	-	-	-		-
Captación de Hierro	-	+		-	ND	ND	ND		+	
Catalasa (45mm)	+	+								+

Catalasa termoestable	+	+								+
Cloruro de sodio 5% (3d)	+	+	ND	-				+		+
Cloruro de sodio 5% (14d)	+	+	ND	-				+		+
Cloruro de sodio 5% (21d)	+	+	ND	-				+		+
Dulcitol	-	-	-	-	ND	-	ND			-
α-Estearato	+	+		+	+	-	+	-		+
Beta-Estearato	+	+		+	+	+	+	+		+
Fosfatasa ácida	+	+	ND	+	-	-	-	-		+
Hidroxilamina-HCl 0.5 mg/ml	-									
Inositol		-								
Isoniazida 1 µg/ml	-									
Isoniazida 10 µg/ml	-									
Isonicotinamida	-									
Mac Conkey sin cristal violeta	-	+	ND	+	ND	-	ND	-		-
Manitol	+	+		+	+	+	+	+		+
NH ₂ OHCL (500 µg/mL)	-	+	ND	-	-	+	-	-		-
Niacina	-	-			+	ND	ND			+
Nicotinamida (Fte. N)					-	+	+	+		+
Nitratasa	+	+		-						
Nitrito (Fte. N)	+	+	+	-	+	+	-	+		+
Oxalatos (captación)	-	-	-	+	ND	-	ND	-		-

Oxígeno (preferencia)	-	+								+
Pigmento	S	N	S	S	N	S	S	P		S
Pironina B 0.01% (crec)	-	+	ND	ND	ND	-	ND	-		-
Sorbitol	+	-		+	+	-	+	-		+
Succinamida	-	-	-	+	-	-	-	-		-
TCH (1 µg/mL)	-	-								-
Temperatura 28°C	+	+								
Temperatura 30°C	+	-								+
Temperatura 37°C		+								+
Temperatura 42°C	+	+			+	+		+		+
Temperatura 45°C	-	-	-	-	-	-	-	-		+
Temperatura 52°C	-	-	-	-	-	-	-	-		+
Tiacetazona 10 µg/	+									+
Trehalosa	+			+	+	+	+	-		
Tween 80 5d hidrólisis	+	+								+
Tween 80 11d hidrólisis	+	+								+
Tween 80 24 h hidrólisis	+	+								+
Urea (Fte. N)	+	+								-
Verde de malaquita	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	-		+

Xilosa	-	-		-	-	+	-	+		+
PRUEBAS BIOQUIM.	<i>M. porcinum</i>	<i>M. poriferae</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. rhode-siae</i>	<i>M. senega-lense</i>	<i>M. septi-cum</i>	<i>M. smegma-tis</i>	<i>M. sphagni</i>	<i>M. thermo-rresistibile</i>	<i>M. toka-iense</i>
Acetamina (Fte. N)	+	-	-	-	+		+	-	-	+
Alantoina-midasa	+	-	-	-	+		-	-	-	+
Arabinosa	ND	-	ND	ND	ND		+	-	-	
Ác.p-aminosalicilico	+	-	-	-	ND		-	+	-	-
Ác. picrico, 2 mg/mL	+	+	+	+	ND		+	-	-	+
Arilsulfatasa (3 d)	+	-	-	+	+		-	+	+	+
Benzamida	-	-	-	-	+		+	-	-	
Captación de Hierro	ND	+	ND	ND	-		+	-	-	ND
Catalasa (45mm)							+		+	
Catalasa termo-estable							+			
Cloruro de sodio 5% (3d)	+	+	+	ND	+		+	-	+	ND
Cloruro de sodio 5% (14d)	+	+	+	ND	+		+	-	+	ND
Cloruro de sodio 5% (21d)	+	+	+	ND	+		+	-	+	ND
Dulcitol	ND	ND	ND	ND	ND		+	-	-	

α-Estearato	+		+	-			-	-	+	+
Beta-Estearato	+		+	-			-	-	+	+
Fosfatasa ácida	-	ND	+	+	ND		-	+	-	-
Isonicotina-mida	-	-	-	-	+		+	-	-	+
Mac Conkey sin cristal violeta	ND	ND	ND	ND	ND		-	-		ND
Manitol	+	+	-	+	+		+	+	-	+
NH ₂ OHCL (500 µg/mL)	+	-	-	-	ND		-	-	-	-
Niacina									-	
Nicotinami-da (Fte. N)	+	+	+	-	+		+	-	+	+
Nitrito (Fte. N)	-	-	+	-	+		+	+	+	-
Oxalatos (captación)	ND	ND	ND	ND	ND		+	+	-	+
Oxígeno (preferencia)							+		-	
Pigmento							N		S	S
Pirazinami-dasa en agar							-		-	
Pironina B 0.01% (crec)	ND	ND	ND	ND	ND		+	ND	-	ND
Sorbitol	-	+	-	-			+	-	-	+
Succinami-da	+	-	-	-	+		+	-	-	+
TCH (1 µg/mL)							-			
Temperatura 28°C										
Temperatura 30°C						+	+		+	

Temperatura 37°C						+	+		+	
Temperatura 42°C	+	-	+			+	+		+	
Temperatura 45°C	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Temperatura 52°C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-