



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

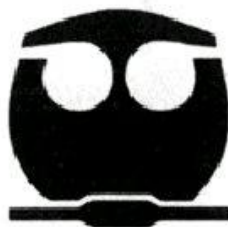
**IDENTIFICACIÓN DE
MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS
POR TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN
PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS E
INMUNOCOMPETENTES
EN EL HOSPITAL REGIONAL
“GRAL. IGNACIO ZARAGOZA” ISSSTE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

NASHIELI ISABEL VARGAS PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RAÚL GARZA VELASCO

VOCAL: Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

SECRETARIO: Profesor: MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ALVAREZ

1er. SUPLENTE: Profesor: LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

2° SUPLENTE: Profesor: SANTIAGO ÁVILA RÍOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DIAGNÓSTICA. HOSPITAL REGIONAL “GENERAL IGNACIO ZARAGOZA” ISSSTE

ASESOR DEL TEMA: MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ALVAREZ

SUSTENTANTE: VARGAS PÉREZ NASHIELI ISABEL

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar el proyecto SALUD 2006-1-44238.

La M. en C. María del Rocío López Álvarez por la confianza que me brindó para formar parte de su equipo de trabajo, sus enseñanzas, asesoría y apoyo para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado, Raúl Garza Velasco y Eduardo Bonilla Espinosa por sus comentarios y sugerencias que permitieron el enriquecimiento y mejora de este trabajo.

El Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez por guiarme y darme esos “grandes secretos” que atesoro como algo invaluable. *"No fuimos enviados a este mundo a hacer nada en lo que no pudiéramos poner nuestro corazón"* [John Ruskin]

A Antonio Bravo, Candy Bravo y Alicia Vargas, porque con ustedes aprendí que lo imposible se puede lograr; los amo y cada día son un ejemplo a seguir en mi vida.

A José López, porque no importa cuán mal puedan parecer las cosas simplemente el pensar que estabas, estás y estarás, me hace sentir segura y lista para enfrentarme a la vida.

DEDICATORIA

*La palabra **gracias** es breve, redonda, simple. Es tan fácil que muchas veces se la pronuncia sin pensar. Pero este **gracias, mamá**, podría llevarme toda la vida porque proviene de muy lejos, del comienzo de todo, porque recorre mis memorias felices y llega hasta cada día de mi presente.*

Por los incontables actos –heroicos o pequeños- de los que me hiciste protagonista. Por las noches despierta, la preocupación en tus ojos, los ruidosos amaneceres que no respetaban tu sueño, el cansancio de tu espalda.

*Por haberme abrigado con prendas que me protegían del frío a pesar de mis protestas. Por tu seguridad para formarme, tus certezas para guiarme y tu serena autoridad. Por aceptar las decisiones que voy tomando en mi vida a día o en mis estudios o en el futuro que construyo. Por los **sí**, muchos **sí**, y por tu confianza en mí frente a peligros, situaciones difíciles y viajes a sitios remotos.*

Gracias por lo mucho que aprendo de ti... tu fe en mí, con razones o sin ellas, segura y constante, sin dejar claudicar frente a mis contratiempos o a los ajenos, contra el mundo si es necesario... pero siempre a mi favor.

Eres la persona que más me ha querido en la vida. Sin medida, sin condiciones, sin demanda alguna; sólo porque soy parte de ti y te miras en mis ojos. Eres mi guía y mi modelo; me has enseñado a amar, a cuidar y a defender a quienes amo.

La vida podrá regalarme muchos sueños, pero existe uno que ansío en secreto: parecerme a ti. Cuando lo logre, me convertiré entonces en parte de este amoroso círculo iniciado mucho, mucho antes que nosotras mismas.

*Es por todo esto que Gracias a ti,
en este momento me encuentro realizando un sueño...*

Te Amo Alicia Pérez González.

ÍNDICE

	PÁGINA
Introducción	7
1. Justificación	10
2. Antecedentes	11
2.1 El género <i>Mycobacterium</i>	11
2.1.1 Características microbiológicas	11
2.1.2 Clasificación	12
2.2 Micobacterias No Tuberculosas (MNT)	13
2.2.1 Generalidades	13
2.2.2 Clasificación	14
2.2.3 Importancia clínica	15
2.2.3.1 Patología	17
2.2.3.2 Factores de virulencia	20
2.2.3.3 Tratamiento para micobacteriosis	27
2.2.3.4 Diagnóstico para micobacteriosis	31
2.3 Métodos de identificación	31
2.3.1 Métodos convencionales	31
2.3.2 Métodos cromatográficos	34
2.3.3 Métodos moleculares	34
3. Objetivos	41
4. Metodología	42
4.1 Esquema General de trabajo	42
4.2 Material Biológico	43
4.3 Búsqueda de Historias Clínicas	43

	PÁGINA
4.4 Cultivo de micobacterias	45
4.5 Extracción de DNA	45
4.6 PCR de punto final para la identificación de <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> y <i>M. goodii</i>	45
4.7 Análisis de Restricción de productos de PCR (PRA).....	49
4.7.1 Estandarización del PRA	49
4.7.2 Identificación de MNT	52
5. Resultados.....	54
5.1 Obtención de cultivos puros y extracción de DNA genómico	54
5.2 Identificación de MNT por PCR de punto final	54
5.3 Identificación de MNT por PRA	59
5.3.1 Estandarización del PRA	59
5.3.2 Identificación de MNT por PRA	59
5.4 Resultados epidemiológicos	62
6. Discusión de resultados.....	70
7. Conclusiones	87
8. Bibliografía	89
ANEXO	94
I. Abreviaturas	
II. Tinción Kinyoun	
III. Tratamiento con ácido sulfúrico para descontaminar cultivos de micobacterias	

INTRODUCCIÓN

La identificación de las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) ha dependido del agrupamiento de organismos basado en caracterizaciones fenotípicas y estudios quimiotaxonómicos que analizan los ácidos micólicos y los ácidos grasos a través de métodos que incluyen a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), la Cromatografía Gas-Líquido (GLC, *Gas Liquid Chromatography*) y la Cromatografía en Capa Fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*). Desafortunadamente, hay pocos laboratorios equipados para poder realizar estos estudios de rutina, ya que el costo para este tipo de análisis es muy alto. Sin embargo, durante las últimas dos décadas, la comparación de las secuencias genéticas del RNAr 16S se ha transformado en el estándar para la identificación de nuevas especies.

El gen *RNAr 16S*, una secuencia de aproximadamente 1 500 nucleótidos codificada por el DNA ribosómico (DNAr) 16S, es un gen altamente conservado en el genoma de las micobacterias y el fragmento que se empleará en este proyecto comprende una porción de la región codificante RNAr 16S en el que están incluidas las zonas de los promotores y las regiones variables V2 (los iniciadores *Mycav-R* y *Mycint-F* se unen a secuencias específicas aparentemente sólo presentes en la región V2 de la especie *Mycobacterium avium* y de la especie *Mycobacterium intracellulare*) y V3 de su porción codificante así como parte del extremo 3' del gen *murA* (que codifica para una UDP-acetilglucosamina carboxivinil transferasa). Todos estos elementos genéticos diana serán usados para la identificación y caracterización molecular de las MNT mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). De igual forma, en el proyecto se implantará el uso de la proteína de choque térmico de 65 kDa (del gen *hsp65*) que también está altamente conservada en el genoma de las micobacterias; una porción variable de este gen, una secuencia de 439 pb

también conocida como fragmento Telenti será utilizada para el Análisis de Restricción de productos de PCR (PRA, del inglés *Polymerase Chain Reaction Restriction Analysis*), en el cual se usarán las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, como otra forma de comparación molecular de especies.

Las MNT están presentes en aves, animales y en el hombre, donde no causan enfermedad alguna a no ser que el hospedador esté debilitado o en situación de inmunodepresión. En este caso, las micobacterias incluidas dentro de este complejo MNT tienen gran importancia en la Salud Pública ya que causan infecciones generalizadas en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en enfermos con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y diabetes. En los trabajos publicados sobre MNT se han encontrado asociaciones al tabaquismo y a la existencia de una patología pulmonar subyacente (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica -EPOC-, Tuberculosis residual y bronquiectasias).

Uno de los alcances de este proyecto se verá reflejado en la comunicación rápida del resultado de especiación de la micobacteria con el médico, que permitirá administrar un tratamiento específico para la micobacteriosis plenamente identificada. Clínicamente, la elección del tratamiento varía en función de tres factores fundamentales: la forma de presentación clínica, la especie de micobacteria responsable y el estado inmunitario del paciente. Según la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud, modificada en el 2005, los fármacos que se utilizan en el tratamiento primario acortado de la tuberculosis, son: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, y Etambutol, cuyas reacciones adversas son de daño hepático grave. En el caso de la enfermedad por el Complejo *M. intracellulare* y *M. avium* (MAC), la más frecuente descrita en la actualidad, se han administrado con éxito la Claritromicina y la Rifabutina, en el tratamiento y profilaxis de la enfermedad.

Con todo lo anterior se pretenden la identificación de MNT por técnicas de Biología Molecular (PCR y PRA), la implementación de estas técnicas como pruebas de rutina diagnóstica de cultivos positivos y la alimentación de la base de datos al recopilar la historia clínica de los pacientes portadores de micobacteriosis para su seguimiento clínico en el Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” ISSSTE.

1. JUSTIFICACIÓN

Por lo menos 125 especies de MNT han sido identificadas, de las cuales se sospecha que 60 son causantes de enfermedades en el humano. A pesar de que su frecuencia ha aumentado en los últimos años, son escasas las publicaciones sobre infecciones en nuestro país. Aunado a esto, no se ha reportado el riesgo que representa la presencia de micobacterias en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos, tales como los que padecen de SIDA o diabetes; es importante considerar a ese tipo de inmunodeficiencias, ya que el número de casos se incrementa año con año y no se sabe el riesgo que algunas de ellas puedan ocasionar a la población mexicana cuando se combinan con infecciones micobacterianas; así mismo, es importante conocer los factores que se encuentran asociados a las micobacteriosis, ya que de esta manera se podría contribuir a su control epidemiológico.

Las enfermedades pulmonares causadas por MNT son prácticamente indistinguibles de las ocasionadas por los miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), desde el punto de vista clínico, microbiológico y radiológico. Por lo tanto, la identificación correcta de la especie de micobacteria que causa una determinada infección, es crítica para el adecuado manejo del paciente, ya que se necesita de medicamentos específicos, dependiendo de la micobacteria patógena involucrada.

La búsqueda de técnicas moleculares para la identificación micobacteriana que diferencien al mayor número de especies posible, que sean rápidas, precisas, relativamente baratas comparadas con otras técnicas y que se implementen en los laboratorios clínicos como un diagnóstico de rutina, se traducirá en la rápida recuperación del paciente, impactando claramente en una disminución de costos para el Sector Salud.

2. ANTECEDENTES

2.1 El género *Mycobacterium*

2.1.1 Características microbiológicas

Taxonómicamente, las micobacterias están incluidas en el *phylum Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. El orden *Actinomycetales* incluye además a los géneros *Corynebacterium* y *Nocardia* (formando el denominado grupo CMN) y *Rhodococcus*, que se diferencian principalmente por el tipo de pared celular.¹⁶

El género *Mycobacterium* comprende bacterias con forma de bacilos rectos o ligeramente curvos, cuyo tamaño oscila entre 0.2 a 0.6 μm de ancho y 1.0 a 10 μm de largo; algunas veces pueden aparecer con formas ramificadas, filamentosas o semejantes a micelios, que pueden fragmentarse en elementos bacilares o cocoides. No forman hifas aéreas visibles. Tintorealmente, se caracterizan por una resistencia al ácido alcohol debido a una pared celular constituida por ácidos micólicos de 60-90 carbonos que impiden la eliminación de los colorantes una vez absorbidos. Son aerobias, inmóviles, no forman endosporas y su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 45°C. El contenido de guanina y citosina (G+C) del DNA varía entre el 61 y 71%.¹⁰

De vital importancia resulta mencionar que las micobacterias poseen una pared celular gruesa con un elevado contenido lipídico que constituye el 60% del peso seco de la misma (Figura 1). Esta pared consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina o glicina en el caso de *M. leprae*. Esta capa confiere rigidez y forma a la bacteria. La segunda

capa está constituida por arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa, la cual está formada por ácidos grasos de cadena larga (60 a 90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como la trehalosa 6,6`-dimicolato. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficiencia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos.^{6,12,14}

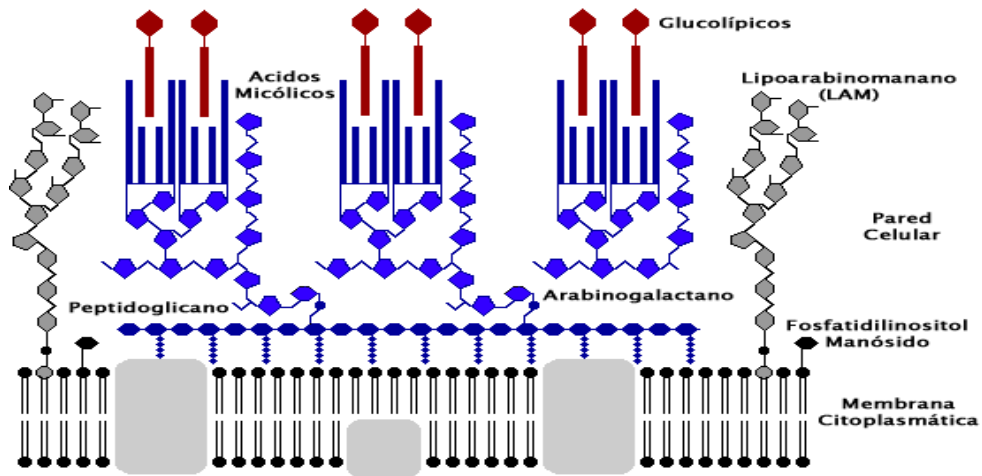


Figura 1. Esquema de la envoltura celular del género *Mycobacterium*

FUENTE: Besra GS, and Chatterjee D. *Lipids and carbohydrates of Mycobacterium tuberculosis*. In B. R. Bloom (ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. ASM Press. 1994. 285–306.

2.1.2 Clasificación

La clasificación intragenérica de estas bacterias se basa no solamente en las homologías genéticas entre los aislados como en la mayoría de las bacterias, sino también en las características patogénicas, clínicas y epidemiológicas.

Existen muchas clasificaciones de las micobacterias, una de las más aceptadas es aquella que las divide en dos grandes grupos: el de micobacterias difícilmente cultivables o no cultivables, productoras de lesiones dérmicas y nerviosas (*M. leprae* y *M. lepraemurium*); y el grupo de micobacterias cultivables, que a su vez se divide en función de la velocidad de crecimiento, en bacterias de:

- Crecimiento lento: requieren de 2 a 6 semanas para su aislamiento primario e incluyen especies patógenas para el hombre y los animales, con requerimientos nutricionales complejos (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*)
- Crecimiento rápido: el aislamiento primario se obtiene en menos de 7 días y la mayoría son especies saprófitas presentes en el suelo que no requieren factores especiales para su crecimiento (*M. phlei*, *M. fortuitum*, etc.), aunque algunas veces puedan manifestarse como patógenas.

En una simplificación clínica, las micobacterias cultivables se dividen en micobacterias tuberculosas, Complejo *M. tuberculosis* (CMT), que incluye las especies bacterianas responsables de la tuberculosis humana y animal (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. cannetti* y *M. pinnipedii*), y micobacterias no tuberculosas que también se denominan atípicas, micobacterias distintas de tuberculosis (MOTT, *mycobacteria other than tuberculosis*) o micobacterias ambientales potencialmente patógenas (PPEM, *potentially pathogenic environmental mycobacteria*).¹⁰

2.2 Micobacterias No Tuberculosas

2.2.1 Generalidades

Las MNT se distinguen del CMT por el hecho de que la mayoría de ellas no son muy virulentas; además, no hay evidencia de su transmisión persona-

persona.³⁰ Se pueden encontrar como saprófitas, comensales y simbiotes. Exhiben gran variación en su morfología colonial, sensibilidad a antibióticos, biocidas y virulencia. Son habitantes del agua, polvo, suelo, animales, hombre, plantas y alimentos. Su prevalencia se explica por su alta e innata resistencia al cloro, al ozono y a biocidas.³² Las micobacterias pertenecientes al Complejo *M. avium* (MAC), en el que se incluyen *M. avium* y *M. intracellulare*, se han aislado de los grifos de agua, habiéndose descrito, incluso, epidemias nosocomiales de enfermedad diseminada –en pacientes con SIDA– por transmisión a través de grifos de hospital; por su parte, *M. kansasii* se ha aislado de forma repetida en sistemas de conducción de agua y grifos; y *M. xenopi*, al necesitar temperaturas superiores a 28°C para su crecimiento, se aísla casi exclusivamente del agua caliente o de sus sistemas de conducción, hecho que puede producir casos intrahospitalarios; *M. marinum* tiene su reservorio y se transmite a través del agua salada, pescado fresco, agua embalsada y piscinas, mientras que *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscesus*, se pueden aislar de la tierra y del agua.⁴ Además, pueden formar biopelículas, toleran temperaturas extremas y poseen una extraordinaria capacidad de sobrevivencia en agua con bajas cantidades de nutrientes. La prevalencia de enfermedades por MNT se ha incrementado a raíz del aumento en el número de pacientes que padecen alguna inmunodepresión.³²

2.2.2 Clasificación

Las MNT se dividen en cuatro grupos basándose en las características de velocidad de crecimiento, pigmentación y morfología de las colonias, de acuerdo con la clasificación de Runyon.

Los tres primeros grupos requieren un mínimo de 14 días de incubación en condiciones óptimas para formar colonias visibles en un medio sólido.

-
- **Grupo I**, especies fotocromógenas, pigmento amarillo-claro, colonias rugosas: incluye a microorganismos que producen pigmento solamente si son expuestas a la luz (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae* y *M. asiaticum*).
 - **Grupo II**, especies escotocromógenas, colonias lisas: especies en las que la producción de pigmento amarillo-naranja es independiente de las condiciones lumínicas durante la incubación (*M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* y *M. flavescens*).
 - **Grupo III**, especies no cromógenas de crecimiento lento (*M. intracellulare*, *M. avium*, *M. xenopi*, etc.).
 - **Grupo IV**, especies de crecimiento rápido de pigmentación variable (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, etc.)²⁰

2.2.3 Importancia clínica

Las MNT colonizan, persisten, se replican y causan infecciones en humanos. Las enfermedades por estas micobacterias son llamadas micobacteriosis.

Las enfermedades producidas por MNT no son de declaración obligatoria, por lo que los datos sobre su incidencia o prevalencia sólo pueden considerarse como aproximados y estrechamente ligados a las posibilidades de aislamiento e identificación de los laboratorios locales. En cualquier caso, siempre se ha aceptado que existe una gran variabilidad geográfica, tanto en la prevalencia de la enfermedad como en las especies responsables de las mismas.³

Como el bacilo de la tuberculosis, las MNT pueden integrarse fácilmente a aerosoles, pero en este caso a los que se generan por movimientos de agua y aire en la naturaleza. Los aerosoles son aspirados por el hombre y ésta es la vía por la que más frecuentemente lo infectan, aunque también lo pueden hacer por vía digestiva o por alguna lastimadura de la piel o heridas.

Normalmente colonizan el árbol respiratorio o el tracto digestivo o urogenital sin causar daño alguno. Comúnmente los individuos inmunodeficientes (como son los que padecen SIDA y tienen bajos niveles de linfocitos T) son vulnerados por estas micobacterias; el riesgo aumenta cuando han sufrido de enfermedades pulmonares crónicas (tuberculosis, enfermedad obstructiva crónica, asbestosis, silicosis, etc.). Las MNT tienen capacidad para subsistir en soluciones o instrumentos de uso hospitalario y prótesis, elementos que pueden ser vehículos de serias infecciones posquirúrgicas.

El complejo de micobacterias oportunistas con mayor incidencia es el integrado por *M. avium* y *M. intracellulare* y su localización más frecuente es la pulmonar. Siguen, en orden de frecuencia, algunas micobacterias de rápido desarrollo: *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. En algunas áreas geográficas destaca la frecuencia de *M. kansasii*, la más virulenta entre las micobacterias ambientales y la única que normalmente es sensible al esquema antituberculoso de primera línea.

En casos excepcionales, existen motivos para dudar si lo que se ha observado, por examen microscópico o en el medio de cultivo, es una micobacteria diferente al bacilo de la tuberculosis; bajo estas condiciones es importante diferenciar entre tuberculosis, micobacteriosis o presencia de una micobacteria banal y la distinción, debe ser realizada con la mayor celeridad posible, en especial si se trata de un paciente comprometido (inmunodeprimido por efecto del VIH -virus de la inmunodeficiencia humana- o corticoides, sometido a procedimientos quirúrgicos incluyendo trasplantes, etc.). En estas situaciones se abren tres posibilidades frente al paciente: tratarlo por tuberculosis, administrar tratamiento o quimioprofilaxis contra una micobacteriosis (con esquemas diferentes a los antituberculosos) o no tratarlo. Si el paciente ya tiene quimioterapia instaurada, el resultado preciso del laboratorio orientará a mantener el esquema o modificar el régimen inicialmente adoptado. Por otra parte, si se diagnostica tuberculosis es

necesario desencadenar el control de contactos y medidas para la contención de la transmisión de la enfermedad, actividades innecesarias en el caso de identificar a una micobacteria ambiental.²⁸

2.2.3.1 Patología

De acuerdo a su patogenicidad, las micobacterias pueden ser catalogadas en tres Grupos de Riesgo: el Grupo de Riesgo I encuadra a micobacterias que nunca o excepcionalmente han sido descritas como causantes de patología en adultos inmunocompetentes; en el Grupo de Riesgo II, las micobacterias se consideraran como microorganismos oportunistas, con riesgo individual moderado y de variable gravedad para la comunidad; se considerarán como oportunistas mayores u oportunistas menores según la mayor o menor frecuencia en que ocasionan patología al hombre; finalmente, en el Grupo de Riesgo III se encuentran los patógenos, con alto riesgo de transmisión por el aire; la enfermedad suele ser grave para el individuo, a veces fatal y de gran riesgo para la comunidad (Tabla 1).⁵

Según la ATS (*American Thoracic Society*) en su artículo: *Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria*, existen diferentes presentaciones clínicas de las micobacteriosis:

➤ Enfermedad Pulmonar

La enfermedad pulmonar crónica es la más frecuente manifestación clínica localizada de MNT. El complejo MAC seguido, por *M. kansasii*, son los patógenos más frecuentemente aislados. Otros patógenos que en ocasiones causan enfermedad pulmonar incluyen a *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. celatum*, *M. asiaticu* y *M. shimodii*. Los pacientes más afectados son los adultos mayores, en general. Los signos y síntomas de la enfermedad pulmonar son variables e

Tabla 1. Clasificación de las micobacterias desde el punto de vista clínico, según al grupo de riesgo que pertenecen.

Patógenas	Oportunistas mayores	Oportunistas menores ³	Saprophytas ²
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. intermedium</i>	<i>M. flavescens</i> ¹
<i>M. africanum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. buckleyi</i>	<i>M. gastri</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. terrae</i> ¹
<i>M. canetti</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. gordonae</i> ¹	<i>M. triviale</i>
	<i>M. simiae</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. interjectum</i>	<i>M. acapulcense</i>
	<i>M. avium</i>	<i>M. bohemicum</i>	<i>M. aurum</i>
	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. tusciae</i>	<i>M. confluentis</i>
	<i>M. malmoense</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. duvalii</i>
	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. gadium</i>
	<i>M. shimodei</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. hasiaticum</i>
	<i>M. marinum</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. gilvum</i>
		<i>M. heidelbergense</i>	<i>M. phlei</i> ¹
		<i>M. novocastrense</i>	<i>M. vaccae</i>
		<i>M. fortuitum</i>	
		<i>M. chelonae</i>	
		<i>M. mucogenicum</i>	
		<i>M. septicum</i>	
		<i>M. immunogen</i>	
		<i>M. smegmatis</i>	

1. Patógeno excepcional, 2. Sólo se reseñan las que suelen aislarse de muestras clínicas humanas, 3. Micobacterias atípicas poco frecuentes como patógenos y/o descritas recientemente.

FUENTE: Casal MM y Casal M. **Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes.** Enf Emerg. 2000. 2(4): 220-230

inespecíficos, e incluyen: tos crónica, expectoración y fatiga; con menor frecuencia, malestar general, disnea, fiebre, hemóptisis y pérdida de peso. La evaluación es a menudo complicada por la coexistencia de enfermedades pulmonares (EPOC, bronquiectasias, fibrosis quística y neumoconiosis).

➤ Linfadenitis

En la actualidad, aproximadamente el 80% de los casos comprobados de linfadenitis por MNT se deben al complejo MAC; los casos restantes son causados por *M. scrofulaceum* y *M. malmoense*. La infección de nódulos linfáticos, submaxilares, cervicales o preauriculares y submandibulares en los niños entre 1 y 5 años de edad, es la presentación más común de linfadenitis por MNT. En ausencia de infección por el VIH, rara vez afecta a los adultos. La enfermedad se produce con raros síntomas sistémicos. Los ganglios linfáticos afectados son generalmente unilaterales. Los nodos pueden aumentar de tamaño con rapidez, y su eventual ruptura, incluso, con formación de fístulas, se traduce en drenaje.

➤ Lesiones cutáneas localizadas

Las especies de MNT que más comúnmente causan infecciones localizadas de la piel y tejido subcutáneo son: *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. marinum* y *M. ulcerans*. Enfermedades nosocomiales, como infiltraciones del peritoneo, abscesos, infecciones de heridas quirúrgicas, son causadas por *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. *Mycobacterium marinum* es la causa de "granuloma de las piscinas" o "granuloma pecera" y las lesiones suelen aparecer en forma de pápulas en una extremidad, sobre todo en los codos, rodillas y dorso de pies y manos, avanzando subsecuentemente a una úlcera superficial y formando cicatrices. *Mycobacterium ulcerans* causa indoloras lesiones necróticas de la piel y el tejido subyacente, que a menudo resultan en graves deformidades de las extremidades.

➤ Enfermedad diseminada en pacientes con VIH

La enfermedad diseminada por MNT en pacientes con infección por VIH, por lo general sólo se produce en los pacientes con inmunocompromiso avanzado. Debido a que estos pacientes suelen tener otras complicaciones, el diagnóstico de la infección por micobacterias puede ser confundido o retrasado. El diagnóstico es muy raro en personas con más de 100 células CD4/ μ L de sangre, y por lo general se debe sospechar sólo en las personas con menos de 50 células CD4/ μ L de sangre. La mayoría de los pacientes (> 90%) manifiestan fiebre, acompañada de sudoraciones nocturnas, pérdida de peso, anemia, dolores abdominales y diarrea. El complejo MAC y *M. kansasii* son los principales agentes etiológicos.¹

2.2.3.2 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son determinantes para la colonización y proliferación micobacteriana en el hospedero, por lo que pueden catalogarse como indispensables para la supervivencia del patógeno y la patogenia de la afección. Entre los que caracterizan a las MNT destacan los siguientes:

➤ **Micolactonas**

Son macrólidos integrantes de una pequeña familia de toxinas lipofílicas que están constituidas por una cadena de policétidos, la cual se encuentra esterificada en un segmento central de 12 átomos. Sus principales representantes son las micolactonas A y B, producidas específicamente por *M. ulcerans*, especie para la que representan un trascendental factor que sustenta la supervivencia micobacteriana en las glándulas salivales de diversos insectos, principalmente en aquellos que caracterizan a las zonas geográficas en donde la úlcera de Buruli se considera endémica.

Esta clase de compuestos parece tener actividad citotóxica, analgésica e inmunosupresora y a ellos se les atribuye la ausencia de respuestas inflamatorias durante la enfermedad; de hecho, de acuerdo con lo observado en modelos *in vivo*, la inyección subcutánea de micolactona purificada reproduce la patología causada por *M. ulcerans*. A nivel de las células del hospedero, estas sustancias inducen alteraciones en el citoesqueleto, antes de detener el ciclo celular en la fase G₀/G₁ y de provocar la muerte celular mediante apoptosis, vía la activación de las caspasas. Dado que son moléculas pequeñas e hidrofóbicas, parecen ingresar en la célula mediante difusión pasiva, sin requerir algún receptor; se acumulan en el citoplasma (no en el núcleo) uniéndose lenta pero irreversiblemente a un subconjunto de proteínas citoplasmáticas. La síntesis de estas moléculas depende de proteínas codificadas en un grupo de seis genes residentes en el plásmido pMUM001 de 174 kb (Figura 2), rico en secuencias de inserción y con importante homología en la mayor parte de sus cadenas, lo que implica cierta inestabilidad y evolución reciente; esto último con base en múltiples eventos de recombinación y duplicación. Si bien se han recuperado micolactonas relativamente homogéneas de las cepas aisladas en diferentes regiones geográficas, existe heterogeneidad en cuanto a la estructura y citotoxicidad de las asociadas a distintas clonas de *M. ulcerans*, en congruencia con sus distintos grados de virulencia y de capacidad invasiva del organismo humano.

➤ **Envoltura celular micobacteriana**

La envoltura celular se considera el principal factor de virulencia de las MNT; actúa como una importante barrera de permeabilidad para moléculas polares, lo que además confiere resistencia micobacteriana a la acción de ácidos, álcalis e hipoclorito. Se encuentra conformada por una capa interna de peptidoglicanos y de polisacáridos arabinogalactanos, a la cual rodea la capa externa constituida por proteínas, carbohidratos y lípidos, todos los que

influyen para conferir carga negativa a la superficie bacteriana, al margen de su participación como “ligandos” de unión a macrófagos. Además, los ácidos micólicos inducen diferentes respuestas por parte del hospedero y otros diversos componentes expuestos son reconocidos por ciertos receptores celulares, facilitando a la bacteria su establecimiento y multiplicación. Los principales compuestos implicados en estas tareas vitales son los siguientes:

- **Glicopeptidolípidos (GPL).** Son los constituyentes predominantes de la envoltura de numerosas MNT, aparentemente son específicos para cada especie y apoyan la evasión de los mecanismos antibacterianos macrofágicos. En este sentido, se acumulan dentro del fagosoma durante el crecimiento intracelular micobacteriano, lo que da lugar a una especie de “cápsula” que rodea y protege a las MNT de la acción de las especies reactivas de oxígeno producidas por el fagocito. Adicionalmente, los GPL tipo C presentes en patógenos oportunistas para el humano (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*) son responsables de la variación antigénica, factor importante para la evasión de la respuesta inmune.
- **Lipomananas (LMs) y lípoarabinomananas (LAMs).** Estos lipoglicanos complejos parecen promover la supervivencia de las micobacterias, interactuando con diferentes células del hospedero, regulando la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, inhibiendo la actividad microbicida de los macrófagos e impidiendo la proliferación de los linfocitos T. Las diversas formas de LAMs han sido implicadas en un amplio rango de funciones biológicas, incluidas las inhibiciones de la proliferación de los linfocitos T y de la actividad microbicida de los macrófagos, así como la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (EROS). De hecho, se les ha clasificado como modulinas, ya que manipulan el sistema inmunitario

del hospedero y desencadenan múltiples vías de señalización que controlan la apoptosis y la producción de IL-12, tanto en macrófagos como en células dendríticas.

- **Ácidos micólicos.** Representan un tercio de la masa seca de la envoltura celular y corresponden a cadenas de ácidos grasos de alto peso molecular, esterificados a los arabinogalactanos de la pared celular. Confieren al microorganismo una gran resistencia al daño químico y a la deshidratación, así como baja permeabilidad a diversos antibióticos y a sustratos hidrofílicos. Cuando la bacteria crece dentro de los macrófagos y/o en el tejido pulmonar, la cantidad de cetomicolatos (los cetomicolatos son modificaciones estructurales inducidas por metiltransferasas) es mayor, lo que sugiere la posibilidad de que esta clase de micolatos resulte importante para la supervivencia micobacteriana.
- **Glicanos.** Son los componentes predominantes en una capa de la envoltura celular equivalente a la cápsula de otras bacterias. Sus residuos de manosa, glucosa y arabinosa podrían estar involucrados en las interacciones iniciales de las MNT con los macrófagos y neutrófilos, aunque dicha capa también resulta importante para la supervivencia micobacteriana dentro de las células del hospedero; incluso, está considerada entre los factores a través de los cuales el microorganismo llega a “controlar” el sitio anatómico infectado.
- **2,3-Di-O-acíltrehalosa (DAT).** Corresponde a un glicolípido localizado en la capa exterior de la envoltura celular, cuya estructura está formada por dos cadenas de ácidos grasos y dos α -glucosas. En virtud de que no se encuentra unido covalentemente a los peptidoglicanos, puede interactuar con las células del hospedero e insertarse en la membrana de estas últimas, alterando su funcionamiento global, se

trate o no de células fagocíticas. Estudios realizados con *M. fortuitum* han revelado que estos residuos inducen una respuesta humoral (la cual en las micobacterias es inofensiva) y ejercen una acción inhibitoria en cuanto a la proliferación de linfocitos T mediada por mitógenos.

- **Fosfolipasas.** Manifiestan un amplio espectro de efectos *in vivo* e *in vitro*, los cuales incluyen desde alteraciones menores en la membrana celular hasta fenómenos letales. La expresión de estas enzimas aumenta en macrófagos infectados, lo que sugiere un papel relevante en la patogénesis.

➤ **Supervivencia micobacteriana en el interior de los macrófagos**

Las micobacterias patógenas difieren de las no virulentas en cuanto a que invaden las células del hospedero con mayor eficacia; se adhieren a diversas moléculas presentes en la superficie “blanco” y evidencian una notable capacidad para reproducirse intracelularmente.

Utilizando a *M. marinum* (especie cercanamente a *M. tuberculosis*), se han logrado identificar dos *loci*, denominados *mel1* y *mel2*, los cuales aumentan la capacidad micobacteriana para infectar macrófagos. Ambos están constituidos por 11 genes y codifican para componentes membranales o de secreción, así como para lípidos implicados en la adherencia y en el ingreso de las células del hospedero.

En *M. avium* se ha detectado una proteína cuya secuencia de aminoácidos es similar a la de la hemaglutinina de unión a heparina de *M. tuberculosis*: ambas se unen al componente C3 del complemento y su carga positiva les permite reaccionar con las moléculas con carga negativa situadas sobre la superficie de los macrófagos, e incluso, fijarse a glicoconjugados sulfatados

tales como la heparina, lo que adiciona otra vía para que el microorganismo logre adherirse a la célula “blanco” y a los componentes de la matriz extracelular, como paso previo a su internalización en las células del hospedero. En este sentido, cabe destacar que, en general, todas las micobacterias virulentas son intracelulares facultativas y que su crecimiento ocurre preferentemente en el interior de los fagosomas de la serie monocito-macrófago. Una vez dentro de la célula hospedera, las micobacterias crecen y viven dentro del fagosoma sin que ocurra su acidificación ni la fusión fagolisosomal. Sorprendentemente la bacteria interfiere la señalización en el macrófago, creando un microambiente adecuado para su propia supervivencia, que la hace resistente a los mecanismos oxidativos del fagocito. Esta situación parece deberse a que, en un lapso de 24-48 horas, se activan promotores micobacterianos asociados a actividades biológicas tales como la síntesis de nucleótidos, replicación del DNA, síntesis de policéticos, traducción de proteínas y degradación de macromoléculas.

➤ **Inhibición de la formación del fagolisosoma**

Normalmente, una bacteria es internalizada a los fagocitos dentro de vesículas denominadas fagosomas, las cuales se acidifican y se fusionan con los lisosomas, dando lugar a estructuras conocidas como fagolisosomas o lisosomas secundarios. El proceso depende de la expresión de proteínas trascendentales: la membrana del fagosoma expresa componentes específicos de superficie tales como Rab5, correspondiente a una GTPasa que regula el acoplamiento y la fusión de membranas del endosoma temprano y recluta numerosos efectores (entre los que destaca el antígeno del endosoma temprano 1) que estabilizan la estructura; posteriormente, el fagosoma pierde estos marcadores y adquiere otros, incluidos Rab7 y diversas glicoproteínas, que median el ensamble y la fusión fagosoma-lisosoma. En contraparte, las micobacterias impiden esta última fusión a fin de poder crecer dentro del fagosoma macrofágico; para ello, interfieren el

reciclaje de las proteínas Rab (evitando la adquisición de marcadores del endosoma tardío), retienen las proteínas de unión a actina coronín1 (conocidas como TACO o P57), cuya participación se ha comprobado en la organización del citoesqueleto y la fusión de vesículas, pero también desorganizan la red de filamentos de actina encargada de dar dirección al endosoma hacia su sitio “blanco”.

Adicionalmente, las serín/treonín proteín cinasas (Pkn) tienen una participación importante en la supervivencia de la micobacteria dentro del macrófago, inhibiendo la fusión fagolisosomal. Entre las más estudiadas destaca la PknG, la cual no presenta dominios transmembranales. En este contexto, se ha observado que las micobacterias avirulentas no expresan proteína PknG, lo que permite que la formación del fagolisosoma ocurra rápidamente y que los bacilos mueran por efecto de los compuestos bactericidas presentes.

➤ **Escape del fagosoma**

A pesar de la similitud existente entre las distintas micobacterias patógenas, se ha logrado establecer que sólo algunas cepas de *M. marinum* son capaces de escapar del fagosoma y liberarse hacia el citoplasma; también sorprende su comportamiento posterior: durante el escape adsorbe colas de actina de la membrana fagosómica y adquiere movilidad mediante la polimerización-despolimerización de dicha proteína contráctil. Ello propicia su propagación intercelular hacia otras células del tejido, sin entrar en contacto con el medio extracelular.¹⁷

2.2.3.3 Tratamiento para micobacteriosis

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud,

modificada en el 2005 establece que los fármacos de primera línea que se utilizan en el tratamiento primario de la tuberculosis son: Isoniacida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z), y Etambutol (E). El esquema de tratamiento primario acortado se debe administrar aproximadamente durante 25 semanas, hasta completar 105 dosis, dividido en dos etapas: fase intensiva, 60 dosis (diario de lunes a sábado con HRZE); y fase de sostén, 45 dosis (intermitente, 3 veces a la semana, con HR). (17) No obstante, estos medicamentos están asociados a una gran cantidad de efectos adversos, como los enlistados en la Tabla 2:^{27, 35}

Tabla 2. Efectos adversos causados por los fármacos antituberculosos.

Fármaco	Reacciones Adversas
Isoniacida	Neuropatía periférica, hepatitis.
Rifampicina	Hepatitis, hipersensibilidad, interacciones medicamentosas, shock, púrpura, insuficiencia renal aguda, anorexia, náusea, dolor abdominal.
Pirazinamida	Gota, hepatitis, dolor articular.
Etambutol	Alteración de la visión

FUENTE: Secretaría de Salud. **Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.** Septiembre, 2005. Organización Panamericana de la Salud. **Guía para el control de la tuberculosis en poblaciones privadas de libertad de América Latina y el Caribe** (2008). <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-prisiones-guia-ctl.pdf>

Sin embargo, a pesar de un aumento considerable en el conocimiento de las enfermedades causadas por MNT, su diagnóstico y tratamiento aún representan un reto, por varias razones: 1) patógenos aislados pueden ser indistinguibles de contaminantes o aislados saprófitos; 2) la identificación oportuna y confiable de las cepas depende de la correcta comunicación entre el médico y el personal de laboratorio; 3) la falta de pruebas de sensibilidad normalizadas hace que la adopción de las

terapias sea incorrecta; y 4) la falta de guías de tratamiento expone a los pacientes a drogas tóxicas y los resultados son decepcionantes.³⁰

La elección del tratamiento para micobacteriosis varía en función de tres factores fundamentales: 1) la forma de presentación clínica; 2) la especie de la micobacteria responsable; y 3) el estado inmunitario del paciente. La Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), en su Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas, cita tratamientos para enfermedades producidas por las principales micobacterias ambientales (Tabla 3).

La resistencia *in vitro* a la mayoría de los fármacos antituberculosos de primera línea es una de las características más llamativas de estas micobacterias y el hecho que justificó, hasta hace poco tiempo, la aplicación de tratamientos agresivos con asociaciones de hasta cinco y seis fármacos durante largos períodos de tiempo, así como la exéresis quirúrgica en caso de afección pulmonar localizada. El tratamiento actual de las enfermedades producidas por MNT es bastante complejo, por lo que debe realizarse en centros especializados y por personal experto.

Se considera que los pacientes con un recuento inferior a 50 células CD4/ μ L de sangre están en riesgo elevado de presentar infección diseminada por el MAC y, por tanto, podrían beneficiarse de una profilaxis primaria. Ésta se puede realizar con tres fármacos: Rifabutina, que induce el metabolismo de las antiproteasas y exige descartar infección por *M. tuberculosis* (monoterapia encubierta); Claritromicina, que es bien tolerada y más eficaz; o Azitromicina, más efectiva que la Rifabutina. Un inconveniente de los macrólidos es la aparición de cepas resistentes en un 11-58% de los casos en que falla la profilaxis, hecho que no se ha observado con la Rifabutina.³

Tabla 3. Tratamiento de las enfermedades producidas por las principales MNT.

Especie de MNT	Forma clínica	Tratamiento primera elección	Tratamiento alternativo	VIH
MAC	Diseminada	Claritromicina o Azitromicina + Rifabutina o Rifampicina + Etambutol	Quinolonas, Clofazimina, Amikacina, Estreptomina.	Rifabutina o Claritromicina ¹
	Pulmonar	Claritromicina o Azitromicina + Rifabutina o Rifampicina + Etambutol	Isoniacida, Estreptomina, Etionamida, Quinolonas, Clofazimina y Amikacina.	
<i>M. kansasii</i>	Pulmonar	Isoniacida + Rifabutina o Rifampicina + Etambutol	Claritromicina, Estreptomina, Sulfametoxazol.	
	Diseminada	Isoniacida + Rifabutina o Rifampicina + Etambutol	Claritromicina, Estreptomina	
	Linfadenitis	Quirúrgico	Sulfametoxazol	
<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>	Infecciones cutáneas	Amikacina + Cefoxitina	Imipenem, Tobramicina	
<i>M. marinum</i>	Heridas cutáneas	Claritromicina + Aminociclina o Doxiciclina + Trimetropina Sulfametoxazol o Rifampicina + Etambutol		

1. Claritromicina o Rifabutina deben administrarse por Rifampicina en pacientes VIH positivos que toman inhibidores de la proteasa.

FUENTE: Caminero JA. **Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas**. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. Francia, 2003. Pag 381-383.

2.2.3.4 Diagnóstico para micobacteriosis

Los métodos convencionales para la identificación de micobacterias, están basados en la microscopía para detectar los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), en el cultivo de estos microorganismos en medios sólidos para determinar la morfología colonial, pigmentación y tiempo de crecimiento, en el cultivo en medios líquidos y en pruebas bioquímicas como producción de niacina, reducción de nitrato y la producción de catalasa a 68°C; estas pruebas requieren de varias semanas para efectuarse debido al crecimiento lento de este tipo de bacterias y algunas veces la identificación precisa no es posible.⁸ Otros estudios en los que se puede apoyar el diagnóstico son la radiografía de tórax y pruebas serológicas; sin embargo, estas no son sensibles y específicas.³⁶

Los métodos alternativos de identificación provienen del desarrollo de técnicas moleculares aplicadas a la caracterización genotípica. La mayoría de estas técnicas se basan en la amplificación de DNA bacteriano por medio de PCR.²⁴

2.3 Métodos de identificación

2.3.1 Métodos convencionales

En los últimos años la Microbiología ha experimentado importantes avances tecnológicos y a pesar de ello el diagnóstico presuntivo de infección por micobacterias se sigue apoyando en el examen microscópico de las muestras clínicas teñidas de manera adecuada. En la actualidad, es el procedimiento más simple, barato y rápido para proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar. La microscopía presenta una sensibilidad inferior al cultivo, oscilando entre un 22% y un 80%. Existen diversos factores condicionantes que intervienen en la misma: a) tipo de muestra; b) volumen de muestra procesada; c) concentración de bacterias en la muestra; d) tipo

de tinción utilizada; y e) experiencia del observador. Por otro lado, no hay que olvidar que existen otros microorganismos que presentan diferentes grados de AAR (ácido-alcohol resistencia), como son: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei* y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora*.

El cultivo se basa en la velocidad de crecimiento y las características macroscópicas de las colonias. Y finalmente, las pruebas bioquímicas. El número de estas pruebas es muy amplio, lo que origina muchos problemas de interpretación de las mismas. Existe un número limitado de pruebas que se tienen que realizar, entre las que se encuentran: la catalasa semicuantitativa y termotolerancia de la misma, hidrólisis del Tween 80, ureasa, producción de niacina, reducción de nitratos, actividad fosfatasa ácida, actividad arilsulfatasa, pirazinamidasa, esterasa, resistencia a la isoniacida, crecimiento en presencia de la hidrazida del ácido 2-tiofeno carboxílico (T2H), a hidroxilamina, ácido *p*-nitrobenzoico, NaCl, tiacetazona, picrato y oleato, así como la capacidad de crecer a diversas temperaturas (Tabla 4).

El alcance de las pruebas bioquímicas dependerá de la fácil caracterización y actividad bioquímica de la micobacteria en estudio, ya que la ineficiencia de las pruebas bioquímicas para la identificación micobacteriana sugiere que las especies de MNT genéticamente distintas tienen un perfil bioquímico igual o similar. Otros aspectos negativos de estas técnicas son la necesidad de un gran inóculo (cultivos muy crecidos) y la lentitud en la obtención de resultados; usualmente están limitadas por la variabilidad en el fenotipo, falta de reproducibilidad y el lento crecimiento de algunas micobacterias. Sin embargo, la realización de pruebas bioquímicas no está obsoleta en el laboratorio de bacteriología.¹⁴

Tabla 4. Identificación bioquímica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes

Especie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	NO
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	V	-	-	-	+	V	+	V	-	-	+	+	V	-	-	NO
<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	-	+	+	+	+	NO
<i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	-	-	NO
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	+	+	-	-	NO
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-	+	ND	+	+	+	-	-	-	NO
<i>M. celatum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	ND	ND	-	+	+	+	+	NO
<i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	+	V	-	NO
<i>M. microti</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	+	-	-	NO
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+	V	-	-	V	+	-	V	+	-	+	+	+	+	+	-	NO
<i>M. kansasii</i>	-	+	V	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	V	FOTO
<i>M. marinum</i>	-	-	V	+	+	-	V	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	V	-	-	FOTO
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	+	-	+	-	+	+	+	+	-	FOTO
<i>M. simiae</i>	v	-	-	-	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	FOTO
<i>M. scrofulaceum</i>	-	V	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	ESCOTO
<i>M. goodii</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	V	+	V	-	+	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	+	-	V	+	+	+	ESCOTO

1: niacina; 2: nitratos; 3: arilsulfatasa (3 días); 4: tween 80; 5: ureasa; 6: NaCl 5%; 7: catalasa semicuantitativa; 8: catalasa termoestable (68°C); 9: Isoniacida 1 µg/ml; 10: Isoniacida 10 µg/ml; 11: Hidroxilamina; 12: ácido p-nitrobenzoato; 13: oleato; 14: Pirazinamidasa; 15, 16, 17 y 18: temperaturas de incubación a 22°C, 30°C, 37°C y 42°C respectivamente; 19: pigmento (FOTO: fotocromógeno; ESCOTO: escotocromógeno; y NO: no cromógeno); (+): positivo; (-): negativo; V: variable; ND: no determinado.

FUENTE: Fernández de Vega FA, Moreno JE, González JM y Palacios-Gutiérrez JJ. (2005) **Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.**
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.htm#1c>

2.3.2 Métodos cromatográficos

Los ácidos micólicos son α -alquil β -hidroxiácidos de cadenas largas que constituyen la mayor parte del contenido lipídico de la pared celular de las micobacterias. Los patrones de los ácidos micólicos en la pared celular varían dependiendo de la especie, por lo que su análisis ha sido usado para la identificación de micobacterias. Una alternativa es el análisis lipídico de estos microorganismos mediante diversos estudios cromatográficos: GLC, HPLC y cromatografía de gases/espectrometría de masas. De todas ellas, el estudio de los ácidos micólicos mediante HPLC ha demostrado ser rápido, reproducible, específico de especie y de aplicación universal en la identificación micobacteriana. No obstante, al igual que el resto de técnicas cromatográficas, no deja de representar un método complejo que requiere una infraestructura costosa y un gran entrenamiento, constituyendo una alternativa útil de identificación sólo en aquellos centros con la dotación y experiencia suficientes.

2.3.3 Métodos moleculares

En la actualidad, la identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una precisa y rápida identificación de las especies micobacterianas. Sus principales ventajas son: una aplicación universal sobre todos los aislamientos, la posible detección rápida (directamente de las muestras o de cultivos recientes), la identificación de microorganismos de difícil cultivo, el reconocimiento preliminar de nuevos taxones micobacterianos, la reducción del riesgo biológico derivado de la manipulación de los cultivos, y una adecuada relación coste-beneficio en los laboratorios clínicos de nivel III o de referencia. Por el contrario, aparte de las contaminaciones potenciales y las limitaciones de su empleo directo sobre muestras clínicas, estas técnicas actualmente no pueden sustituir completamente a la metodología tradicional. Por otro lado, su comercialización está relativamente poco desarrollada y algunas de estas técnicas, como la secuenciación, requieren una inversión

inicial elevada. Esta visión negativa puede ser matizada, ya que en la actualidad existe una gran variedad de técnicas con diferentes niveles de aplicación, algunas de las cuales pueden ser perfectamente instauradas en los laboratorios diagnósticos con un desembolso inicial asumible, un escaso mantenimiento y un rendimiento óptimo.

Sondas de ácidos nucleicos. En la última década han aparecido sondas comerciales de DNA no radiactivas que permiten identificar por hibridación con el RNA ribosómico micobacteriano, de forma rápida (aproximadamente dos horas) y específica, al complejo *M. tuberculosis*, el complejo MAC, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae*. Estas sondas se pueden aplicar sobre los cultivos obtenidos tanto en medios sólidos como líquidos. Así mismo, ofrecen la posibilidad de utilizarlos en medios líquidos con contenido hemático, siendo necesaria una pequeña preparación previa mediante concentración y lavado con una solución detergente SDS (dodecil sulfato sódico) y EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético). Las sondas comerciales han sufrido, a lo largo de los años, diferentes reformulaciones debido a diversos problemas de sensibilidad y especificidad pero, en la actualidad, constituyen uno de los modelos de referencia en la detección e identificación micobacteriana clínica habitual, en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados. Sin embargo, su aplicación queda limitada a un grupo de micobacterias que, si bien es el más importante desde el punto de vista clínico, no deja de ser reducido. Además, requiere una orientación presuntiva para la elección de la sonda correspondiente, al poder tan solo realizar una identificación por prueba. Esta selección puede realizarse de una forma sencilla mediante una tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) directa del cultivo. También es importante no olvidar la posibilidad de enfrentarse a cultivos micobacterianos mixtos, especialmente en los pacientes inmunodeprimidos. Esta circunstancia obliga a realizar un subcultivo, a pesar de una identificación positiva con la sonda de DNA para el complejo MAC o *M. tuberculosis*, principalmente.

Amplificación de secuencias de DNA específicas. Este grupo de técnicas requiere la amplificación, mediante PCR u otro sistema, de una zona de DNA concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos, o bien, de un posterior análisis postamplificación mediante restricción, hibridación o secuenciación. Como en toda técnica de amplificación, diversos factores influyen sobre el rendimiento final de ésta, destacando los siguientes:

1. **Elección de la secuencia diana a amplificar.** En las micobacterias existen regiones bien conservadas del DNA, específicas de género, que flanquean regiones hipervariables específicas de especie. En la actualidad las dianas mejor estudiadas son el gen *hsp65* que codifica para la proteína micobacteriana de 65 kDa y regiones genómicas de la subunidad ribosómica 16S. No obstante, existen otras zonas útiles como la región intergenética 16S-23S ribosomal y los elementos de inserción, entre otras.
2. **Preparación de la muestra.** Aunque existe la interesante posibilidad de extraer el DNA directamente de la muestra clínica, lo cierto es que las técnicas de amplificación han probado funcionar mejor a partir de cultivos sólidos o líquidos. En esta situación, la cantidad de DNA disponible es elevada y fácil de obtener, no requiriendo una extracción cuidada y laboriosa, como en el caso del procedimiento de fenol-cloroformo; tan sólo una lisis, en sus diferentes variedades, es suficiente, pudiéndose incorporar en cualquier laboratorio diagnóstico. Los métodos más sencillos y prácticos consistirían en hervir una suspensión de las colonias micobacterianas, durante 20 min, o bien llevar a cabo una rotura mecánica de las células micobacterianas mediante ultrasonidos.
3. **Amplificación.** Actualmente, esta fase no constituye problema alguno. Un gran número de laboratorios clínicos posee una mínima

infraestructura para la realización de técnicas de amplificación por PCR u otros métodos equivalentes y están familiarizados con este tipo de técnicas. Existen en la literatura numerosos artículos en donde se describen las secuencias de cebadores a utilizarse, que también pueden ser seleccionadas por cada laboratorio mediante el acceso a bancos de genes (*GenBank*) y la ayuda de un software específico. Las nuevas generaciones de termocicladores, que utilizan tubos de reacción de pared fina, completan la reacción de amplificación en menos de dos horas. Cuando se realiza la PCR a partir de cultivos, existe una gran cantidad inicial de DNA diana que impide, en gran manera, la contaminación potencial por los productos de amplificación previos, a diferencia de la amplificación diagnóstica directa sobre muestras clínicas, en donde pueden existir bajos números de microorganismos.

4. **Análisis postamplificación.** Existen diversas posibilidades, como se describe a continuación:

- **PCR-RFLP (*hsp65*).** Esta técnica, basada en la amplificación por PCR del gen *hsp65* y el posterior análisis del polimorfismo de sus fragmentos de restricción (RFLP), mediante dos enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*), consigue una identificación rápida, precisa y económica de todas las cepas micobacterianas en los laboratorios clínicos. Aunque existen otras técnicas similares (PCR-RFLP del 16S-23S), ésta es, actualmente, la mejor desarrollada, con una aplicación práctica de indudable valor. A título de ejemplo, se puede obtener el resultado final en la misma jornada laboral. Además, la experiencia acumulada en diversos centros, con una amplia relación de los polimorfismos encontrados en las distintas cepas analizadas, se encuentra reflejada en una página web (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>), en donde se pueden llevar a cabo y consultar los patrones obtenidos, así como intercambiar experiencias con diversos expertos en dicho método. Gracias a todo ello, se conoce que la

técnica es lo suficientemente confiable para diferenciar a las especies y subespecies de los diversos complejos micobacterianos, e incluso, entre las especies consideradas clásicamente homogéneas y en las que recientemente se ha descrito su heterogeneidad, como en *M. kansasii*.

• **Secuenciación (DNA) de la subunidad ribosomal 16S.** La secuenciación automática con iniciadores marcados con fluoresceína representa un avance sustancial, solucionando el problema de identificación de muchos microorganismos que, por métodos convencionales, resultan no detectables o indiferenciables. Esta técnica representa el patrón de referencia de las identificaciones genotípicas, con la mayor base de datos disponible en la actualidad (*GenBank/Entrez*). Aunque existen diversos trabajos que propugnan por su aplicación en la práctica diaria, sigue siendo un método caro y laborioso, que quedaría limitado a los laboratorios de referencia. No obstante, los avances tecnológicos son constantes y la mayor automatización con los nuevos secuenciadores capilares o la aparición de microchips de secuenciación del DNA podrían suponer una alternativa potencial en el futuro que conviene no perder de vista.

• **Hibridación en fase sólida.** Se trata de una prometedora tecnología en pleno desarrollo, basada en sondas cortas de DNA específicas de especie y presentadas en formatos más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc.) y otros de futura aplicación como los microchips (APEX, Nanogen, *Inc./Becton Dickinson Microbiology Systems*). En una sola prueba, se aplicaría el producto de amplificación sobre diversas sondas de los microorganismos más frecuentemente aislados y con importancia clínica. En la actualidad se dispone de dos productos comerciales: INNO-LiPA Mycobacteria (*Innogenetics NV*, Gante, Bélgica) y *GenoType Mykobacterien* (*Hain Diagnostika*, Nehren, Alemania). Ambos métodos, identifican al CMT, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M.*

celatum y *M. malmoense*. Además, el nuevo INNO-LiPA incluye a *M. simiae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum* y *M. smegmatis*, mientras que el *GenoType* incorpora a *M. peregrinum* y *M. phlei*. Ambos sistemas se basan en la amplificación de una zona genética concreta (espacio intergenético 16S-23S para el INNO-LiPA y el 23S DNAr para el *GenoType*). Posteriormente, se realiza la hibridación del producto de amplificación sobre las diferentes sondas dispuestas en una tira de nitrocelulosa, lo que facilita su lectura e interpretación. En los pocos estudios realizados se ha observado que ambos sistemas son muy similares, con una buena sensibilidad y especificidad a partir de cultivos líquidos y sólidos, obteniéndose los resultados en seis horas. Además de la variedad de especies que pueden identificarse en una sola prueba, otra ventaja de estos métodos consiste en la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Los principales inconvenientes son la laboriosidad y coste de ambos, aunque inicialmente el *GenoType* es algo más económico.

5. ***Amplificación y detección en tiempo real.*** Más recientemente, se ha comenzado a utilizar, con fines diagnósticos, la tecnología de amplificación y detección en tiempo real. Estos métodos se basan en la realización simultánea de la amplificación de una zona diana concreta y el reconocimiento de ésta mediante hibridación lo que, a su vez, es detectada y cuantificada mediante el uso de diversos fluorocromos. Las mayores ventajas residen en su rapidez (tres horas) y las posibilidades futuras de aplicación para un amplio abanico de especies, así como para la detección e identificación directas a partir de muestras clínicas. En la actualidad, existen diversos sistemas de amplificación y marcaje, aunque sólo uno está comercializado: el *BDProbeTec ET* (*Becton Dickinson*, Sparks, Estados Unidos). Éste se basa en la amplificación por desplazamiento de cadenas de DNA (SDA, *strand displacement amplification*) y su posterior detección

mediante la transferencia de energía fluorescente (ET). A partir de cultivos, incluye la identificación de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium*, así como *M. kansasii*. Existe, además, la posibilidad de identificar al primero de estos complejos, directamente de las muestras respiratorias. En general, tanto el *BDProbeTec* ET, como los métodos no comercializados que utilizan los sistemas *LightCycler* (*Roche Molecular Biochemicals*, Mannheim, Alemania) o ABI Prism 7700 con sondas TaqMan (*PE Applied Biosystems*, Foster City, Estados Unidos), se encuentran en desarrollo y la experiencia adquirida es escasa. No obstante, los primeros datos son prometedores, pudiendo constituir en el futuro una alternativa real para la identificación micobacteriana en la práctica diaria de nuestros laboratorios.¹³

3. OBJETIVOS

➤ GENERAL

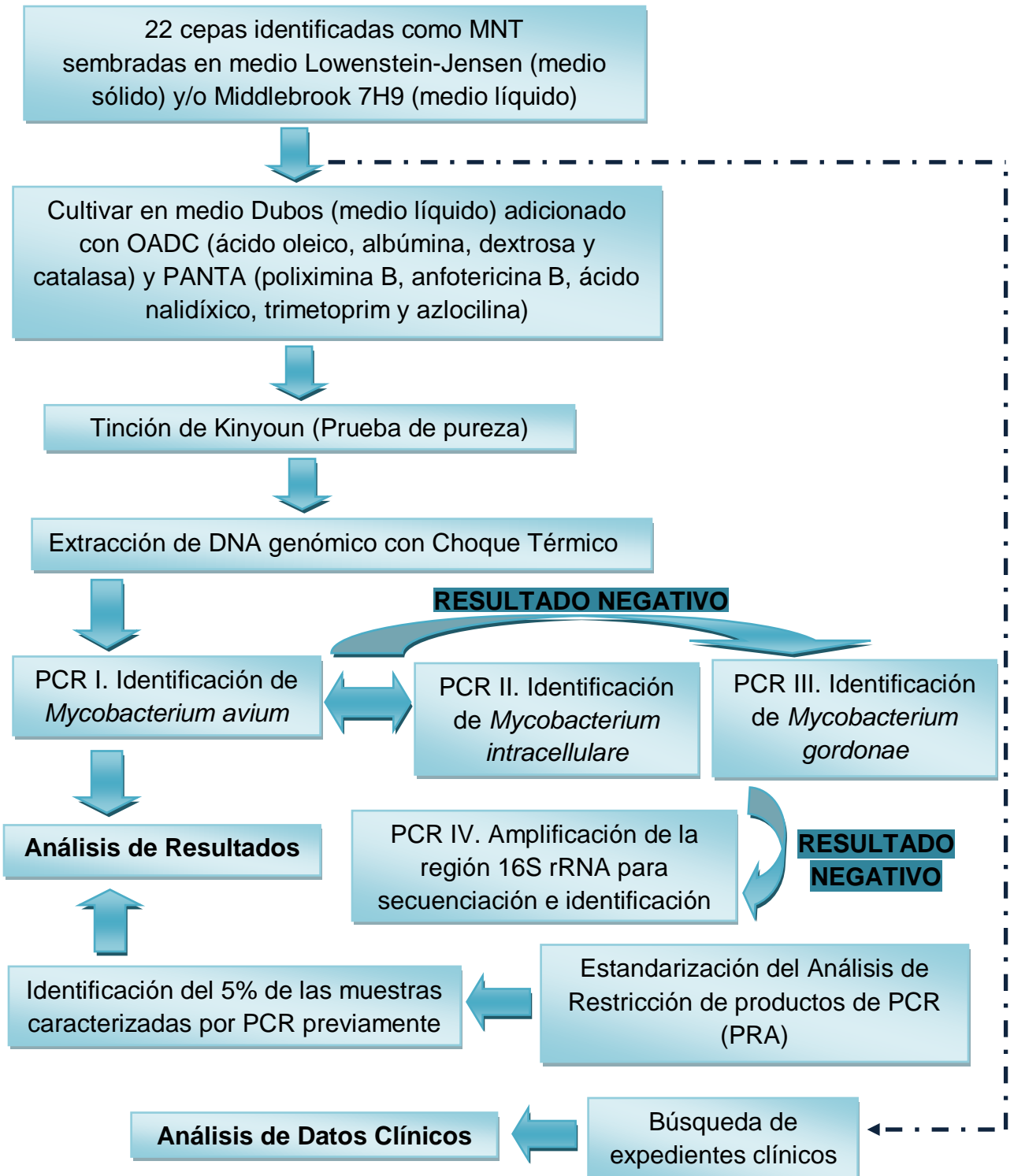
Identificar, a nivel de especie, por técnicas de Biología Molecular, 22 cepas reportadas como micobacterias no tuberculosas provenientes de muestras clínicas de pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes del Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” ISSSTE.

➤ ESPECÍFICOS

1. Identificar a las especies de micobacterias no tuberculosas mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con el uso de iniciadores específicos.
2. Estandarizar el Análisis de Restricción de productos de PCR (PRA), analizando un número representativo de muestras identificadas previamente por PCR, realizando una comparación de resultados entre ambos métodos.
3. Recabar información clínica de los pacientes a los cuales se les identificó una MNT, con la intención de crear una base de datos que ayude a identificar los factores de riesgo que más frecuentemente se asocian a la presencia de micobacterias en pacientes Inmunocomprometidos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Esquema General de Trabajo



4.2 Material Biológico

Se analizaron 22 cepas de MNT provenientes de 17 pacientes del Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” ISSSTE, con diagnóstico clínico y microbiológico de micobacteriosis pulmonar y/o extrapulmonar y que padecieran o no algún tipo de inmunodepresión secundaria (VIH, diabetes, cáncer, etc.) Las cepas provinieron de abscesos, líquido de ascitis, líquido pleural, sangre periférica, aspirado bronquial, médula ósea, ganglio, orina y esputo.

Las cepas procedían de medio sólido Lowenstein-Jensen (LJ) y/o medio líquido Middlebrook 7H9. Como método de rutina se procedió a realizar los frotis correspondientes con el fin de evaluar la pureza de los cultivos, los cuales se tiñeron por la técnica de Kinyoun (ver Anexo I) la cual es una modificación de la Tinción de Ziehl-Neelsen.

Es importante mencionar que para el análisis de resultados correspondiente a los datos clínicos hallados, se tomarán un total de 60 cepas identificadas, esto se debe a que este trabajo experimental es la segunda parte de un proyecto financiado por CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) con número: SALUD 2006-1-44238, en el que para la primera parte el objetivo fue estandarizar PCR's que identificaran al CMT.

4.3 Búsqueda de Historias Clínicas

Se realizó la búsqueda en el Archivo del Hospital de las historias clínicas de los pacientes en estudio, en base a un cuestionario (Figura 3) para elaborar una base de datos epidemiológicos.

**CUESTIONARIO PARA PACIENTES CON
CULTIVO POSITIVO DE MICOBACTERIAS**

1. **Nombre** **Edad**
Ocupación **Cédula ISSSTE**
2. **COMBE¹** () SI () NO
3. **Vacuna BCG²** () SI () NO
4. **Inmunodepresión asociada**
() VIH () Diabetes () Desnutrición
_____ Otra inmunodepresión activa
5. **Manifestaciones clínicas**
() Tos crónica () Neumonía cavitada y fibrosis () Neuroinfección
() Síndrome de sepsis generalizada () Linfadenomegalias
_____ Otra
6. **Baciloscopía positiva**
() Esputo () Ganglio (aspirado bronquial) () Médula ósea
() Sangre periférica () Líquido cefalorraquídeo
_____ Otra
7. **Prueba de PPD³** () Realizada () No realizada
8. **Tratamiento actual** _____
9. **Otros tratamientos**
() ARV⁴ () Esteroides _____ Otros
10. **Respuesta clínica** () Curación () Deceso () Persistencia
11. **Respuesta bacteriológica** _____

1. *El ser contacto de un caso bacilífero hace positivo este criterio.*
2. *Bacilo Calmette Guerin*
3. *Derivado Proteico Purificado*
4. *Antiretrovirales*

**Figura 3. Cuestionario para pacientes con
cultivo positivo de micobacterias**

4.4 Cultivo de micobacterias

Después de corroborar la pureza de los cultivos, se re-sembró cada uno de ellos en 50 mL de medio líquido Dubos (BD, *Becton Dickinson*) el cual en su preparación fue enriquecido con 15 mL de OADC (BBL MGIT OADC, BD): ácido oleico 0.6 g/L, albumina bovina 50.0 g/L, dextrosa 20.0 g/L y catalasa 0.03 g/L y como supresor del crecimiento de flora normal o contaminante 15 mL de una mezcla antibiótica, PANTA (BBL MGIT PANTA, BD): poliximina B 6.000 unidades, anfotericina B 600 µg, ácido nalidíxico 2.400 µg, trimetoprim 600 µg y azlocilina 600 µg. Los cultivos fueron incubados a 37°C de 7 a 21 días, haciendo una revisión de crecimiento y pureza cada semana a través de la técnica de Kinyoun, estos cultivos se utilizaron para la extracción de DNA.

4.5 Extracción de DNA

Una vez confirmada la pureza del cultivo, se realiza la extracción de DNA por el método de Choque térmico. Se tomaron de 500 a 1000 µL del sedimento del cultivo y se centrifugaron a 14 000 rpm por dos minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 100 µL de agua estéril; finalmente se hirvió durante 10 minutos y al cabo de estos inmediatamente se transfirió a hielo y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

4.6 PCR de punto final para la identificación de *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*

- **Identificación de cepas: *M. avium* (PCR I) y *M. intracellulare* (PCR II)**

Simultáneamente se realizan los PCR I (identifica a *M. avium*) y PCR II (identifica a *M. intracellulare*). Cada reacción de PCR, fue llevada a un

volumen final de 25 μL , de los cuales 2 μL son de lisado bacteriano y 23 μL de la mezcla de reactivos. Ambas reacciones contienen: Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM pH=8.4, MgCl_2 50 mM, dNTP's 10 μM (Invitrogen) y 50 U/ μL de Taq polimerasa (*Taq* DNA Polimerasa Invitrogen). En cuanto a los iniciadores (Tabla 5), para el PCR I se usaron el par de iniciadores RAC-1 y *Mycav*-R y para el PCR II el par de iniciadores *Mycint*-F y RAC-8, ambos pares a una concentración final 10 μM . Las PCR fueron sometidas a un programa de amplificación que constaba de una pre-desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada uno de los cuales consistió en una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una alineación a 55°C por un minuto y una extensión a 72°C por 2 minutos, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos, en un termociclador *Mastercycler personal* Eppendorf.^{7,23}

Tanto en el PCR I como en el PCR II, los fragmentos amplificados fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen) al 1% en TAE (Tris-acetato-EDTA) (Gibco) teñido con bromuro de etidio (Invitrogen). Se usó un marcador de peso molecular de un tamaño de 1500 pb con fragmentos de 100 pb a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Invitrogen).

Es importante mencionar que las regiones amplificadas, comprenden parte del extremo 3' del gen *murA* (que codifica para una UDP -acetilglucosamina carboxivinil transferasa) y una porción de la región codificante 16S RNAr, de este último gen están incluidas la zona de los promotores y las regiones variables V2 y V3 de su porción codificante. Específicamente, RAC-1 se une al extremo 3' del gen *murA* mientras que RAC-8 a la región codificante del gen 16S RNAr. Los iniciadores *Mycav*-R y *Mycint*-F se unen a secuencias específicas sólo presentes en la región V2 de la especie *M. avium* y de la especie *M. intracellulare*, respectivamente (Figura 4).

Tabla 5. Descripción de los iniciadores que identifican a *M. avium* (PCR I) y *M. intracellulare* (PCR II)

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Identifica:
RAC-1	TCGATGATCACCGAGAACGTG TTC	900	<i>M. avium</i> (PCR I)
Mycav-R	ACCAGAAGACATGCGTCTTG		
RAC-8	CACTGGTGCCTCCCGTAGG	176	<i>M. intracellulare</i> (PCR II)
Mycint-F	CCTTTAGGCGCATGTCTTTA		

FUENTE: Martínez PI. **Desarrollo de un esquema de identificación de las principales micobacterias de importancia clínica y su prevalencia en una población mexicana.** (Tesis Doctoral). México: CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional: 2008.

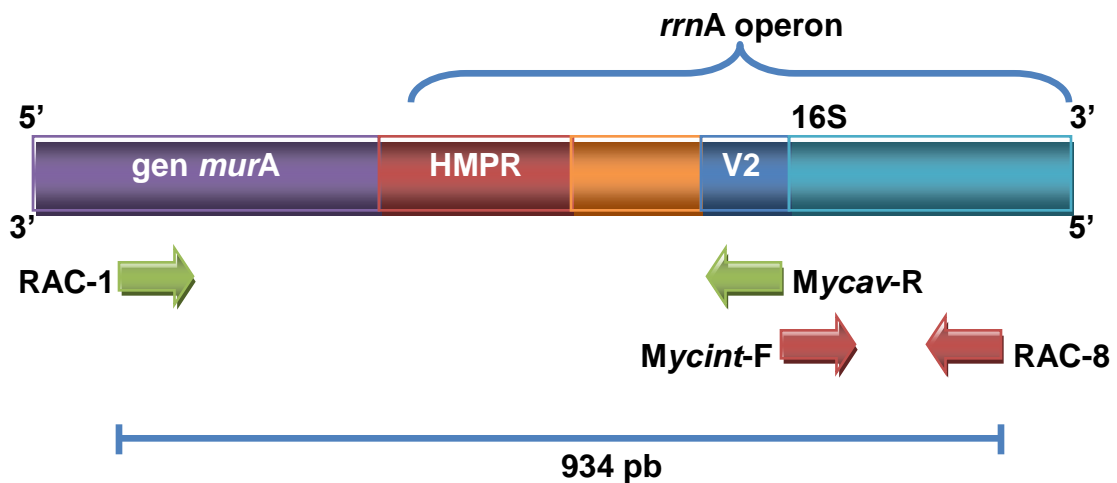


Figura 4. Descripción de la región que amplifican los iniciadores usados para identificar a *M. avium* y *M. intracellulare*.

FUENTE: Cobos-Marín GL, Montes-Vargas J, Rivera-Gutiérrez S, Licea-Navarro A, González-y-Merchand JA and Estrada-García I. **A novel multiplex-PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* in clinical isolates of both veterinary and human origin.** Epidemiol. Infect. 2003. 130: 485–490

➤ **Identificación de cepas: *M. gordonae* (PCR III)**

Las cepas no identificadas como *M. avium* o *M. intracellulare*, fueron sometidas a un PCR que identifica *M. gordonae*. El PCR III tiene las mismas concentraciones de cada reactivo en la mezcla de reacción que el PCR I y II. El par de iniciadores (Tabla 6) usados son: G1 y G3¹¹, ambos pares a una concentración 10 µM. El PCR fue sometido al mismo programa de amplificación y condiciones de electroforesis que los PCR I y II.

Tabla 6. Descripción de los iniciadores que identifican a *M. gordonae* (PCR III)

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Identifica:	Región amplificada
G1	CCCTACGCAGA CTGACAGCAA	407	<i>M. gordonae</i> (PCR III)	Secuencia completa de nucleótidos del antígeno 85A de <i>M. gordonae</i>
G3	AGCCACCGACG AACCCC			

FUENTE: Dumonceaux M, Fauville MD, Ooms J, De Wit L, Sonck P and Content J. ***Cloning of the antigen 85A from Mycobacterium gordonae and its use for the specific PCR identification of these mycobacteria.*** *Molecular and Cellular Probes.* 1997. 11:251-258

➤ **Secuenciación e identificación de cepas que no hayan sido ya identificadas como *M. avium*, *M. intracellulare* o *M. gordonae*.**

Las cepas que no puedan ser identificadas a través de los PCR I, II y III; fueron sometidas a un último PCR: PCR IV. El PCR IV tiene las mismas concentraciones de cada reactivo en la mezcla de reacción que el PCR I, II y III. El par de iniciadores (Tabla 7) usados son: RAC-1 y RAC-8 (Figura 26), ambos pares a una concentración 10 µM. El PCR fue sometido a un programa de amplificación que constaba de una pre-desnaturalización a

95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada uno de los cuales consistió en una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una alineación a 56.2°C por un minuto y una extensión a 72°C por 2 minutos, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos, en un termociclador *Mastercycler personal* Eppendorf. Las condiciones de electroforesis que se usaron para visualizar el fragmento amplificado, son mismas antes mencionadas. El fragmento amplificado fue cortado del gel y purificado un ayuda de un Kit de Purificación de fragmentos de DNA (*PureLink Quick Gel Extraction Kit*, Invitrogen) y mandado a secuenciar al Instituto de Fisiología en la UNAM. Los resultados fueron analizados con el programa Chromas.exe.

Tabla 7. Descripción de los iniciadores que amplifican la región 16S rRNA

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Identifica:	Región amplificada
RAC-1	TCGATGATCACCGA GAACGTGTTC	934	Género <i>Mycobacterium</i>	16S rRNA
RAC-8	CACTGGTGCCTCCC GTAGG			

FUENTE: Cobos-Marín GL, Montes-Vargas J, Rivera-Gutiérrez S, Licea-Navarro A, González-y-Merchand JA and Estrada-García I. ***A novel multiplex-PCR for the rapid identification of Mycobacterium bovis in clinical isolates of both veterinary and human origin.*** Epidemiol. Infect. 2003. 130: 485–490

4.7 Análisis de Restricción de productos de PCR (PRA)

4.7.1 Estandarización del PRA

En primera instancia se realizó una revisión de la técnica de PRA desarrollada por el investigador Amalio Telenti y colaboradores, publicada en el artículo: *Identification of Mycobacteria to the Species Level by*

Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis ³⁷, con el propósito de instaurar un protocolo a seguir para realizar la estandarización de dicha técnica. De igual forma, el protocolo fue retroalimentado con información del Manual de Identificación de Micobacterias Atípicas del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina en Caracas, Venezuela.

La técnica fue dividida en tres etapas:

1. Amplificación de un fragmento de 439 pb del gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico de 65 kDa
2. Digestión enzimática de los amplicones generados
3. Interpretación de los patrones obtenidos

Se probó en primera estancia el siguiente diseño de la técnica, sin embargo, una o varias condiciones quizá sea conveniente cambiar, tal sea el caso de las condiciones de amplificación, concentraciones de los geles de agarosa, etc., para que el PRA proporcione buenos resultados.

➤ ***Amplificación del gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico de 65kDa***

Cada reacción de PCR fue llevada a un volumen final de 50 μ L, de los cuales 2 μ L son de lisado bacteriano y 48 μ L de la mezcla de reactivos. La mezcla de reacción contiene: Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM pH=8.4, MgCl₂ 50 mM, dNTP's 10 μ M (Invitrogen) y 50 U/ μ L de Taq polimerasa (*Taq* DNA Polimerasa Invitrogen). Se usaron el par de iniciadores TB11 y TB12 (Tabla 8) ambos a una concentración final 10 μ M. El PCR fue sometido a un programa de amplificación que constaba de una pre-desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada uno de los cuales consistió en una desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una alineación a 55°C

por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos, en un termociclador *Mastercycler personal* Eppendorf.

El fragmento amplificado fue visualizado por medio de electroforesis en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen) al 1% en TAE (Gibco) teñido con bromuro de etidio (Invitrogen). Se uso un marcador de peso molecular de un tamaño de 1500 pb con fragmentos de 100 pb a una concentración de 1 µg/µL (Invitrogen).

Tabla 8. Descripción de los iniciadores que amplifican un fragmento del gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico de 65kDa

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Identifica:	Región amplificada
TB11	ACCAACGATGGTGT GTCCAT	439	Género <i>Mycobacterium</i>	Fragmento del gen <i>hsp65</i> que codifica para la proteína de choque térmico de 65kDa
TB12	CTTGTCGAACCGCA TACCCT			

FUENTE: Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC and Bodmer T. ***Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis.*** *Journal of Clinical Microbiology.* 1993. 31 (2): 175-178

➤ **Digestión enzimática de los amplicones generados**

Para la digestión con *Bst*EII (Promega), 15 µL del producto de PCR obtenido fueron adicionados directamente a una mezcla de 10 µL que contenía 0.5 U de enzima, 2.5 µL de buffer de restricción D (60 mM Tris-HCl, pH=7.9; 1.5 M NaCl, 60 mM MgCl₂ y 10 mM DTT), 6.75 µL de agua y 0.25 µL de BSA (albumina de suero bovino) acetilizado a una concentración de 0.1 mg/µL;

esto fue incubado a 60°C por una hora. En la digestión con *HaeIII* (Invitrogen), 15 µL del producto de PCR fueron adicionados directamente a una mezcla de 10 µL que contenía 0.5 U de enzima, 2.5 µL de buffer de restricción (50 mM Tris-HCl, pH=8.0; 50 mM NaCl y 10 mM MgCl₂) y 7.0 µL de agua; esto fue incubado a 37°C por una hora.

Al finalizar el tiempo de digestión, a 25 µL de la mezcla digerida se le adicionaron 4 µL de buffer de carga (0.25% azul de bromofenol, 40% de sacarosa), los cuales fueron cargados en un gel de agarosa al 2.5% en amortiguador TAE que posteriormente fue teñido con bromuro de etidio. Se uso un marcador de peso molecular (Invitrogen) de un tamaño de 500 pb, con bandas de 25 pb.

➤ ***Interpretación de los patrones obtenidos***

Finalmente, los patrones obtenidos fueron interpretados en base a un algoritmo de identificación de micobacterias que se encuentra en la página <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>, el cual está diseñado en base a la amplificación de un segmento de 439 pb del gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico de 65 kDa y el análisis de restricción de los productos obtenidos con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*, de igual manera se consultaron estos algoritmos en la literatura (Figura 5).^{2,31}

4.7.2 Identificación de MNT

Una vez estandarizado el PRA, se eligieron 5 cepas ya identificadas por PCR (PCR I, II y III), las cuales representan el 20% del total de las cepas identificadas. Se eligieron cepas 4 cepas de diferente especie (*M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*) y una que fue necesario procesarla para secuenciar (*M. avium*).

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de cultivos puros y extracción de DNA genómico

Al término de la incubación a 37°C por dos semanas, se obtuvieron 22 cultivos positivos en cuanto a su crecimiento, el cual fue evaluado por la presencia de abundante biomasa en el fondo del tubo cónico. Al realizarles la tinción de Kinyoun para verificar su pureza, 18 cultivos resultaron puros y con un alto número de bacilos, por tanto se procedió inmediatamente a la extracción de DNA genómico. En tres de los cultivos restantes la pureza no fue total pues aún cuando se observó la presencia de BAAR también se encontraron cocos, estas muestras fueron re-sembrados a partir de sus cultivos originales (dos provenientes de medio sólido LJ y uno de medio líquido M7H9; en todos se verificó que no existiera alguna contaminación) en medio líquido Dubos enriquecido con OADC y PANTA; finalmente al término de dos semanas tras una incubación a 37°C, estos cultivos resultaron puros y adecuados para la extracción de DNA. En el cultivo restante, se obtuvo una contaminación total con bacilos y cocos; al realizar una tinción al cultivo original (LJ) se encontró la misma contaminación pero había presencia de BAAR, por tanto, se llevó a cabo una descontaminación con ácido sulfúrico (ver Anexo I) previa a la re-siembra en medio líquido Dubos, finalmente el cultivo resultó puro y apto para la extracción de DNA.

5.2 Identificación de MNT por PCR de punto final

➤ **Identificación de cepas: *M. avium* (PCR I) y *M. intracellulare* (PCR II)**

Las 22 cepas fueron sometidas a identificar con el PCR I y PCR II, los cuales caracterizan a *M. avium* y *M. intracellulare* respectivamente, se encontraron que 17 corresponden a *M. avium* (Figura 6A) y 3 a la especie micobacteriana *M. intracellulare* (Figura 6B).

➤ **Identificación de cepas: *M. gordonae* (PCR III)**

A las dos últimas cepas por identificar se les realizó el PCR III, el cual identifica a la micobacteria *M. gordonae* con el uso de los iniciadores específicos G1 y G3. De estas, una (TCM-14) fue identificada como *M. gordonae*.

➤ **Secuenciación de cepas que no hayan podido ser identificadas**

Finalmente, solo una cepa (muestra 5-GGA) no amplificó con ninguno de los tres pares de iniciadores: RAC-1/*Mycav*-R (*M. avium*), RAC-8 /*Mycint*-F (*M. intracellulare*) y G1/G3 (*M. gordonae*). Por tanto, se procedió a amplificar un fragmento de 934 pb del 16S rRNA con el par de primers RAC-1/RAC-8 que identifican a la cepa como perteneciente al género *Mycobacterium*, dicho fragmento fue purificado y posteriormente llevado a secuenciar al Instituto de Fisiología de la UNAM. Los resultados fueron leídos con el programa Chromas.exe e ingresados a la base de datos *GenBank*, el resultado es el reportado en la figura 7. El alineamiento realizado para la secuencia dada dio 2 resultados que analizaron cerca de 700 nucleótidos de los 708 ingresados; sin embargo, el segundo resultado fue descartado por identificar a la cepa como *M. avium subsp. paratuberculosis*, sabiendo que esta especie micobacteriana afecta principalmente al intestino delgado (enfermedad de Crohn) y que el paciente presentó una micobacteriosis pulmonar. Es así que el primer resultado al alineamiento nos indica que la secuencia se encontró en la micobacteria *M. avium* y se localizó en un segmento del 16S RNAr que codifica para una UDP-acetilglucosamina carboxivinil transferasa.

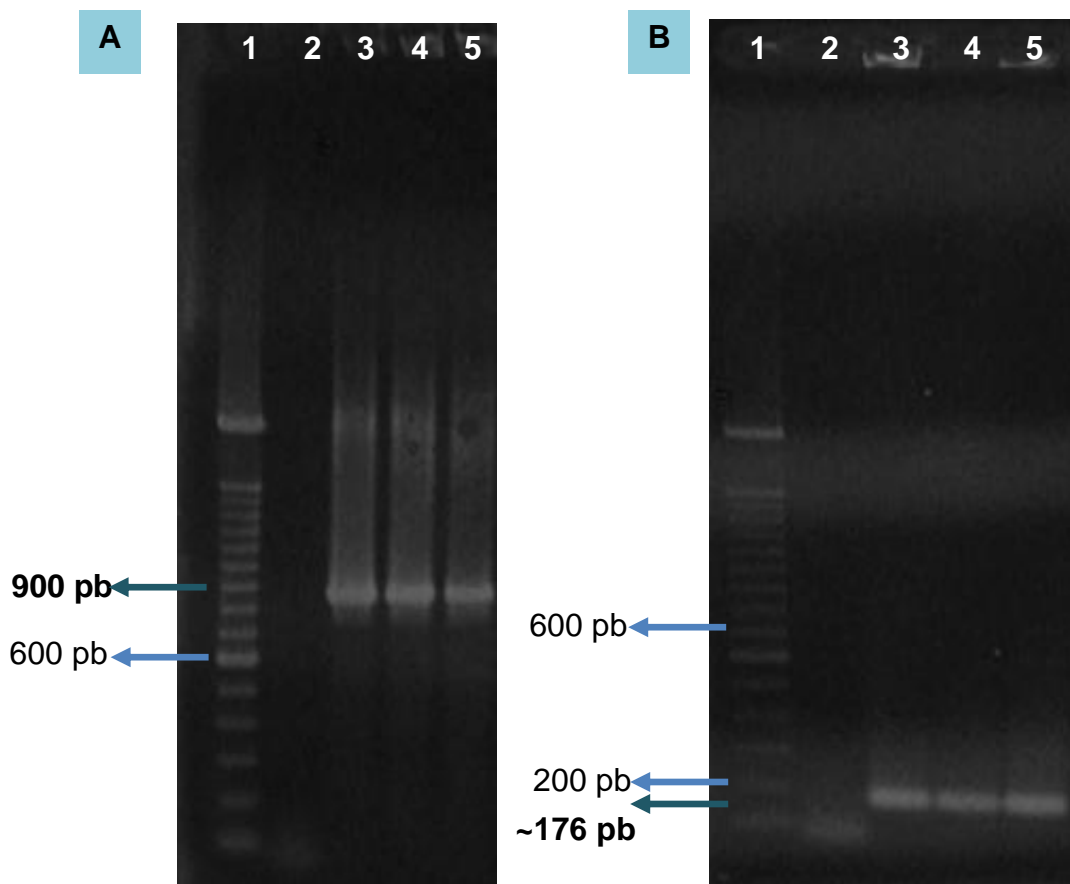


Figura 6. Electroferogramas del PCR I y PCR II para diferenciar *M. avium* y *M. intracellulare*

A) Amplificación con los iniciadores RAC-1 y Mycav-R, las muestras positivas darán una banda de 900 pb. Carril 1 y 6, marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen); carril 2, blanco NTC (se sustituye el DNA con agua para detectar contaminaciones cruzadas); carril 3, DNA *M. avium* (muestra 7-OMJ); carril 4, DNA *M. avium* (muestra 8-GHJ) y carril 5, DNA *M. avium* (muestra 11-CTR). **B)** Amplificación con los iniciadores RAC-8 y Mycint-F, las muestras positivas darán una banda de 176 pb. Carril 7, blanco NTC; carril 8, DNA *M. intracellulare* (muestra 13-CRE); carril 9, DNA *M. intracellulare* (muestra 15-MSJ) y carril 10, DNA *M. intracellulare* (muestra 22-CSL).

```

>|gb|CP000479.1| D Mycobacterium avium 104 complete genome
Length=5475491

Features in this part of subject sequence:
  UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
  rRNA-16S ribosomal RNA

Score = 1221 bits (661), Expect = 0.0
Identities = 690/708 (97%), Gaps = 6/708 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Figura 7. Resultado del alineamiento de la cepa micobacteriana correspondiente a la muestra 5-GGA

Los resultados para la identificación de las 22 cepas analizadas es el siguiente:

	Código de la cepa	Especie identificada		Código de la cepa	Especie identificada
1	1-GRD	<i>M. avium</i>	12	12-ME	<i>M. avium</i>
2	2-GRD	<i>M. avium</i>	13	13-CRE	<i>M. intracellulare</i>
3	3-MBD	<i>M. avium</i>	14	14-TCM	<i>M. gordonae</i>
4	4-MBD	<i>M. avium</i>	15	15-MSJ	<i>M. intracellulare</i>
5	5-GGA	<i>M. avium</i>	16	16-HTJ	<i>M. avium</i>
6	6-OMJ	<i>M. avium</i>	17	17-HTJ	<i>M. avium</i>
7	7-OMJ	<i>M. avium</i>	18	18-HVG	<i>M. avium</i>
8	8-GHJ	<i>M. avium</i>	19	19-HVG	<i>M. avium</i>
9	9-ZGY	<i>M. avium</i>	20	20-VMS	<i>M. avium</i>
10	10-CRS	<i>M. avium</i>	21	21-MAL	<i>M. avium</i>
11	11-CTR	<i>M. avium</i>	22	22-CSL	<i>M. intracellulare</i>

En los datos obtenidos, en cuanto al número total de cepas analizadas en el proyecto CONACYT 44238, el cual en su primera etapa identifico de un total de 60 cultivos a 38 cepas como micobacterias pertenecientes al CMT, se agregan a continuación las 22 identificaciones de MNT realizadas en este

trabajo, que es la segunda parte del mencionado proyecto (Figura 8). Los resultados globales de la identificaciones hechas con PCR de punto final (iniciadores específicos) son los siguientes: de un total de 60 cepas; 37 fueron identificadas como *M. tuberculosis*, una como *M. bovis*, 18 como *M. avium*, 3 como *M. intracellulare* y una como *M. gordonae* (Figura 9).

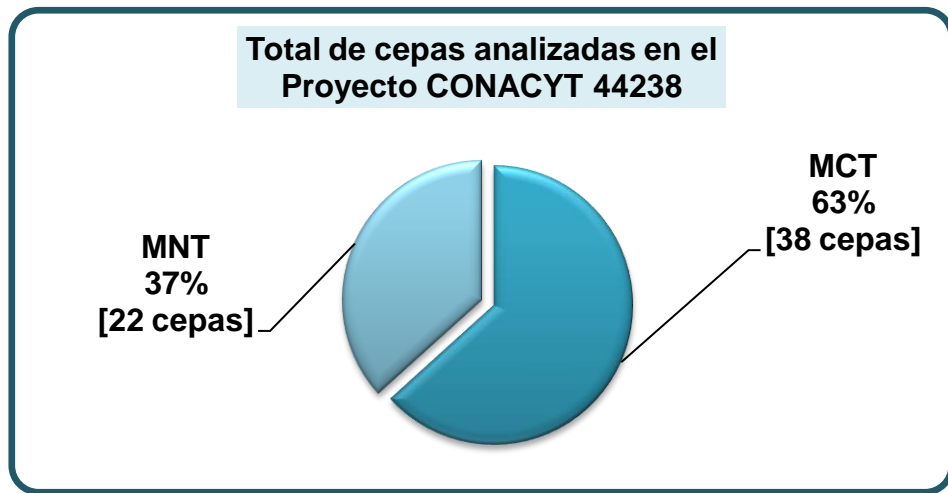


Figura 8. Total de cepas identificadas en el proyecto CONACYT 44238

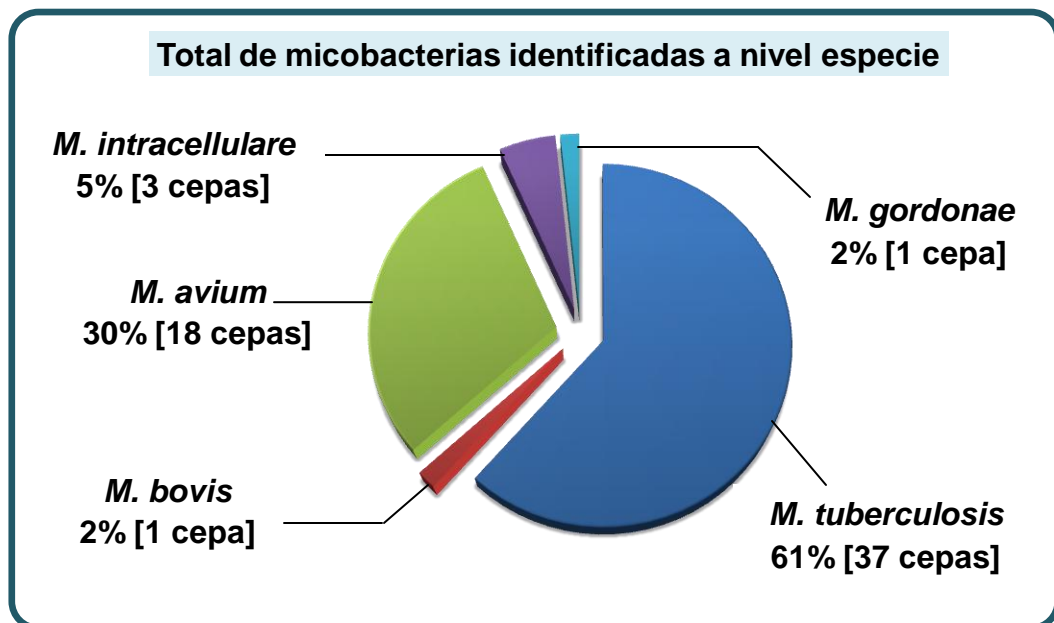


Figura 9. Total de micobacterias identificadas a nivel especie por PCR de punto final

5.3 Identificación de MNT por PRA

5.3.1 Estandarización del PRA

Al protocolo diseñado para la estandarización del PRA fue apropiado, se encontró que la amplificación con los pares de iniciadores TB11/TB12 (los cuales amplifican un fragmento del gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico de 65 kDa) dio fragmentos de 439 pb sin productos inespecíficos, sin embargo, se observa la presencia de una mancha que asemeja a una banda en el blanco (Figura 10), en cuanto a la digestión enzimática, los resultados fueron adecuados pues se generaron patrones que son útiles para la identificación en los algoritmos del sitio electrónico “PRA SITE”.

5.3.2 Identificación de MNT por PRA

Se realizó la identificación de 5 cepas ya identificadas por PCR en punto final con el protocolo estandarizado del PRA. Se obtuvieron patrones como el generado por la muestra 7-OMJ (Figura 11) que fueron analizados en el sitio electrónico <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> (Figura 12)

Los resultados de las identificaciones con el método del PRA son los mostrados en la tabla 9, así como los resultados obtenidos por PCR de punto final.

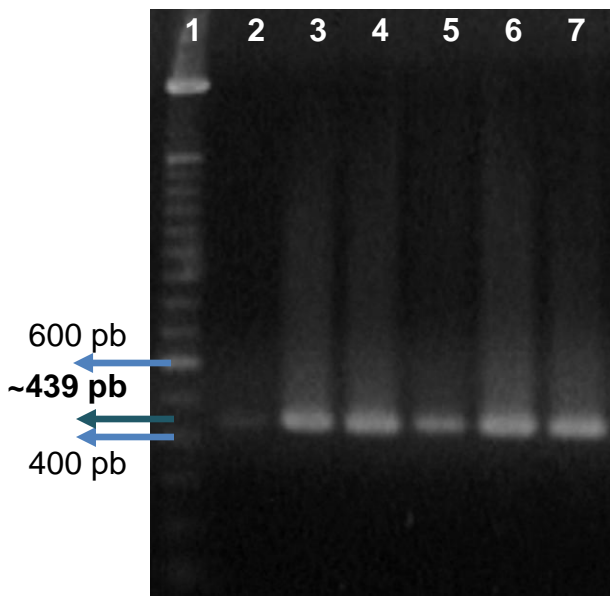


Figura 10. Amplificación del gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico de 65 kDa (439 pb).

Amplificación con los iniciadores TB11 y TB12. Carril 1, marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); carril 2, blanco NTC; carril 3 *M. avium* (Muestra 7-OMJ); carril 4, *M. goodnae* (Muestra 14-TCM); carril 5, *M. intracellulare* (Muestra 22-CSL); carril 6, *M. avium* (Muestra 5-GGA); carril 7, *M. tuberculosis* H37Rv.

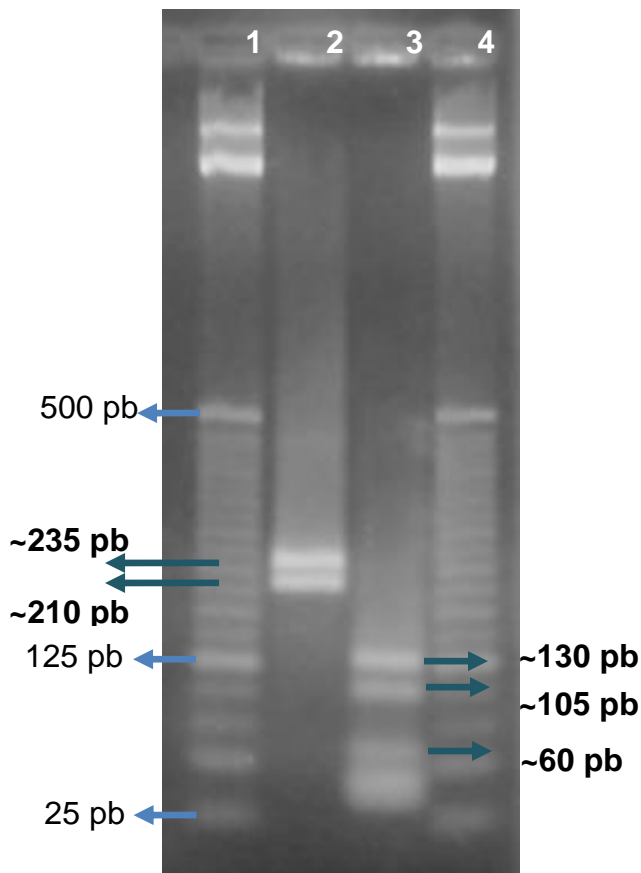


Figura 11. Patrones obtenidos con la digestión enzimática de los amplicones generados (Muestra 7-OMJ)

Amplificación de los amplicones generados con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*. Carril 1 y 4, marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen); carril 2, amplicones generados por la enzima *BstEII* de aproximadamente 235 y 210 pb; carril 3, amplicones generados por la enzima *HaeIII* de aproximadamente 130, 105 y 60 pb.

QUERY PRA DATABASE RESULTS				
	Query	BstE II	Hae III	
	Your Query	235/210/0	130/105/60	
ID	Species	BstE II	Hae III	Score
33	Mycobacterium colombiense type 1	235/210/0	130/105/60	0
14	Mycobacterium avium s. avium type 2	235/210/0	130/105/60	0

Figura 12. Resultado de la captura de los patrones de la muestra 7-OMJ (Figura 10) en el banco de datos del “PRA SITE” (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>)

Tabla 9. Resultados de la identificación de MNT por el método del PRA y comparación de los obtenidos por PCR de punto final.

Código de la cepa	Identificación PRA	Score PRA	Identificación PCR
7-OMJ	<i>M. avium s. avium</i> tipo 2	0	<i>M. avium</i>
	<i>M. colombiense</i> tipo 1	0	
14-TCM	<i>M. gordonae</i> tipo 9	0	<i>M. gordonae</i>
22-CSL	<i>M. intracellulare</i> tipo 1	7	<i>M. intracellulare</i>
	<i>M. chimaera</i> tipo 1	7	
5-GGA	<i>M. avium s. avium</i> tipo 2	0	<i>M. avium</i> **
	<i>M. colombiense</i> tipo 1	0	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> complejo tipo 1	0	<i>M. tuberculosis</i>

** Esta identificación no fue posible realizarla por PCR en punto final, por lo que se mandó a secuenciar.

5.4 Resultados epidemiológicos

En cuanto a las 22 cepas identificadas y de acuerdo al origen de estas (muestras clínicas), se tiene que 3 micobacteriosis tienen localización pulmonar (esputo y aspirado bronquial) y las 19 restantes localización extrapulmonar (orina, mielocultivo, hemocultivo, líquido pleural, líquido de ascitis, abscesos y ganglio). La tabla 10, muestra los resultados obtenidos haciendo una relación entre la muestra clínica y la micobacteria identificada.

Tabla 10. Resultados obtenidos en base a la localización en el organismo de la micobacteriosis y la micobacteria identificada

	ORIGEN DE LA MUESTRA	MICOBACTERIA IDENTIFICADA			TOTAL
		<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. gordonae</i>	
LOCALIZACIÓN PULMONAR	Esputo	1	-	-	1
	Aspirado bronquial	1	1	-	2
LOCALIZACIÓN EXTRAPULMONAR	Orina	3	2	1	6
	Mielocultivo	4	-	-	4
	Líquido pleural	1	-	-	1
	Hemocultivo	5	-	-	5
	Líquido de ascitis	1	-	-	1
	Abscesos	1	-	-	1
	Ganglio	1	-	-	1
TOTAL		18	3	1	22

Como anteriormente se mencionó se parten de 22 cepas, sin embargo, están corresponden a 17 pacientes; esto debido a que al laboratorio en 5

ocasiones fueron remitidas dos muestras clínicas diferentes de un mismo paciente, suceso común en un laboratorio de diagnóstico pues todas las manifestaciones clínicas requieren ser estudiadas, por tanto, es necesario mostrar los resultados obtenidos de la prevalencia de MNT y micobacterias pertenecientes al CMT por paciente caracterizadas en este proyecto: al 39% de los pacientes (17 individuos) se les caracterizó una MNT, mientras que al 61% (27 individuos) se les identificó una micobacteria perteneciente al CMT (Figura 13).

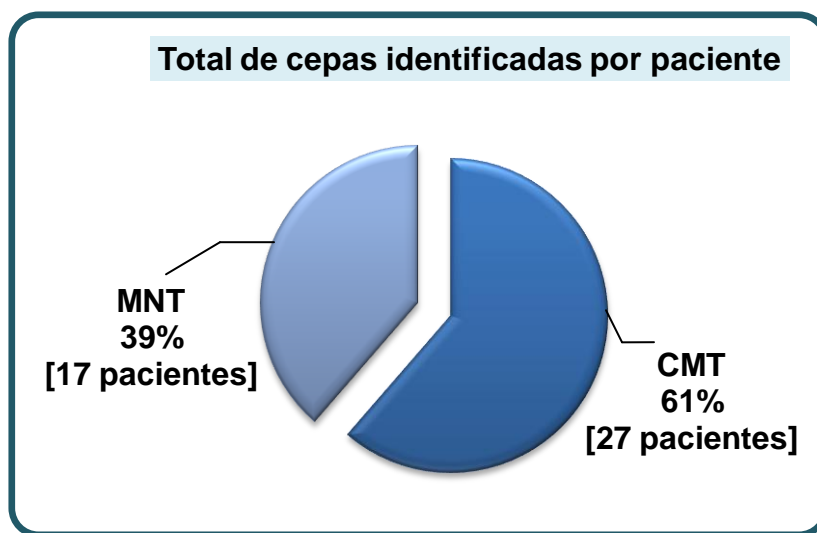


Figura 13. Total de cepas identificadas por paciente

Considerando el factor antes mencionado y que además de que no fue posible obtener la historia clínica de dos pacientes pues no fue permitido acceder al expediente, los resultados epidemiológicos serán presentados en base a la información recabada de 15 pacientes.

En cuanto a la edad y el sexo, existe una ligera prevalencia de afectación en el sexo masculino del 67% (10 de los 15 pacientes) entre las edades de 31 a 50 años; en el sexo femenino la afectación se presentó en mujeres mayores a 51 años (Figura 14). Las ocupaciones de los pacientes son diversas: amas de casa, estudiantes, médicos, administrativos, policías y mecánicos. El 20%

de los individuos indicó haber tenido contacto con un paciente infectado de tuberculosis. El 60% de los pacientes indicaron haber recibido la vacuna BCG, mientras que al 40% restante no les fue administrada la vacuna. Para mostrar las manifestaciones clínicas (Tabla 11), las muestras clínicas fueron agrupadas en 4 grupos de localizaciones: pulmonar (aspirado bronquial y esputo), renal (orina), diseminada (hemocultivo, mielocultivo, líquido pleural y líquido de ascitis-absceso) y ganglionar (ganglio). En base al punto anterior, 86% de los pacientes tienen una localización extrapulmonar y el 14% localización pulmonar.

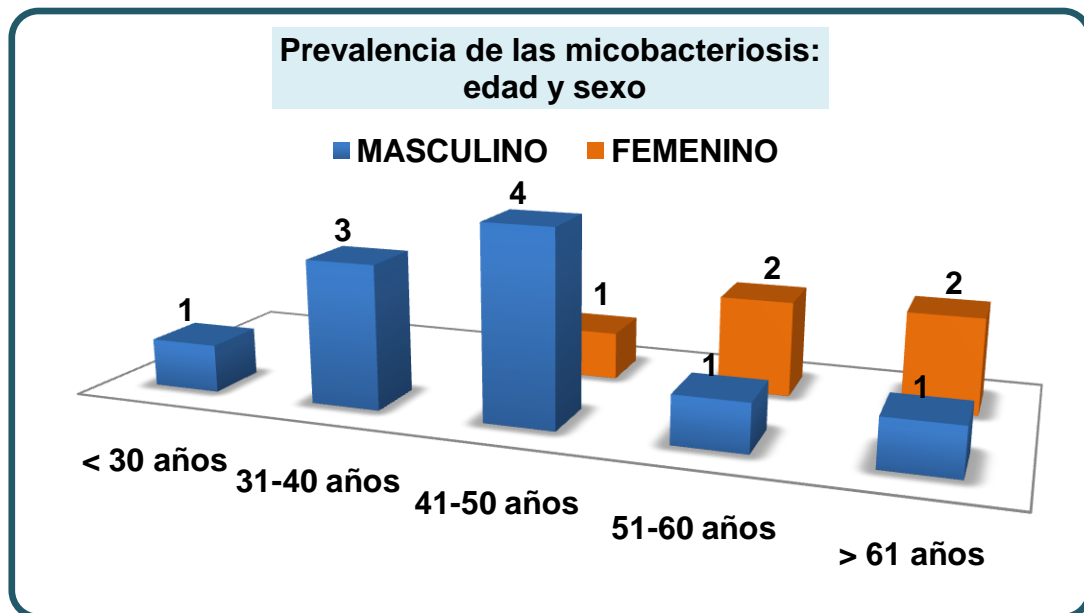


Figura 14. Prevalencia de las micobacteriosis identificadas de acuerdo a la edad y sexo del paciente

Las principales inmunodepresiones en las que se basó este trabajo fueron la diabetes y el VIH, por la actual prevalencia de estas enfermedades en nuestro país, sin embargo, secundariamente se toma la desnutrición como un factor que hace más susceptible al paciente de adquirir una micobacteriosis. De los 15 pacientes: 5 (los cuales representan el 33%) padecen diabetes, 6 (40%) padecen VIH y 4 (27%) aparentemente no tienen ningún tipo de inmunodepresión (inmunocompetentes). De los 5 individuos

con diabetes, 2 de ellos presentan desnutrición y otro tipo de inmunodepresión (leucemia y cáncer broncogénico, respectivamente). Finalmente, de los 6 pacientes con VIH, 5 de ellos presentan desnutrición y adicionalmente 2 de ellos histoplasmosis, uno criptococosis y uno linfoma no Hodgkin difuso (Figura 15). En cuanto, a la especie micobacteriana identificada y a la relación que existe con algún tipo de inmunocompromiso, se halló que *M. avium* (Figura 16A) se presenta en un 55% en individuos con VIH, en un 36% en pacientes con diabetes y en un 9% en pacientes sin alguna inmunodepresión aparente; *M. intracellulare* (Figura 16B) en un 67% se presentó en individuos inmunocompetentes y un 33% en afectados con diabetes. *M. gordonae* se idéntico en un individuo sin algún tipo de inmunocompromiso.

Tabla 11. Manifestaciones clínicas de los pacientes a los cuales se les aisló una MNT, de acuerdo con la localización de la especie micobacteriana

Localización	Manifestaciones Clínicas
Pulmonar	Desgaste, fiebre, diaforesis (excesiva sudoración profusa), tos seca o con expectoración, síndrome diarreico, astenia (sensación generalizada de cansancio, fatiga y debilidad física y psíquica) y adinamia (ausencia de movimiento o reacción).
Diseminada	Desgaste, diaforesis, fiebre, neumonía, disnea (dificultad respiratoria), tos con expectoración, derrame pleural, astenia, adinamia, crisis convulsivas y neutropenia (disminución aguda o crónica de granulocitos de la sangre).
Renal	Pielonefritis crónica (inflamación bacteriana del riñón con destrucción del tejido renal y compromiso de la vía urinaria), pérdida de peso e infecciones de vías urinarias de repetición
Ganglionar	Adenomegalias (aumento de tamaño de los ganglios linfáticos).

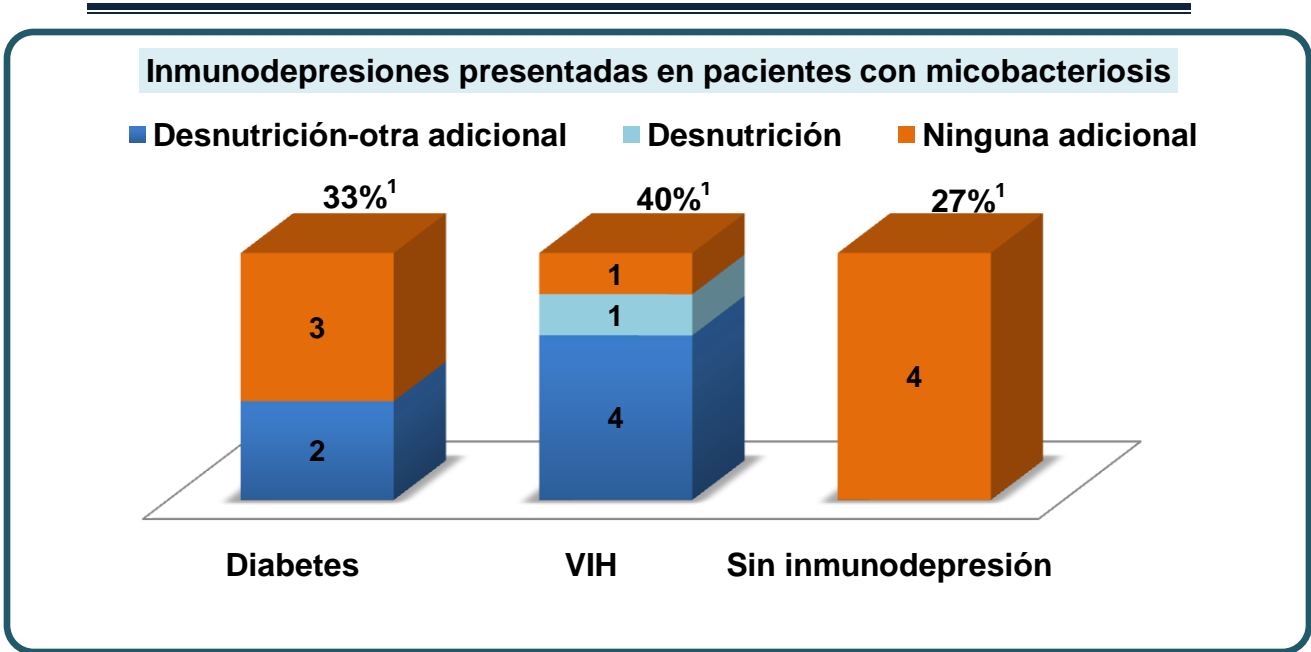


Figura 15. Inmunodepresiones presentadas en pacientes con micobacteriosis

1. Estos porcentajes corresponden al número global de inmunosupresiones. Por ejemplo: de los 15 pacientes 5 padece diabetes, los cuales representan el 33%. Las cantidades que hay dentro de cada columna, representa el número de pacientes que poseen la condición indicada.

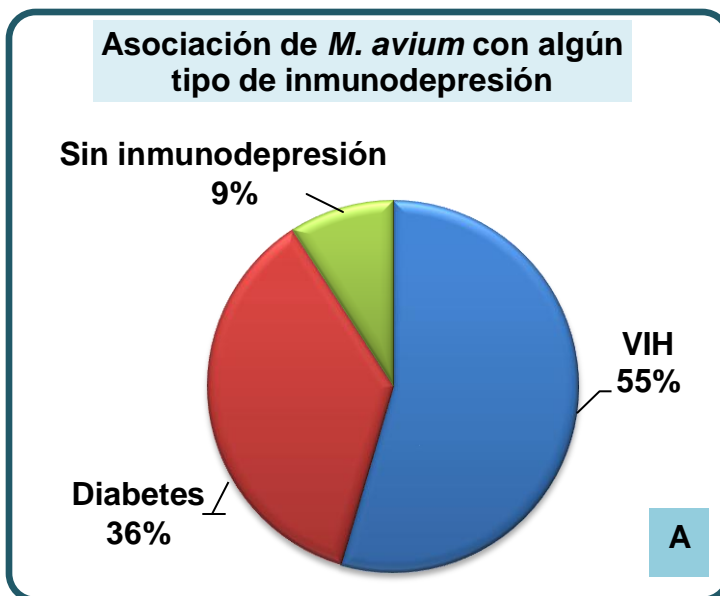
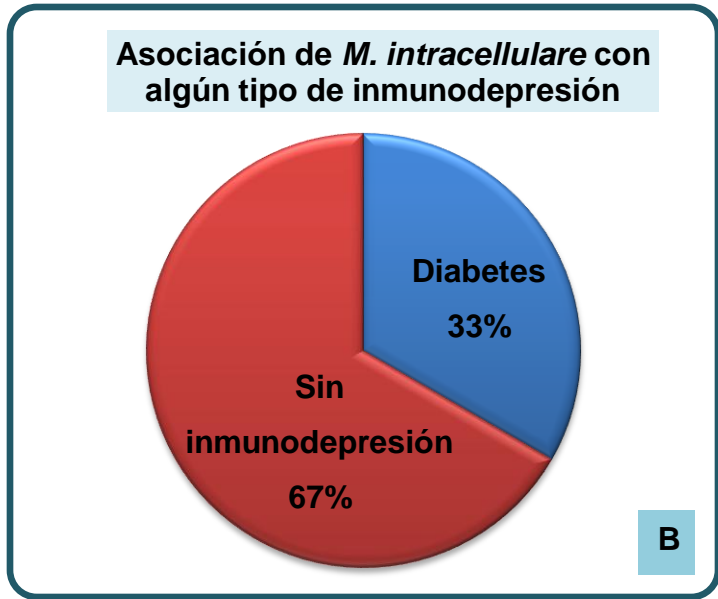


Figura 16. Asociación de MNT con algún tipo de inmunodepresión en el paciente.

A) Asociación de *M. avium* con alguna inmunodepresión



B) Asociación de *M. intracellulare* con alguna inmunodepresión

En el hospital “Gral. Ignacio Zaragoza” ISSSTE, se administra el esquema de tratamiento primario acortado para aquellos pacientes en los que la **baciloscopia se reporte como positiva**, el cual se administra durante 25 semanas si el paciente se apega a él, hasta completar 105 dosis, dividido en dos etapas: fase intensiva (DoTBal fase intensiva), 60 dosis (diario de lunes a sábado con HRZE) y fase de sostén (DoTBal-S fase de sostén), 45 dosis (intermitente, 3 veces a la semana, con HR).

A todos los pacientes a los que se les identificó una MNT se les administro el tratamiento primario acortado (DoTBal), excepto a uno, del cual no se tiene información en cuanto a su tratamiento y la evolución final que tuvo hacia la micobacteriosis. De los 15 casos: 5 (33%) corresponden a pacientes que respondieron al tratamiento (curación), en los cuales: 3 la micobacteria identificada fue *M. avium*, en un caso fue *M. intracellulare* y en otro más *M. gordonae*; 7 pacientes (47%) fallecieron, tomándose este parámetro como falla terapéutica, en 6 de los casos la micobacteria aislada fue *M. avium* y en un caso fue *M. intracellulare*; una paciente (7%) a la cual se le identificó *M. intracellulare* curso asintomática por lo que no fue necesario administrarle

algún tipo de fármaco y en 2 casos (13%) en donde se aisló *M. avium* no fue posible obtener información acerca de la curación o falla al tratamiento de los pacientes (Figura 17A y 17B).

Todos los pacientes (6) que tuvieron falla al tratamiento y se les identificó *M. avium* padecían VIH, el paciente al cual se le aisló *M. intracellulare* y falleció era además diabético; todos excepto un individuo padecían desnutrición y/o alguna otra inmunodepresión. Sobre la administración de antirretrovirales (ARV), de los 6 pacientes que padecen VIH, a 5 también se les administraba tratamiento ARV. En cuanto a los 5 casos en los que hubo una respuesta favorable al tratamiento, todos los pacientes recibieron éste de 6 a 12 meses, además ninguno de ellos padecía VIH o diabetes. Es importante mencionar que en 3 de los casos en los que se identificó una MNT, los pacientes refirieron haber sido diagnosticados anteriormente como enfermos de tuberculosis (recaída); dos de estos individuos eran portadores de VIH y diabetes respectivamente, ambos fallecieron; el restante resultó con una micobacteriosis de localización renal la cual fue aliviada al cabo de un año.

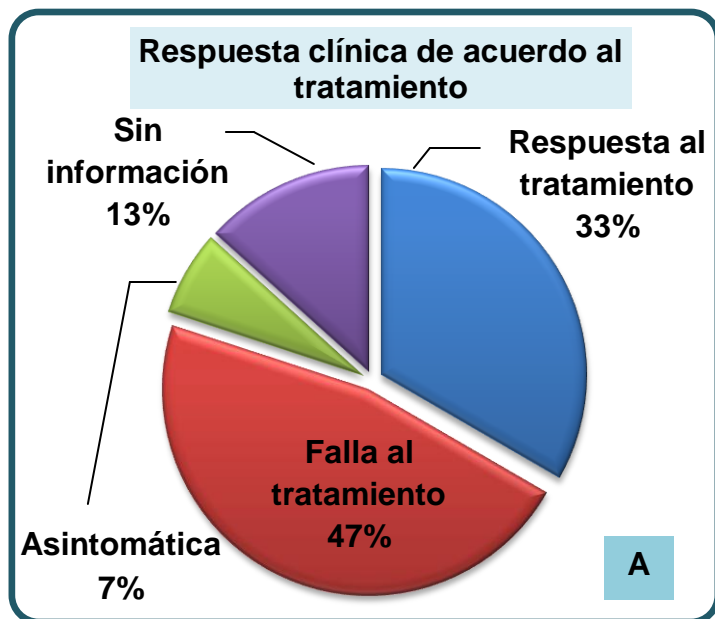
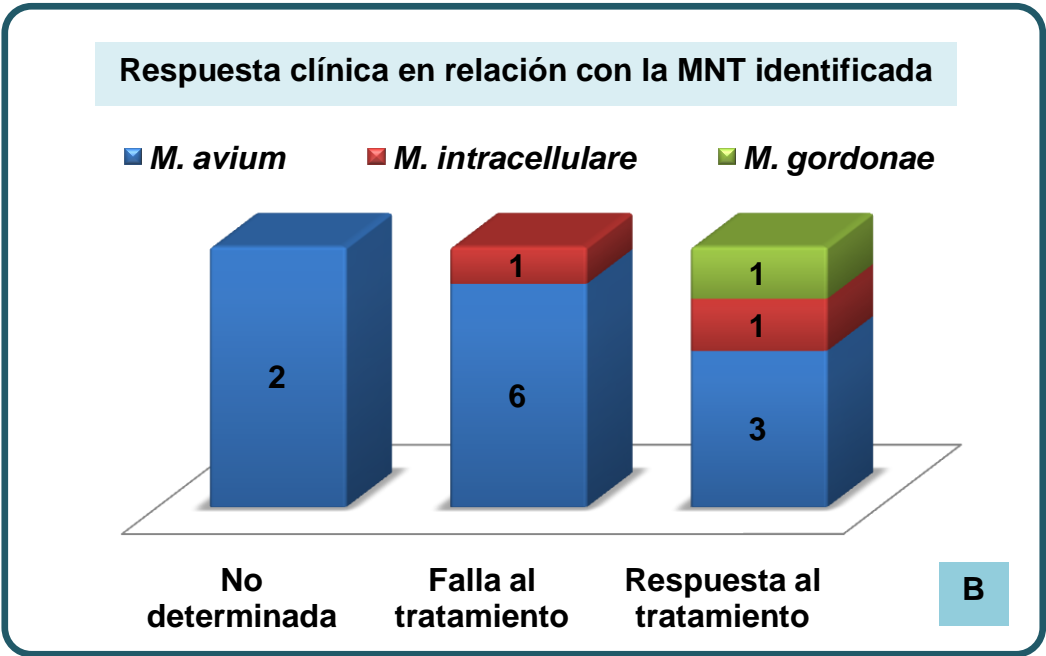


Figura 17. Respuesta clínica de acuerdo al tratamiento administrado.

A) Respuesta terapéutica al tratamiento primario acortado (DoTbal)



B) Respuesta clínica en relación con la MNT aislada. No se incluye el paciente asintomático al cual se le identificó *M. intracellulare* por no representar un dato significativo en el tratamiento administrado para micobacteriosis.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

➤ Identificación de MNT por técnicas Biología Molecular

Las MNT se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente y se puede hallar en el agua y sus sistemas de conducción y abastecimiento, muy frecuentemente en los grifos y el agua caliente, el agua del mar, la tierra, los animales domésticos y salvajes, la leche y otros alimentos. Como no se ha podido demostrar que las MNT se transmitan de persona a persona y se aíslan en muestras de piel, aparato respiratorio o tubo digestivo de individuos sanos, se supone que la colonización o infección por estos microorganismos tiene un origen ambiental. Los primeros cuadros clínicos producidos por MNT se describieron en los años cincuenta, y durante muchos años fueron considerados ocasionales y casi siempre ligados a situaciones de inmunodeficiencia. En los últimos 20 años han pasado a ser una afección relativamente frecuente, concomitante o no a la infección por el VIH aunque, al no ser enfermedades de declaración obligatoria, la incidencia de las micobacteriosis sólo se conoce parcialmente por publicaciones de ámbito local. En los últimos años se ha avanzado en las posibilidades del diagnóstico microbiológico al disponer de métodos moleculares.

En este proyecto se llevaron a cabo dos técnicas de Biología Molecular para la identificación de MNT: PCR de punto final y PRA.

El método de PCR de punto final para la identificación de MNT, resultó ser la parte final de un esquema de diagnóstico para tuberculosis y micobacteriosis, el cual por una secuencia de 4 pasos (Figura 18), es capaz de identificar al género *Mycobacterium*, al CMT y 7 especies de micobacterias de importancia clínica (*M. bovis*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. avium* y *M. intracellulare*):

-
- **Paso 1.** A través de un PCR Multiplex se establece en primera instancia si un lisado bacteriano pertenece al género *Mycobacterium*. Además nos indica si la especie micobacteriana pertenece al CMT; exceptuando a *M. bovis*. Adicionalmente en este primer paso, se logra identificar a nivel de especie a *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.
 - **Paso 2.** Si se obtuviera en el “paso 1” un patrón que únicamente indicara que el lisado pertenece al género *Mycobacterium* (934 pb), se llevará a cabo un PCR que dará dos posibles resultados: confirmará si la micobacteria es del CMT (incluyendo a *M. bovis*) o se tratara de una MNT diferente de *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. avium* y *M. intracellulare*.
 - **Paso 3.** Si el aislado en el “paso 1” diera como resultado una banda de 1000pb y en el paso 2 se confirmara la presencia de una MNT, esta micobacteria podrá ser caracterizada como *M. avium* (PCR I) o *M. intracellulare* (PCR II).
 - **Paso 4.** Y finalmente, se podrá recurrir al PCR III, para identificar al lisado como *M. gordonae*

Se caracterizaron 22 MNT bajo el esquema de identificación de la Figura 17, obteniéndose 17 cepas pertenecientes a la especie *M. avium*, 3 a la especie micobacteriana *M. intracellulare* y una fue identificada como *M. gordonae*. El lisado restante (muestra 5-GGA) se mandó a secuenciar; el resultado caracterizó a la micobacteria como: *M. avium* 104, el que no haya sido posible identificar este lisado a través del PCR de punto final con el par de primers Mycav-R y RAC-1, se debió posiblemente a que esta cepa tiene en su región V2 una posible variación en la secuencia que no comparte con las micobacterias de su especie.

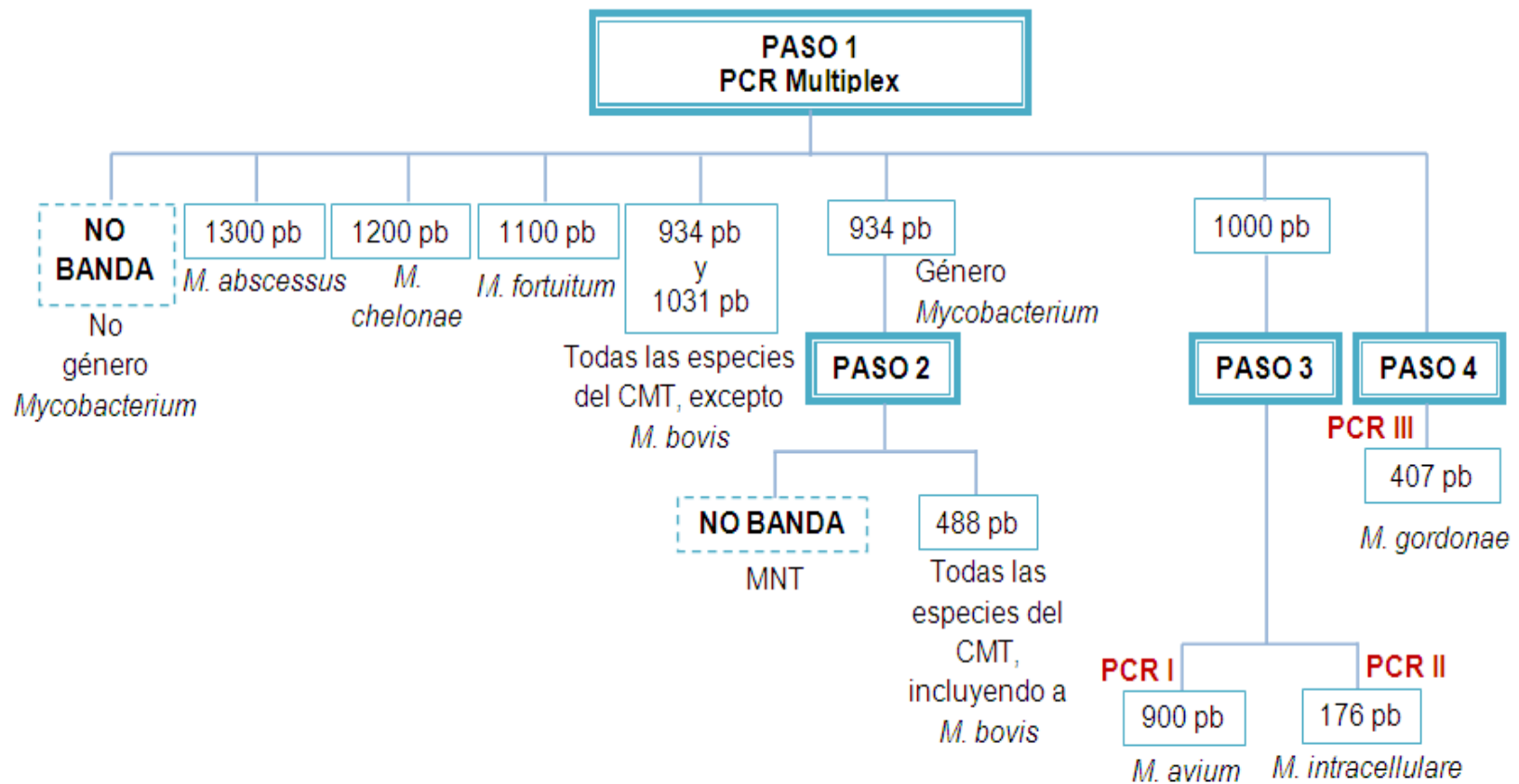


Figura 18. Esquema de identificación de 4 pasos para género *Mycobacterium*, CMT y 7 especies de micobacterias: *M. bovis*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. avium* y *M. intracellulare*.

Los resultados de cada una de las identificaciones de los lisados, se reportaron en un promedio de 17 días partiendo de que al día 14 se presentó crecimiento micobacteriano puro, siendo este método molecular capaz de identificar en tres días a 7 especies micobacterianas de importancia clínica, comparado con al menos 21 días en que las pruebas fenotípicas identifican a la micobacteria ya que se requiere de un cierto número de bacterias viables para producir un resultado detectable, particularmente en especies de crecimiento lento.

Las pruebas fenotípicas son extensivamente utilizadas, pero presentan importantes limitaciones que contribuyen al problema de identificación y de manejo clínico de las micobacteriosis; son poco reproducibles, ya que la expresión de un fenotipo determinado depende de condiciones ambientales y por lo tanto presenta una marcada variabilidad. Así, la metodología puede presentar diferentes resultados al modificarse factores tales como la preparación de los medios y reactivos, la cantidad y tiempo de crecimiento de la cepa a identificar, e incluso el observador, ya que se requiere de cierto grado de subjetividad. Además las bases de datos de las características fenotípicas se encuentran limitadas a las especies más comunes y no son actualizadas con frecuencia, por lo que las especies recientemente descritas no pueden ser identificadas por estos métodos. Finalmente y no menos importante, la aplicación de estas técnicas involucra un alto riesgo de bioseguridad para el personal, pues se trabaja en todo momento con bacterias vivas. Las pruebas moleculares, basadas en la detección de características genotípicas, surgen como respuesta a muchas de estas limitaciones, y se ha reportado que las mismas permiten una identificación más rápida, confiable y sensible de las micobacterias no tuberculosas.

Las limitaciones observadas en esta técnica de diagnóstico para micobacteriosis son las siguientes:

-
- El número de micobacterias que puede identificar. Por citar un ejemplo, el esquema no contiene la identificación de *M. kansasii* la cual ha sido caracterizada frecuentemente como agente causal de enfermedad pulmonar en pacientes masculinos y que presentan enfisema. De igual forma, *M. scrofulaceum* es reconocida como la primera especie aislada como agente causal de linfadenitis cervical. No obstante, este esquema permite añadir iniciadores específicos en cualquiera de los pasos e incluso englobar PCR's para diseñar un PCR multiplex, como lo es el caso del PCR I y II, que identifican a *M. avium* y *M. intracellulare*.
 - Se necesita de un cultivo puro para obtener resultados certeros. En algunas ocasiones se intentó trabajar directamente muestras clínicas en las que se sospechaba la existencia de una micobacteria, sin embargo, esta técnica no arrojó alguna identificación sino hasta que se trabajo un cultivo puro. No obstante, el usar OADC y PANTA contribuyeron a que en un lapso de 14 días se obtuvieran crecimientos adecuados y con escasos problemas de contaminación.

En la estandarización de la técnica del PRA, esta resultó ser una metodología rápida y sencilla de implementar en el laboratorio para la identificación de micobacterias, pues se lograron obtener patrones enzimáticos que al ser ingresados en los algoritmos de identificación del sitio electrónico "PRA SITE" identificaron a 5 micobacterias previamente caracterizadas por PCR de punto final.

En cuanto al producto inespecífico que recurrentemente aparece en el control negativo (blanco) del PCR que amplifica la proteína de choque térmico de 65 kDa, se puede decir que se eliminó la posibilidad de que se tratase de alguna contaminación de los reactivos ya que estos fueron utilizados en otros PCR's en los cuales no se presentó ninguna situación

similar; también se contempló la idea de que el par de iniciadores TB11 y TB12 estuvieran amplificando el fragmento de 439 pb aunque no necesariamente se tratara de una micobacteria, sin embargo, esta posibilidad fue descartada pues se sometió una cepa de *Staphylococcus aureus* a este PCR el cual no mostró ningún producto de amplificación.

La patrón enzimático de la muestra 7-OMJ, dio como resultado *M. avium* s. *avium* tipo 2 y *M. colombiense* tipo 1, ambas identificaciones con un puntaje de cero (el cual equivale a una concordancia idéntica a un patrón registrado en el algoritmo de identificación). Este resultado, que en principio pareciera considerar la clínica del paciente para reportar una sola identificación de la cepa, no pudo ser posible ya que el paciente presentó una micobacteriosis diseminada adicional a una inmunodeficiencia causada por el VIH, en la que tanto *M. avium* como *M. colombiense* pueden ser causantes de dicha patología. Indagando en la literatura, sobre el por qué ambas especies micobacterianas presentaban patrones idénticos en los algoritmos de identificación se encontró que Murcia y colaboradores en su artículo **“*Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant”**²⁶ proponen a *M. colombiense* como una especie estrechamente relacionada al MAC, ya que los autores describen a *M. colombiense* como una micobacteria de lento crecimiento y no pigmentada, el análisis de ácidos micólicos reveló el patrón típico de tres clusters de especies pertenecientes al MAC, dio resultados positivos en la prueba de identificación del AccuProbe MAC (*Gen-Probe*, San Diego, CA), con resultados negativos con la prueba de la especie *M. intracellulare*, algunas de las cepas estudiadas tuvieron resultados positivos en la prueba de la especie *M. avium*-específica, el gen de la enzima de restricción *hsp65* fue idéntico a la de la variante de *M. avium* y la secuenciación del espacio interno transcrito (ITS1) en el 16S-23S mostró una secuencia única, llamada el MAC-X. No obstante, previamente se contaba con la identificación por

PCR en punto final en la que se usan iniciadores que demuestran ser específicos para identificar a nivel especie a *M. avium* y *M. intracellulare*²⁹, con una caracterización de la cepa como *M. avium*, por tanto se decide reportarla como tal. Finalmente, sería interesante secuenciar la región ITS1 con el fin de corroborar el resultado y además añadir especificidad a los iniciadores RAC-1 y Mycav-R.

Las muestras 14-TCM y *M. tuberculosis* H37Rv, fueron identificadas por ambos métodos como *M. gordonae* y *M. tuberculosis* respectivamente. En lo que respecta a la identificación de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, es importante resaltar que el PRA no identifica a nivel especie las micobacterias pertenecientes al CMT, situación de vital importancia si el lisado se tratará de *M. bovis*, por tanto, es importante señalar que este caso ambas técnicas serán complementarias si se decidiera trabajar en primera instancia con el PRA.

En caso de la muestra 22-CSL, el patrón enzimático interpretado para la enzima *BstEII* fue 235/120/100 pb y para *HaeIII* 140/125/60 pb obteniéndose un puntaje de 7 pues el patrón no fue exactamente encontrado en el algoritmo de identificación del PRA site, el patrón para *BstEII* fue el mismo, sin embargo, para *HaeIII* fue 145/130/60 pb. En lo que respecta a los dos posibles resultados de caracterización: *M. intracellulare* tipo 1 y *M. chimaera* tipo1, se encontró que hay una situación similar a la encontrada entre *M. colombiense* y *M. avium*; Tortoli y colaboradores en **“Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov.”**³⁸ señalan que *M. chimera* es una especie que combina características de los diferentes miembros del MAC (de ahí su nombre, ya que es llamado *quimera* al ser mitológico formado por piezas de tres diferentes animales), haciendo una distinción en la secuencia del 16S-23S de la región del espacio interno transcrito (ITS) en la que esta especie genéticamente corresponde a la

secuencia MAC-A y se diferencia de la cepa tipo de *M. intracellulare* en su secuencia Min-A (DSMZ 43223) por 20 nucleótidos, sin embargo, la secuenciación del 16S resultará de poca ayuda pues esta es idéntica a *M. intracellulare* a excepción de la falta de coincidencia en un nucleótido. Por tanto, estas herramientas se “limitan” a establecer una clasificación general de *M. avium* y *M. intracellulare* y/o el MAC. El resultado fue reportado como *M. intracellulare* ya que el paciente clínicamente presentó una micobacteriosis pulmonar adicional a dos inmunosupresiones (diabetes y desnutrición) lo cual concuerda con que *M. intracellulare* es un contribuyente importante a las infecciones pulmonares asociada en pacientes inmunocompetentes³⁹, el comportamiento clínico de *M. chimaera* aún no ha sido del todo establecido. El resultado final de la caracterización de la micobacteria concuerda con el dado por el PCR de punto final, en el que la literatura y la clínica ayudaron a dicho fin.

Una situación similar a la cepa 7-OMG sucedió con la 5-GGA, al obtener los mismos resultados de identificación: *M. avium* s. *avium* tipo 2 y *M. colombiense* tipo 1. Sin embargo, en este caso fue necesario secuenciar por no obtener un resultado con el PCR de punto final (ya discutido previamente). Es así que con el alineamiento significativo que se obtuvo (porcentaje de identidad del 97% debido al score alto y el valor E de 0.0) se decide reportar la cepa como *M. avium*. La técnica del PRA muestra que realizada adecuadamente puede identificar a nivel especie a una MNT, y que aún cuando el PCR de punto final no proporcione resultados, existe una segunda opción para realizar la identificación de la especie micobacteriana antes de considerar la opción de mandar a secuenciar el lisado bacteriano.

En relación al PRA, la principal dificultad que se encontró tuvo que ver con la determinación del tamaño de las bandas presentes en los patrones de restricción, ya que como no se contó con un software de análisis de imágenes, la misma se realizó de forma manual. En uno casos el tamaño de

las bandas no coincidió con los patrones publicados, no obstante, la diferencia fue de +5 pb (rango permitido en la interpretación de patrones). Esta situación puede ser solucionada con la estandarización de las condiciones de electroforesis (concentración del gel, tipo de agarosa utilizada y tiempos de corrida) y la utilización de software de medición de bandas para facilitar así la interpretación de los resultados. Además de esto, al igual que el PCR de punto final, el PRA también requiere de cultivos puros para obtener lisados que aseguren la amplificación del *hps65*.

En síntesis, el PRA constituye una valiosa herramienta diagnóstica que puede considerarse como una prueba de orientación y apoyo a la identificación en un laboratorio de micobacterias, además de ser relativamente fácil. De igual forma ofrece la ventaja de identificar a una MNT en dos días partiendo de un cultivo puro.

En definitiva, las técnicas de Biología Molecular instauradas en este proyecto resultaron adecuadas para identificar MNT; finalmente ambas técnicas fueron complementarias una de la otra y no porque hayan resultado ser deficientes, sino porque cada una aporta información relevante para un adecuado diagnóstico para el paciente, como lo fue el PRA al hacer mención de la necesidad de realizar una diferenciación precisa de aislados identificados como pertenecientes al MAC pues se trata de datos de relevancia clínica que señalan la importancia de tomar en cuenta la heterogeneidad de las MNT. De igual manera se tiene que tener en cuenta que ninguno de los métodos de diagnóstico desarrollados hasta el momento ha logrado reemplazar a los convencionales sino que los complementan, como lo es el caso del cultivo y la baciloscopia, por tanto, la innovación solo deberá ser inducida en laboratorios que hayan demostrado competencia para ejecutar los métodos bacteriológicos convencionales y experiencia para interpretar resultados. Pero además, siempre con la convicción de que deberán ser accesibles al sistema de salud, concentrar la investigación de los pacientes

cuya asistencia se pretende mejorar y tener asegurada la comunicación rápida con los médicos que tratan a esos pacientes. Bajo los anteriores puntos, se hace necesario definir un algoritmo para la aplicación e interpretación de resultados de cada método que se incorpore.

➤ Hallazgos epidemiológicos

Debido a la poca información que se tienen en México acerca de las MNT aisladas en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, es necesario construir una base de datos la cual recabe la información clínica de los pacientes a los cuales se les diagnosticó una micobacteriosis con la intención de que se identifiquen los factores de riesgo que más frecuentemente se asocian con dicha patología.

De un total de 60 cepas caracterizadas recolectadas de Junio/2007 a Julio/2009, 22 de fueron identificadas como MNT las cuales representan el 37% de los aislados y el 63% (38 cepas) fue identificado como micobacterias pertenecientes al CMT. Al presentar la información del total de cepas identificadas por paciente no se encontró un incremento significativo de los porcentajes para ambos grupos, pues se obtuvo que de un total de 44 pacientes, 17 de ellos (39%) se les identificó una MNT y al 61% (27 pacientes) una micobacteria perteneciente al CMT. Resultados similares a los hallados en este trabajo se reportaron en un estudio realizado en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza ya que se encontró que de 97 cepas identificadas el 63% (61 cepas) corresponden al CMT y el 37% (36 cepas) a MNT⁹. Sin embargo, en un estudio realizado en 2010 por Moore y colaboradores (*Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland*²⁵) reportan que la tasa de los informes de MNT se elevó de 0,9 por 100.000 habitantes en 1995 a 2,9 por 100.000 en 2006 (de 1608 informes).

La proporción de MNT identificadas fue alto, pues aún cuando no supera al porcentaje de identificaciones del CMT existe una prevalencia que según la OMS seguirá en aumento, pues existen factores que contribuirán a un aumento de las micobacteriosis en el mundo, como lo son:

- ❖ La pandemia de infección por el VIH
- ❖ El aumento de las poblaciones de alto riesgo: diabéticos, pacientes con cáncer, con deficientes hábitos higiénicos-dietéticos y aumento en el nivel de las adicciones
- ❖ La falta de un terapias combinadas para el tratamiento de micobacteriosis

De igual manera, el porcentaje correspondiente a las identificaciones de las cepas de MNT (37%) es relevante ya que este dato representa a pacientes con y sin algún tipo de inmunodepresión, información sobre la cual no se abunda en la literatura por considerar que las micobacteriosis están directamente ligadas a situaciones de deficiencia inmune. Respecto a este último punto, López-Alvarez y colaboradores en el estudio “***First insights into the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance***²¹” hallaron que de un total de 67 muestras de pacientes infectados con VIH, al 85% (57 pacientes) se les fue identificada una micobacteria perteneciente al CMT y solo al 15% (10 pacientes) se les caracterizó una MNT, siendo *M. avium* aislada en 9 de los 10 casos y *M. intracellulare* en el restante; en este proyecto si consideráramos únicamente a los pacientes infectados con VIH, que son 11 de un total de 44, encontramos que el 54.5% de los casos corresponde a una MNT específicamente *M. avium* y que en el 45.5% se identificó a *M. tuberculosis*, con esto corroboramos el evidente aumento de micobacteriosis en México, además de notar que existe una prevalencia de *M. avium* en pacientes infectados con VIH. Asimismo, se deberá continuar retro-alimentando la base

de datos creada para contar con un número mayor de muestras clínicas y así descartar la posibilidad de que el número de caracterizaciones no haya sido significativo.

En cuanto a la prevalencia de la localización de las MNT, se observa una clara tendencia a una localización extrapulmonar con 19 de las 22 muestras clínicas remitidas al laboratorio, de las cuales 16 fueron *M. avium*. La importancia de este resultado radica en que 12 de las cepas provocaron micobacteriosis diseminadas y todas excepto una provenían de pacientes enfermos de SIDA (aunque este último paciente presentaba desnutrición, diabetes y leucemia) además que todas las cepas fueron caracterizadas como *M. avium*. Lo anterior viene a corroborar que pacientes infectados por el VIH se encuentran en un alto riesgo de padecer diseminaciones por MNT. Según la ATS, la mayoría de las enfermedades en pacientes con SIDA (>95%) se debe a *M. avium*, además de que la infección diseminada por esta micobacteria es la enfermedad más común, ocurriendo en 20 a 40% de los pacientes según Hawkins y colaboradores en el estudio titulado "***Mycobacterium avium-complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome***"¹⁸. La micobacteriosis en estos pacientes está altamente correlacionada con la inmunodepresión severa que presentan. En tanto, a la localización pulmonar, las 3 muestras clínicas fueron caracterizadas como micobacterias pertenecientes al MAC (2 como *M. avium* y una como *M. intracellulare*) adicionalmente todos los pacientes presentaron diabetes, lo que sugiere que la esta condición de inmunodepresión favoreció la adquisición de la micobacteriosis; de acuerdo con la ATS en Estados Unidos la enfermedad pulmonar crónica es la más frecuente manifestación clínica localizada de las MNT, siendo el MAC seguido por *M. kansasii* el patógeno que más frecuente causa enfermedad pulmonar, además se hace mención que se han encontrado asociaciones con el tabaquismo y la existencia de una alguna patología pulmonar subyacente, siendo el caso del paciente al que se le identificó *M.*

intracellulare de localización pulmonar ya que desarrolló cáncer broncogénico previo al diagnóstico de micobacteriosis.

La tendencia de afectación de MNT en sexo masculino puede ser explicada en base a que todos los pacientes hombres (10 individuos) también se les fue diagnosticado algún tipo de inmunodepresión (diabetes o SIDA), 6 de los 10 pacientes padecieron SIDA. En tanto, que el sexo femenino presentó 3 afectaciones de micobacteriosis renal (provocadas por *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*) de un total de 5 mujeres; las micobacteriosis renales no han sido documentadas por considerar que en las muestras clínicas (orinas) sólo se trate de la presencia de una micobacteria ambiental colonizante, no obstante, la caracterización de las MNT fue apoyado con la clínica, pues en todos los casos se reportó en las historias clínica el común denominador de “infección de vías urinarias de repetición”.

El hallazgo clínico de identificar que el 40% de los pacientes refirió no haber recibido la vacuna BCG, obligó al presente trabajo a investigar la existencia de alguna relación con la virulencia de las MNT, sin embargo, Sallaleras en su manual “**Vacunaciones preventivas: principios y aplicaciones**”³³ indica que existen factores que pueden influir en el resultado de la vacunación como lo son la virulencia del bacilo, el estado inmunitario y nutritivo del receptor de la vacuna y la patogenia de la propia enfermedad, abriendo con esto la investigación del genoma de las micobacterias para explicar dichos comportamientos. El contacto previo con individuos diagnosticados con tuberculosis (parámetro denominado COMBE) en el 20% de los pacientes, no se asocia con ningún aspecto clínico relevante (inmunodepresión, síntomas, etc.), además de que el contagio de las MNT por aerosoles no ha sido comprobado.

Al comparar el tipo de inmunodeficiencia y la especie micobacteriana encontrada, se observó que los pacientes que padecieron SIDA fueron en su

totalidad infectados por *M. avium*. No obstante cabe señalar que 5 de los 6 individuos diagnosticados con SIDA, ya padecían enfermedades tales como histoplasmosis, criptococosis y linfoma de Hodgkin haciendo más delicada su situación de inmunodeficiencia, respecto a esto es posible que estos pacientes hayan desarrollado la micobacteriosis antes que estas patologías, sin embargo, debido a que estos pacientes suelen tener otras complicaciones, el diagnóstico de la infección por MNT pueden ser confundido o retrasado. La sintomatología que presentaron los pacientes fue la siguiente: desgaste, diaforesis, fiebre, neumonía, disnea, astenia y adinamia, hallazgos físicos relacionados con una avanzada enfermedad por el VIH. La inmunodepresión causada por el VIH es capaz de aumentar la incidencia de micobacteriosis por dos mecanismos clásicos³:

1. Reactivaciones endógenas, a partir de focos durmientes derivados de infecciones remotas que al perder gran parte de su memoria inmunitaria, progresan a enfermedad.
2. Progresión de infecciones recientes, con el desarrollo de micobacteriosis más agudas y más atípicas, con frecuentes diseminaciones hematógenas.

En conclusión, la enfermedad diseminada por el MAC constituye una de las complicaciones frecuentes en enfermos con SIDA, sobre todo en pacientes con enfermedad avanzada (menos de 50 linfocitos CD4/ μ L). Se han registrado, sin embargo, diferencias notables en su incidencia de unos países a otros, constituyendo una complicación relativamente rara en algunas áreas. La presentación habitual es de enfermedad diseminada con afectación de múltiples órganos.

De acuerdo con la revisión “**Frecuencia de infecciones en diabetes mellitus tipo 2**”²², se intuye que la inmunidad está alterada en los pacientes

con diabetes debido a la disminución del poder fagocitario de los leucocitos ya que podría estar directamente relacionado con el grado de hiperglucemia, sobre todo si existe desnutrición, trastornos de la hidratación o del pH sanguíneo, así mismo, el quimiotactismo y el poder bactericida de los linfocitos también están muy disminuidos. De este modo, encontramos que en el 38% de los pacientes que se les identificó *M. avium* padecen diabetes, encontrando sólo en un paciente un grado de desnutrición severo; en lo que respecta a la identificación de *M. intracellulare* el 33% de los pacientes padecen diabetes más un grado de desnutrición.

En cuanto a *M. gordonae*, esta especie se aísla muy frecuentemente del agua y se reporta que en raras ocasiones causa enfermedad diseminada en el hombre¹⁵; en este estudio esta especie afectó sólo a un paciente el cual no presentó ninguna inmunodepresión adicional. Jarikre en su publicación "***Mycobacterium gordonae genitourinary disease***"¹⁹ indica que *M. gordonae* es aislada en orina sin embargo es una micobacteriosis poco frecuente, reporta un caso parecido al cuadro clínico que presenta el paciente al cual se le aisló *M. gordonae* (14-TMC), en el que ambos pacientes presentaban infecciones de vías urinarias de repetición; un dato importante, en el que respecta a la posible adquisición de la micobacteria se refiere a la ocupación del paciente pues este indicó ser Médico, ya que esta micobacteria es un microorganismo ubicuo en el ambiente, habitualmente presente en la tierra y el agua, así como en el medio hospitalario, donde se han documentado aislamientos en el agua del grifo, máquinas de hielo y broncoscopios.

Del total de los pacientes fue encontrado que el 27% no presentaba algún tipo de inmunodepresión, identificando a *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*. No obstante, es importante mencionar que la localización fue renal en todos los casos, lo cual indica que hay una posible tendencia de

afectación del MAC y *M. gordonae* en pacientes inmunocompetentes a nivel renal.

Respecto a la respuesta clínica en el que a todos los pacientes les fue administrado el tratamiento primario acertado, se encontró que:

- ❖ En el 33% de los pacientes con respuesta al tratamiento (curación), 3 de los 5 casos fueron micobacteriosis de localización renal, en los cuales se identificó *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*; un paciente curso asintomático por lo que no recibió tratamiento y en el caso restante se aisló a *M. avium* de localización pulmonar, en estos dos últimos individuos adicionalmente se tenía diabetes. En ninguno de los casos, los pacientes padecieron SIDA. En todos los casos, se registró el mayor tiempo de duración del tratamiento (de 6 meses a un año) respecto a todas las historias clínicas recabadas.

- ❖ La falla al tratamiento (defunción) se presentó en el 47% de los pacientes; siendo *M. avium* la especie aislada en 6 de los 7 casos, en donde además todos los pacientes padecieron SIDA y alguna otra inmunodepresión adicional. En el caso restante, se trató de *M. intracellulare* en un adulto mayor que además padeció cáncer broncogénico. En todos los tratamientos, la duración no fue máxima de 4 meses en el mejor de los casos, pues en 3 casos no se tiene reporte de haber iniciado tratamiento para la micobacteriosis.

Por tanto, el fracaso terapéutico se atribuye a la presencia de enfermedades que afectan la condición inmune de los pacientes; específicamente en este estudio el VIH resultó ser una condición letal. Cabe señalar que en ninguna historia clínica se reportó el haber administrado un tratamiento específico para la micobacteria aislada y por su puesto también reconocer que en algunos casos la identificación de la micobacteria no fue lo suficientemente

rápida. No obstante, se deben de buscar alternativas en el tratamiento de pacientes con VIH con un recuento de CD4 inferior a 50 células/ μ L pues están en riesgo elevado de presentar infección diseminada por *M. avium*, por tanto, es conveniente comunicar a los médicos que el paciente puede ser beneficiado con una profilaxis; según la ATS la profilaxis se puede realizar con tres fármacos, rifabutina (la cual induce el metabolismo de las antiproteasas), claritromicina y azitromicina.

En cuanto a los pacientes que respondieron al tratamiento con la curación, esto se puede atribuir a que las MNT, dado su característica de ser oportunistas pueden remitir espontáneamente si no hay inmunocompromiso.

Finalmente, en un estudio anterior a este realizado en el Hospital Regional “Gral. Ignacio Zaragoza” ISSSTE por denominado **“Determinación por métodos de Biología Molecular de la especie de las micobacterias obtenidas por cultivo de especímenes clínicos en el laboratorio central del Hospital Regional Gral. Ignacio Zaragoza³⁴”** se realizaron 23 identificaciones reportándose el 65.2% como *M. tuberculosis* y al 34.8% como MNT (4.3% como *M. intracellulare*, 26.2% fue *M. avium* y el 4.3% restante como *M. kansasii*); Santos-Montero indica que inicialmente todos los pacientes a los cuales se les aisló una MNT recibieron el tratamiento primario acortado (específico para *M. tuberculosis*) y hasta después de la identificación se cambió a una terapia farmacológica específica (Claritromicina y Rifabutina o Rifampicina) para la micobacteria identificada, resultando en un 37.5% de casos con respuesta al tratamiento siendo relevante que todos los pacientes tenían VIH.

7. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 22 cepas de micobacterias no tuberculosas a nivel especie por dos técnicas de Biología Molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final y por Análisis de Patrón de enzima de Restricción por PCR (PRA).
2. A través de un esquema de identificación por PCR de punto final con iniciadores específicos, se obtuvo que de las 22 cepas caracterizadas a nivel especie, 18 (82%) fueron identificadas como *M. avium*, 3 (14%) como *M. intracellulare* y una (4%) como *M. goodnae*.
3. Se estandarizó la técnica del PRA, caracterizando al 5% de las 22 cepas ya identificadas por PCR de punto final, obteniendo resultados concordantes en todos los casos.
4. Se creó una base de datos en la cual es posible reconocer los factores de riesgo que se asocian más frecuentemente a la presencia de MNT en pacientes inmunocomprometidos.
5. Se encontró una alta proporción de MNT identificadas, respecto a micobacterias del CMT, lo que correlaciona con los hallazgos de otros estudios. De un total de 44 pacientes afectados por el género *Mycobacterium*, en el 39% se caracterizó a MNT y en el 61% a una micobacteria perteneciente al CMT.
6. Se observó una prevalencia de MNT con localización extrapulmonar.
7. En cuanto a pacientes inmunocomprometidos con VIH (40%), *M. avium* fue aislada en todos los casos y desafortunadamente, el total

no respondió al tratamiento. En pacientes inmunocomprometidos por diabetes tipo 2 (33%), se identificó a *M. avium* y *M. intracellulare* como causantes de la micobacteriosis y hubo respuesta al tratamiento en aquellos que no presentaron alguna inmunodeficiencia adicional. En pacientes inmunocompetentes (27%), se aislaron 3 tipos de micobacterias: *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*, en todos los casos la localización fue renal y ocurrió una respuesta favorable al tratamiento.

8. Se reconoció la importancia de identificar a las micobacterias a nivel de especie para dar un tratamiento adecuado al paciente y/o ajustando oportunamente la terapia, ya que los tratamientos son diferentes (Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, y Etambutol para el CMT; Claritromicina o Azitromicina, Rifabutina o Rifampicina y Etambutol para el MAC), además de considerar la alternativa de indicar profilaxis en pacientes con SIDA en estadios avanzados, logrando su curación y/o mejora, para que se reincorporen a sus actividades laborales, familiares y sociales en el menor tiempo posible. Esto evita el desgaste emocional del paciente y su familia, ya que permanecer en un hospital es inestimable económicamente; además, el Sector Salud se verá beneficiado al reducir el pago de incapacidades, estudios clínicos, hospitalización y medicamentos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. American Thoracic Society. **Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997. Volume 156, Number 2: S1-S25.
2. Anne D, Khye S G and Nalin R. **Rapid Identification of Mycobacteria to Species Level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 Gene and Proposition of an Algorithm To Differentiate 34 Mycobacterial Species.** *Journal of clinical Microbiology.* 1997. 35 (11): 2969–2973.
3. Caminero JA. **Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas.** Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. Francia, 2003. Pag 321-383.
4. Caminero-Luna JA. **Micobacterias atípicas.** *BSCP Can Ped.* 2001. 25: 337-347.
5. Casal MM y Casal M. **Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes.** *Enf Emerg.* 2000. 2(4): 220-230.
6. Christensen H, Garton JN, Horobín WR, Minnikin ED and Barer RM. **Lipid domains of mycobacteria studied with fluorescent molecular probes.** *Molec Microbiol.* 1999. 31: 1561-1572.
7. Cobos-Marín GL, Montes-Vargas J, Rivera-Gutiérrez S, Licea-Navarro A, González-y-Merchand JA and Estrada-García I. **A novel multiplex-PCR for the rapid identification of Mycobacterium bovis in clinical isolates of both veterinary and human origin.** *Epidemiol. Infect.* 2003. 130: 485–490.
8. Comarú AP, Fontoura R, Targa L, Riegel BR. **Retrospective Study of 668 cultures for Mycobacteria in a Reference Hospital for AIDS in Southern Brazil.** *Braz J Infect Dis.* 2003. 7: 126-128.
9. Cortés TN. **Análisis molecular de micobacterias aisladas de pacientes con diferentes inmunodeficiencias en un hospital de**

tercer nivel. (Tesis Maestría en Ciencias). México: Instituto Politécnico Nacional: 2009.

10. De Juan Ferré L. **Paratuberculosis Caprina: Aportaciones a su Diagnóstico, Epidemiología Molecular y Control** (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid: 2005.
11. Dumonceaux M, Fauville MD, Ooms J, De Wit L, Sonck P and Content J. ***Cloning of the antigen 85A from Mycobacterium gordonae and its use for the specific PCR identification of these mycobacteria.*** *Molecular and Cellular Probes.* 1997. 11:251-258.
12. Etienne G, Villeneuve C, Billman-Jacobe H, Astarie-Dequeker C, Dupont M and Daffé, M. ***The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of Mycobacterium smegmatis.*** *Microbiol.* 2002. 148, 3089-3100.
13. Fernández de Vega FA. **Nuevos métodos de identificación de micobacterias.**
<http://www.seimc.org/control/revisiones/micobacterias/Nmetbk.pdf> (12 de Marzo, 2011).
14. Fernández de Vega FA, Moreno JE, González JM y Palacios-Gutiérrez JJ. (2005) **Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.**
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.htm#1c> (12 Marzo, 2011).
15. Field SK and Cowie RL. ***Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria.*** *Chest.* 2006. 129: 1653-1672.
16. Garrity GM. ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Volumen 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria.*** Second edition. New York. 2001.
17. Garza-Velasco R, Monroy-Zamorate F y Perea-Mejía L. **Micobacterias no tuberculosas: actual importancia clínica y principales factores de virulencia.** *LABORAT-acta.* 2007. 19:67-76.

-
18. Hawkins CC, Gold JW, Whimbey E, Kiehn TE, Brannon P, Cammarata R, Brown AE, and Armstrong D. ***Mycobacterium avium-complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome.*** *Ann. Intern. Med.* 1996.105: 184-188.
 19. Jarikre LN. ***Mycobacterium gordonae genitourinary disease.*** *Genitourin Med.* 2002. 68:45-46.
 20. Jarzembowski JA and Young MB. ***Nontuberculous Mycobacterial Infections.*** *Arch Pathol Lab Med.* 2008. 132: 1333-1341.
 21. López-Alvarez R, Badillo-López C, Cerna-Cortes J, Castillo-Ramírez I, Rivera-Gutiérrez S, Helguera-Repetto AC, Aguilar D, Hernández-Pando R, Samper S and González-Merchand JA. ***First insights into the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance.*** *BMC Microbiology.* 2010.10:1-12.
 22. Martín MC, Valles UM. y Albarrán ME. ***Frecuencia de infecciones en diabetes mellitus tipo 2.*** *Revista de la SEMG.* 2003. 52: 197-199.
 23. Martínez PI. ***Desarrollo de un esquema de identificación de las principales micobacterias de importancia clínica y su prevalencia en una población mexicana.*** (Tesis Doctoral). México: CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional: 2008.
 24. Mondragón-Barreto M y Vazquez-Chacón CA. ***Comparison among three methods for mycobacteria identification.*** *Sal Púb Méx.* 2000. 42: 484-489.
 25. Moore EJ, Kruijshaar EM, Ormerod PL, Drobniewski Fand Abubakar I. ***Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland.*** *BMC Public Health.* 2010. 10: 612-618.
 26. Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E and Garcia MJ. ***Mycobacterium colombiense sp. nov., a novel member of the Mycobacterium avium complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant.*** *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006. 56: 2049-2054.

-
27. Organización Panamericana de la Salud. **Guía para el control de la tuberculosis en poblaciones privadas de libertad de América Latina y el Caribe** (2008). <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-prisiones-guia-ctl.pdf> (12 marzo, 2011).
28. Organización Panamericana de la Salud. **Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica 2008.** <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/tb-labs-cultivo.pdf> (09 marzo, 2011).
29. Pérez-Martínez I, Ponce-De-León A, Bobadilla M, Villegas-Sepúlveda N, Pérez-García M, Sifuentes-Osornio J, González-y-Merchand JA and Estrada-García A. ***A novel identification scheme for: genus Mycobacterium, M. tuberculosis Complex and seven mycobacteria species of human clinical impact.*** *Eur J Clin Microbiol Infec Dis.* 2008. 27(6): 451-459.
30. Piersimoni C and Scarparo C. ***Extrapulmonary Infections Associated with Nontuberculous Mycobacteria in Immunocompetent Persons.*** *Emerg Inf Dis.* 2009. 15: 1351-1358.
31. **PRA SITE: Identification of mycobacteria.** <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>. (30 Marzo, 2011).
32. Primm PT, Lucero CA and Falkinham JO. ***Health impacts of environmental mycobacteria.*** *Clin Microbiol Rev.* 2004. 171:98-106.
33. Salleras L. **Vacunaciones preventivas: principios y aplicaciones.** Segunda edición. México, 2008. Pag 1064-1068.
34. Santos MR. **Determinación por métodos de Biología Molecular de la especie de las micobacterias obtenidas por cultivo de especímenes clínicos en el laboratorio central del Hospital Regional “Gral. Ignacio Zaragoza”.** (Tesis para obtener la especialidad en Medicina Interna). México: ISSSTE-UNAM: 2003.

-
35. Secretaría de Salud. **Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.** Septiembre, 2005.
36. Soini H and Musser JM. ***Molecular Diagnosis of Mycobacteria.*** *Clin Chem.* 2001. 47: 809-813.
37. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC and Bodmer T. ***Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis.*** *Journal of Clinical Microbiology.* 1993. 31 (2): 175-178.
38. Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, Kroppenstedt RM, Lari N, Mattei R, Mariottini A, Mazzarelli G, Murcia MI, Nanetti A, Piccoli I and Scarparo C. ***Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the Mycobacterium avium complex, to species rank as Mycobacterium chimaera sp. nov.*** *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004. 54:1277-1285.
39. Turenne CY, Wallace R Jr and Behr MA. ***Mycobacterium avium in the postgenomic era.*** *Clin Microbiol Rev.* 2007. 20(2):205-229.

ANEXO

I. Abreviaturas

ARV	Tratamiento antirretroviral
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
BCG	Bacilo de Calmette y Güerin
C	Citosina
CD4	Linfocitos CD4, por sus siglas en inglés: <i>Cluster of differentiation</i>)
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
E	Etambutol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
G	Guanina
GLC	Cromatografía de gases, por sus siglas en inglés <i>Gas Liquid Chromatography</i>
H	Isoniacida
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución, por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>hsp</i>	Proteína de choque térmico
kDa	Kilodaltons
LJ	Lowenstein-Jensen
M7H9	Middlebrook 7H9
MAC	Complejo <i>M. avium-M. intracellulare</i>
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar

MNT	Micobacterias No Tuberculosas
MP	Marcador de peso molecular
OADC	Ácido oléico, albumina bovina, dextrosa y catalasa
°C	Grados Celsius
P	Pirazinamida
PANTA	Poliximina B, anfotericina, ácido nalidíxico, trimetropin y azlocilina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRA	Análisis de Restricción de productos de PCR, por sus siglas en inglés <i>Polymerase Chain Reaction Restriction Analysis</i>
R	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
TAE	Tris-acetato-EDTA
TLC	Cromatografía en capa fina, por sus siglas en inglés <i>Thin Layer Chromatography</i>
V	Volts
VIH	Virus de la inmunodeficiencia Humana
ZN	Ziehl-Neelsen
μL	Microlitros
μM	Micrometros

II. Tinción Kinyoun

❖ Reactivos:

- Carbolfucsina

Fucsina básica	4.0 g
Etanol al 95%	20 mL
Fenol (cristal)	8.0 g
Agua destilada	100 mL

Disolver la fucsina básica en el etanol (Solución 1). Disolver el fenol en el agua destilada (Solución 2). Mezclar las soluciones 1 y 2. Filtrar. Conservar a temperatura ambiente.

- Alcohol ácido

Ácido clorhídrico concentrado	30 mL
Etanol al 95%	970 mL

Mezclar ambos reactivos. Conservar a temperatura ambiente.

- Azul de metileno

Azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	100 mL

Mezclar ambos reactivos. Filtrar. Conservar a temperatura ambiente.

❖ Técnica:

Preparar una extensión de la muestra sobre un portaobjetos, dejar secar. Cubrir la preparación con carbolfucsina durante 5 minutos. Lavar con agua. Decolorar con alcohol ácido, cubriendo el frotis con esta solución durante 3

minutos. Lavar con agua. Teñir durante 3 minutos con Azul de metileno (color de contraste). Lavar con agua y secar.

III. Tratamiento con ácido sulfúrico para descontaminar cultivos de micobacterias

❖ Reactivos y medios:

- Ácido sulfúrico a una concentración del 4% y 15%
- Agua estéril
- Hidróxido de sodio al 4%
- Medio líquido M7H9
- Medio sólido LJ

❖ Técnica:

1. Tomar 1 mL del crecimiento bacteriano y colocarlo en un tubo cónico de 50 mL. En el caso de que la muestra sea de un medio sólido como lo es el medio LJ, agregar 1 mL de medio líquido M7H9 y raspar el crecimiento localizado en el pico de flauta)
2. Centrifugar a 3 500 rpm durante 15 minutos
3. Decantar y agregar 1mL de ácido sulfúrico. Si el sedimento es poco, usar el ácido a una concentración del 4%, en caso contrario, colocar ácido al 15%.
4. Incubar 15 minutos a 25°C
5. Llevar la solución del sedimento a la marca de 25 mL con agua estéril.
6. Centrifugar a 3 500 rpm durante 15 minutos
7. Decantar y llevar a pH=7 con hidróxido de sodio al 4%
8. Sembrar en LJ e incubar a 37°C
9. Realizar una preparación que posteriormente será sometida a la técnica de Kinyoun