



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE MEDIANTE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA DE MICOBACTERIAS AISLADAS DE
PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS E INMUNOCOMPETENTES
DE LA ZONA ORIENTE DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

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

**PRESENTA
ANA LILIA CRUCES MARTÍNEZ**



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: RODOLFO PASTELÍN PALACIOS
VOCAL: Profesor: MARÍA DEL PILAR GRANADA MACÍAS
SECRETARIO: Profesor: MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ÁLVAREZ
1er. SUPLENTE: Profesor: PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUÍZ
2° SUPLENTE: Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL REGIONAL "GENERAL IGNACIO ZARAGOZA" ISSSTE

ASESOR DEL TEMA: M en C. MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ALVAREZ

SUSTENTANTE: ANA LILIA CRUCES MARTÍNEZ

A Dios por esta vida y por dejarme aprender algo nuevo cada día.

A mi madre, por ser el motor y apoyo principal en mi vida. No hubiera llegado tan lejos sin tí. Todo lo que soy es gracias a tí y para tí.

A mi hermano, mi papá y mi "pima" Liz, por ser mi familia y acompañarme en este proceso.

A Ángel por haber sido el motor y apoyo secundario en toda mi carrera, definitivamente este camino no hubiera sido el mismo sin tí. "Ya estamos más allá del bien y del mal." ¡Gracias!

A Rocí por depositar su confianza en mí para este proyecto y por su infinita paciencia.

A la maestra Pilar y el Doctor Pastelín, por apoyarme incondicionalmente, no solo en mi trabajo sino también como persona.

A Alex, Fran y Beto, por ser grandes compañeros de trabajo pero aun más por ser excelentes amigos.

A la maestra Atziri por abrirme las puertas en el departamento de Biología.

A Vero, Mony, Elí, Mary, Mey, Gaby, Ross y todas mis amigas y amigos de la prepa, se los he dicho y repito son mis hermanos de vida.

A Hugo, Tona y todos los excelentes amigos que estuvieron conmigo en la carrera y que estoy segura me acompañaran el resto de mi vida.

A todos mis compañeros del departamento por aceptarme, ayudarme y por trabajar a mi lado.

A todas las personas del ISSSTE Zaragoza que me enseñaron y apoyaron durante este proyecto.

Y por último pero no menos importante a mi universidad, por darme excelentes maestros, valiosos conocimientos y por dejarme vivir grandes momentos en ella.

¡México, Pumas, Universidad!

ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico.....	DNA
Bacilos Ácido Alcohol Resistentes.....	BAAR
Center for Disease Control (Centro para el control de enfermedades).....	CDC
Complejo <i>Micobacterium tuberculosis</i>	CMT
Derivado Proteínico Purificado.....	PPD
High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).....	HPLC
Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los trabajadores del estado.....	ISSSTE
Insuficiencia Renal Crónica.....	IRC
Líquido cefalorraquídeo.....	LCR
Lowenstein Jensen.....	LJ
<i>Mycobacterium avium</i> complex (Complejo <i>Mycobacterium avium</i>).....	MAC
Micobacterias no tuberculosas.....	MNT
Organización Mundial de la Salud.....	OMS
Organización Panamericana para la Salud.....	OPS
Pares de bases.....	pb
Reacción en cadena de la polimerasa.....	PCR
Revoluciones por minuto.....	rpm

Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.....	SIDA
Secretaria de Salud.....	SSA
Tris Ácido Acético.....	TAE
Tuberculosis.....	TB
Tubo Indicador de Crecimiento de Micobacteria.....	MGIT
Ultra Violeta.....	UV
Virus de la inmunodeficiencia humana.....	VIH
Ziehl-Neelsen.....	ZN

Contenido

1.- INTRODUCCIÓN	4
2.- OBJETIVO GENERAL	6
2.1- Objetivos específicos	6
3.- ANTECEDENTES.....	7
3.1 Epidemiología.....	7
3.2 Etiología.....	8
3.3 Estudio en el laboratorio clínico.....	10
3.3.1 Tipo de muestra	10
3.3.2 Tinción	10
3.3.3 Baciloscopía	11
3.3.4 Cultivo.....	12
3.3.5 Pruebas bioquímicas.....	13
3.4 Transmisión y patogénesis.....	14
3.5 Impacto del VIH en la tuberculosis.....	18
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1 Material biológico	20
4.2 Cultivo de muestras.....	20
4.3 Extracción del DNA para la realización de la PCR	21
4.3.1 Cultivo líquido.....	21
4.3.2 Cultivo sólido	23
4.4 PCR para identificar micobacterias del CMT	25
4.5 PCR múltiple para identificar género <i>Mycobacterium</i> y diferenciar <i>M. bovis</i> de <i>M. tuberculosis</i>	28
5.- RESULTADOS.....	34
6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
7.- CONCLUSIONES	45
8. – BIBLIOGRAFÍA	48

1.- INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) sigue siendo, en el inicio de este nuevo milenio, la enfermedad infecciosa humana más importante que existe en el mundo, a pesar de los esfuerzos que se han invertido para su control en la última década. Las pésimas cifras actuales de infectados, enfermos y muertos por esta vieja endemia obligan a realizar una profunda reflexión de lo que realmente está fallando en el control de una enfermedad curable desde hace más de 40 años y prevenible en la comunidad desde hace ya varias décadas. Se calcula que en 2009 hubo 9,4 millones de casos incidentes de TB en todo el mundo, es decir más que los 9,27, 9,24, y 8,3 millones registrados en 2007, 2006 y 2000 respectivamente. Este mismo año la mayoría de esos casos se registraron en Asia (35%) y África (30%). De los 9,4 millones de casos incidentes registrados en 2009, se calcula que 13% eran VIH-positivos, de los cuales el 80% correspondió a la Región de África.¹

Adicionalmente en estos pacientes con inmunosupresión se han incrementado las coinfecciones con micobacterias no tuberculosas (MNT)² Las enfermedades causadas por las MNT son prácticamente indistinguibles de las causadas por los miembros del Complejo *M.tuberculosis* (CMT), desde el punto de vista clínico, radiológico y microbiológico; sin embargo el tratamiento es muy distinto dependiendo del grupo de micobacterias que estén infectando al huésped, por lo que es muy importante su identificación a nivel de especie.³

En el Hospital "General Ignacio Zaragoza" del ISSSTE se tiene una positividad de cultivos micobacterianos de alrededor de un 10% cada año (según la estadística interna del laboratorio clínico), lo que resulta un porcentaje importante considerando que estos provienen de pacientes, en su mayoría, en edad productiva. Adicionalmente a esto es, importante señalar que no se hace una diferenciación específica de estos por lo que todos los pacientes reciben el mismo tratamiento indicado para el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), sin embargo este tratamiento no es el adecuado para las micobacterias no

tuberculosas (MNT), lo que lleva al fracaso e incluso a la muerte del paciente cuando tiene una micobacteriosis causada por una bacteria no tuberculosa.

Para este trabajo se recolectaron 65 cepas provenientes de 45 pacientes, procedentes de muestras clínicas tales como esputo, aspirado bronquial, orina, biopsias de ganglios y tejidos, sangre periférica, médula ósea, líquido pleural, líquido de ascitis, líquido cefalorraquídeo, abscesos, huesos, etcétera; de pacientes tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos que están hospitalizados o que asisten a la consulta externa del Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” del ISSSTE. Las edades de los pacientes oscilaron entre 15-81 años, además de una niña de 2 años que resultó afectada por *M.bovis*

De estos pacientes el 79% (33) de ellos tiene algún tipo de inmunosupresión, de las que destacan el VIH y la diabetes con 14 y 13 casos respectivamente. El 37% de las cepas estudiadas resultaron pertenecer a las MNT y por la revisión de expedientes clínicos se observó que los pacientes de los que provenían estas cepas no recibieron el tratamiento adecuado, lo que los llevó a la persistencia de la enfermedad y en algunos casos lamentablemente hasta la muerte.

Las nuevas técnicas son muy necesarias, y los análisis moleculares de amplificación como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han demostrado ser alternativas prometedoras, incluso para los países en vías de desarrollo. La PCR tiene el potencial de ser una alternativa rentable. Si el diagnóstico se puede establecer más rápido, y el proceso de análisis se hace más ágil en el laboratorio la PCR puede reducir la demora tanto en el diagnóstico acertado y en el inicio del tratamiento.

2.- OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las micobacterias aisladas de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos en un hospital de tercer nivel y demostrar la importancia de la identificación hasta nivel de especie para dar un tratamiento adecuado.

2.1- Objetivos específicos

- 2.1.1 Determinar mediante PCR sí la micobacteria aislada de un paciente inmunocomprometido o inmunocompetente pertenece al complejo *M.tuberculosis* (CMT) o es una micobacteria no tuberculosa (MNT).
- 2.1.2 Diferenciar mediante PCR múltiple entre *M.bovis* o *M.tuberculosis*.
- 2.1.3 Observar si se cumple la tendencia en los pacientes inmunocomprometidos de ser afectados mayormente por micobacterias no tuberculosas (MNT)
- 2.1.4 Correlacionar el impacto social y económico de la identificación de una micobacteria a nivel de especie

3.- ANTECEDENTES

3.1 Epidemiología

La TB es una de las enfermedades más antiguas que han afectado a la especie humana, las estimaciones le otorgan a *Mycobacterium tuberculosis* un origen desde hace 15,300 a 20,400 años. A pesar de ser tan antigua y de que probablemente es una de las enfermedades de las que más se ha escrito y publicado, sorprende el desconocimiento que se ha tenido sobre la misma a lo largo de la historia, hecho que escasamente ha ayudado a combatirla. Así, en los últimos 100-150 años, *M.tuberculosis* ha ido desplazándose paulatinamente hacia las poblaciones más vulnerables del planeta, o sea, hacia aquellos lugares donde la extrema pobreza no sólo asegura su subsistencia y transmisión, sino también donde los escasos recursos económicos no permiten la más mínima lucha contra este microorganismo. No en vano sigue siendo, en los inicios del nuevo milenio, la enfermedad infecciosa humana más importante en el planeta y el patógeno que mayor número de muertes sigue produciendo, fatídico primer puesto en el que compite con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)⁴

Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial, dos mil millones de personas, están infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo causante de la tuberculosis; aproximadamente 8 millones de ellos enferman anualmente y cerca de dos millones mueren por esta causa. En 2009 hubo 9,4 millones de casos nuevos de tuberculosis y murieron 1,7 millones de personas (de las que 380,000 tenían el VIH), lo que equivale a unas 4700 muertes al día.¹

A pesar de los avances logrados, en la Región de las Américas, la tuberculosis continúa siendo un importante problema de salud pública. Se estima que en 2009 hubo 270,000 casos de TB de todas las formas y 20,000 muertes por esta causa (excluyendo VIH), la mayoría de ellas evitables. La notificación de los países para

el mismo año fue de 191,300 nuevos casos de TB de todas las formas, y 110.598 de TB pulmonar, con tasas de 21 y 12 por 100,000 habitantes, respectivamente. Esto representó el 70% de los nuevos casos estimados evidenciándose una brecha entre la notificación y estimación. El 77% de los casos notificados de TB pulmonar en 2009 afectó a población menor de 54 años de edad con predominio del sexo masculino (1.8 hombres por 1 mujer).

En este mismo año el 65% de la notificación de casos nuevos se concentró en cuatro países de la Región: Brasil, Perú, Haití y México.⁵

3.2 Etiología

La tuberculosis es una enfermedad causada por los miembros del complejo *M.tuberculosis* (CMT), el cual se encuentra conformado por *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.caprae*, *M.microti*, *M.canetti* y *M.pinnipeddi*. Genéticamente, todos los miembros de este complejo son muy similares, teniendo un 99.9% de similitud a nivel de nucleótidos, además de poseer secuencias idénticas para el DNA ribosomal 16S.⁶

M.tuberculosis es un microorganismo con forma bacilar que se comporta como aerobio estricto. Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor de pH circundante. Es muy resistente al frío, la congelación y a la desecación, siendo, por el contrario, muy sensible al calor, luz solar y luz ultravioleta. Su multiplicación es muy lenta (14-24horas) mientras que el tiempo de generación de otras bacterias puede ser tan breve como 20 a 30 minutos y, ante circunstancias metabólicas adversas entra en un estado latente o durmiente, pudiendo llegar a demorar su multiplicación desde varios días hasta muchos años.⁷

Los microorganismos causales de la TB se incluyen, taxonómicamente en el orden *Actinomycetales* y en la familia *Mycobacteriaceae*. La pared celular es rica en lípidos, lo que hace que su superficie sea hidrofóbica y confiere a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes y frente a las tinciones habituales de laboratorio. Cuando han sido teñidos, los bacilos tampoco se pueden decolorar con las soluciones acidas, motivo por el que reciben el nombre de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) (Figura 1). Aunque otras especies de bacterias pueden ser ácido alcohol resistentes (p. ej., *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordonia*), se tiñen con menor intensidad (acidorresistencia parcial) y las cadenas de sus ácidos micólicos son más cortas.⁸

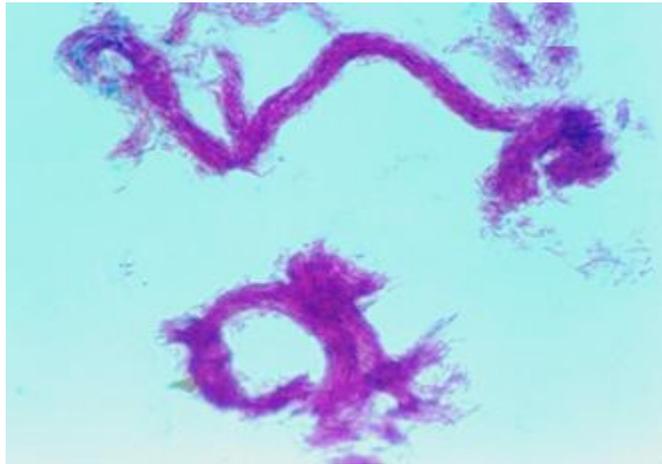


Figura 1. Bacilos ácido alcohol resistentes observados de cultivo en medio Dubos en microscopio óptico con el objetivo 100X

3.3 Estudio en el laboratorio clínico

3.3.1 Tipo de muestra

Las micobacterias pueden aislarse de una gran variedad de especímenes clínicos, incluyendo esputo, orina, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR); biopsias de tejidos, incluyendo hígado, médula ósea, nódulos linfáticos y cualquier fuente de sospechosa de ser el sitio de la infección tuberculosa. Las muestras que pueden contener una microbiota mixta deben procesarse con rapidez para reducir el problema de la contaminación del cultivo, además de descontaminarse para eliminar el resto de los microorganismos y dejar solo a las micobacterias.⁷

3.3.2 Tinción

Debido a su alto contenido lipídico, las paredes celulares de las micobacterias tienen la capacidad única de ligarse a la fucsina, no siendo decoloradas por el alcohol ácido.

Comúnmente, se utilizan dos tipos de coloración:

1. Carbofucsina: Una mezcla de fucsina con fenol
 - Ziehl-Neelsen(coloración caliente)
 - Kinyoun(coloración fría)
2. Fluorocromo: Se fundamenta en la afinidad que tienen los ácidos micólicos de la pared celular de las micobacterias por los colorantes fluorescentes o fluorocromos auramina o rodamina.

3.3.3 Baciloscopía

Es el procedimiento más fácil y rápido que se puede efectuar y aporta al clínico una confirmación preliminar del diagnóstico que sirve para iniciar el tratamiento y confirmar el caso. La aconsejable es la técnica clásica de Ziehl-Neelsen, en la que *M.tuberculosis* se ve como pequeños bastones curvados (bacilos) de color rojo sobre un fondo azulado⁸ (Figura 1).

La baciloscopía es la técnica de elección en el diagnóstico de la TB, en todos los medios, por cinco características básicas que aún no han sido superadas por el resto de las técnicas, y estas son: sencillez y reproductibilidad en cualquier medio, rapidez, bajo costo, elevada especificidad y la delimitación de contagiosidad. La gran limitación de la baciloscopía es su relativamente baja sensibilidad (solo es positiva cuando el paciente elimina entre 5,000 y 10,000 bacilos/mL), que hace que la gran mayoría de los casos que se detectan por esta técnica sean bastante avanzados, así la aparición de una baciloscopía negativa no descarta el diagnóstico de TB.⁴

La especificidad de la baciloscopía, aunque es muy elevada, puede estar condicionada por que la ácido-alcohol resistencia es una propiedad común a todas las especies del género *Mycobacterium* y a algunos actinomicetos. Por ello, el resto de las micobacterias ambientales se verán exactamente igual en una observación microscópica.⁸

3.3.4 Cultivo

El cultivo de las micobacterias es el único método que puede asegurar un diagnóstico de certeza de TB.⁸

Los resultados del cultivo dependen en gran parte de los pasos previos de digestión y descontaminación de las muestras. La mayor parte de muestras clínicas contienen gran cantidad de microorganismos de la microbiota comensal que crecen con mayor rapidez que *M.tuberculosis*.⁴

El cultivo tiene una serie de importantes ventajas que lo sitúan como el “estándar de oro” del diagnóstico y seguimiento de los casos de TB. Estas ventajas son:

- Los cultivos son mucho más sensibles que la baciloscopía, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por mL de muestra.
- El aislamiento en cultivo puro es necesario para poder identificar correctamente las cepas obtenidas.
- Permite asegurar, con certeza, la negativización y curación del paciente con el tratamiento.

Sus limitaciones fundamentalmente son:

- El mayor inconveniente del cultivo convencional se deriva de la lenta capacidad de división de *M.tuberculosis*
- Su costo es muy superior al de la baciloscopía y para realizarlo se necesitan medios de cultivo específicos y una posterior incubación por periodos de tiempo extendidos. Además, el entrenamiento del personal para realizar estos cultivos debe ser más específico y se suma la necesidad de una campana de flujo laminar para llevar a cabo todo el procedimiento.⁴

3.3.5 Pruebas bioquímicas

Considerando que *Mycobacterium tuberculosis* es la causa más común de enfermedad micobacteriana en el hombre, muchos laboratorios se esfuerzan para mantener la eficiencia e identificar a este microorganismo usando pruebas simples que puedan realizarse en cualquier laboratorio interesado. Para su cultivo e identificación por pruebas bioquímicas se recomienda controlar los siguientes parámetros:

- Temperatura óptima para el aislamiento y promedio de crecimiento.
- Producción de pigmento.
- Acumulación de niacina.
- Reducción de nitratos a nitritos
- Actividad catalasa

Las micobacterias integrantes del complejo *M.tuberculosis* pueden ser diferenciadas fácilmente empleando un escaso número de pruebas bioquímicas ya que son niacina positiva, reducen nitratos a nitritos, poseen pirazinamidasasa y poseen una catalasa termolábil. Las principales limitaciones de las técnicas bioquímicas son su complejidad, lentitud y falta de reproductividad.⁷

Durante la última década se han desarrollado una serie de técnicas de Biología molecular que permiten la amplificación de secuencias de DNA y de RNA específicas del complejo *M.tuberculosis*. Permiten generar, a partir de una única copia de DNA o RNA, mediante proceso enzimático, millones de copias del ácido nucleico diana, facilitando de esta forma la detección de *M.tuberculosis*. Esta tecnología ha logrado solventar los principales problemas inherentes a las técnicas microbiológicas convencionales, permitiendo establecer diagnósticos rápidos (entre 2 y 8 horas) y mejorar la sensibilidad de los métodos de cultivo tradicional. Las evaluaciones llevadas a cabo sobre muestras clínicas con baciloscopía positiva ofrecen excelentes resultados de sensibilidad (> 98%) y especificidad

(>98%), tanto con los sistemas que amplifican DNA como RNA. Sin embargo la variabilidad es mayor cuando se evalúan las muestras con baciloscopía negativa. Los trabajos realizados con PCR han evidenciado sensibilidades entre el 50-60% en muestras de baciloscopía negativa de origen pulmonar, pero dicha sensibilidad disminuye de forma muy importante en las muestras extrarrespiratorias, debido a un elevado número de inhibiciones de la reacción.⁴

3.4 Transmisión y patogénesis

La transmisión de los bacilos de la tuberculosis se produce casi exclusivamente por medio de núcleos suspendidos en pequeñas gotas que son expulsadas con la expectoración de las personas afectadas por tuberculosis pulmonar. Estas pequeñas gotas pueden permanecer infectantes en el aire durante largo tiempo y pueden ser inhaladas por otras personas. La infección de los contactos es más probable cuando conviven o permanecen durante un tiempo prolongado cerca del enfermo que está expectorando bacilos y en un ambiente poco ventilado.

La infección primaria por *M. tuberculosis* comienza cuando una persona inhala aerosoles en el aire que contienen microorganismos y que por su tamaño logran evadir las defensas de los bronquios penetrando hasta los alvéolos. Ahí, los bacilos son ingeridos por los macrófagos alveolares que los transportan a los ganglios regionales. Cuando la infección no es contenida a ese nivel, los bacilos pueden llegar a la sangre y diseminarse. La mayor parte de las lesiones pulmonares o de diseminación cicatrizan volviéndose focos de futura potencial reactivación. La infección primaria produce una respuesta inflamatoria inespecífica que es usualmente asintomática, pero si ocurre diseminación ésta puede resultar en tuberculosis miliar o meníngea potencialmente mortal, particularmente en lactantes y niños pequeños.⁵

Aproximadamente después de dos a diez semanas de la infección primaria aparece una lesión primaria demostrable mediante rayos X, y se completa una respuesta de hipersensibilidad mediada por células en el huésped que puede comprobarse por la prueba de tuberculina o PPD (derivado proteínico purificado). En cuanto al periodo de incubación de la tuberculosis, la mayor parte de las personas inmunocompetentes (90%) contienen la infección primaria y no desarrollan la enfermedad. Estas personas pueden permanecer infectadas pero asintomáticas toda la vida, y sin transmitir el microorganismo a otros. Del 10% que desarrolla la enfermedad tuberculosa, 5% lo hace por progresión de la infección primaria y el otro 5% después de la infección primaria por reactivación. La enfermedad tuberculosa se produce también por reinfección, es decir, una nueva infección que abruma la capacidad de contención del sistema inmune.⁵

La tuberculosis puede manifestarse en cualquier órgano, porque *M.tuberculosis* se disemina por todo el organismo; sin embargo, la enfermedad pulmonar es la más frecuente (80-85% de todos los casos diagnosticados) debido a que el bacilo necesita abundante oxígeno para multiplicarse.⁵

El reservorio fundamental de *M.tuberculosis* es el hombre, aunque no hay que olvidar que el ganado bovino lo es de *M.bovis* y que muchos animales pueden serlo también del complejo *M.tuberculosis*, sin embargo la fuente de contagio de esta enfermedad la constituye, casi exclusivamente el hombre infectado.⁴

Existen una serie de condiciones que facilitan el que el huésped tenga mayor probabilidad de enfermar si se produce el contagio, casi todas ellas ligadas a un mayor o menor grado de inmunodeficiencia. Son los denominados factores de riesgo de la TB. (Tabla 1)⁴

Las edades límites de la vida son las más vulnerables a padecer la enfermedad, sobre todo los niños menores de 5 años y los adultos mayores de 65-70 años. Esto puede estar parcialmente justificado por el discreto grado de inmunodeficiencia que se puede tener en estas edades. En todas las series

estudiadas a nivel mundial la TB afecta más frecuentemente a varones (60-70%) que a mujeres. No todas las personas poseen igual riesgo para desarrollar TB una vez adquirida la infección. Se conocen una serie de circunstancias que facilitan el desarrollo de la enfermedad; estos que conllevan un mayor o menor grado de inmunodeficiencia incrementan hasta 100 veces la posibilidad de padecer TB con respecto a la probabilidad que puede tener una persona normal.⁴

Tabla 1. Factores de riesgo para pasar de infección por TB a enfermedad⁴

Factor	Riesgo relativo comparado con población normal
Infección por VIH	50-100
Cortocircuito yeyunoileal	27-63
Neoplasias sólidas	1-36
Silicosis	8-34
Neoplasia de cabeza y cuello	16
Hemodiálisis	10-15
Neoplasias hematológicas	4-15
Lesiones fibróticas	2-14
Fármacos inmunosupresores	2-12
Hemofilia	9
Gastrectomía	5
Bajo peso corporal	2-4
Diabetes mellitus	2-4
Fumadores importantes	2-4
Población normal	1

Fuente: Caminero-Luna "Tuberculosis para médicos especialistas" (UICTER). Francia 2003

En todos los países del mundo ha habido un incremento en los casos de TB, atribuyéndose este fenómeno a diversos factores, como son: descuido y abandono de los programas de control de la tuberculosis, la aparición de un elevado número de cepas resistentes a una o más de las drogas de primera línea y sobre todo el creciente número de personas infectadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), y con otras inmunosupresiones como Diabetes y desnutrición. Adicionalmente en estos pacientes con inmunosupresión se han incrementado las coinfecciones con micobacterias no tuberculosas (MNT).²

Las enfermedades causadas por las MNT son prácticamente indistinguibles de las causadas por los miembros del Complejo *M.tuberculosis* (CMT), desde el punto de vista clínico, radiológico y microbiológico; sin embargo el tratamiento es muy distinto dependiendo del grupo de micobacterias que estén infectando al huésped, por lo que es muy importante su identificación a nivel de especie.³

La diferenciación a nivel de especie de las micobacterias por métodos tradicionales es muy lenta debido a que se realiza mediante pruebas bioquímicas que requieren contar con un cultivo puro y abundante, el resultado final requiere de 30 a 45 días. La diferenciación se puede realizar mediante técnicas más sofisticadas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés), sondas moleculares (que son muy costosas) o bien, pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que son más sencillas de realizar; con un menor costo y que adicionalmente ofrecen resultados en un tiempo menor.⁴

3.5 Impacto del VIH en la tuberculosis

La coinfección TB/VIH, manifestada ya sea como infección tuberculosa latente o como enfermedad tuberculosa activa, es un problema significativo de salud pública a nivel mundial. En el año 2009 se estimaron 1.1 millones de nuevos casos de coinfección por tuberculosis y VIH en el mundo y 24.000 nuevos casos en la Región de las Américas. De estos últimos se notificaron 14.762 casos (62%).

La tuberculosis es la causa de muerte de una de cada tres personas con SIDA en el mundo. Una tercera parte del incremento en los casos de tuberculosis a nivel mundial se atribuye a la propagación del VIH. En América, se estima que el 9.5% de las muertes por TB están asociadas al VIH.⁵

En el año 2009 el porcentaje de casos de TB con prueba de VIH en la región fue del 41%, siendo la mayoría de casos reportados por Brasil (45%). El promedio regional de coinfección TB/VIH reportada fue de 17% y casi la mitad de los países reportaron suministro de tratamiento antirretroviral para más del 50% de los casos coinfectados.⁵

El impacto de la coinfección VIH y tuberculosis es bidireccional. La tuberculosis, al aumentar la carga viral, acelera la progresión de la infección por VIH a SIDA, y con ello a la muerte. La infección por VIH, al conducir a la declinación de linfocitos CD4 (que son de crucial importancia en iniciar y mantener la respuesta inmune) afecta la presentación clínica y evolución de la tuberculosis, ya que:

- Promueve la progresión a enfermedad de personas infectadas con TB. El riesgo de progresión de infección por TB a enfermedad es de 5% en personas sin VIH en los primeros 2 años y luego <5% el resto de la vida. En personas con VIH ese riesgo es de 3 a 13% por año, aumentando a > 30% para el resto de la vida
- Aumenta la tasa de recurrencia por TB.
- Al haber más casos de TB/VIH aumenta el riesgo de transmisión de TB en la comunidad

- Aumenta la mortalidad
- Incrementa la demanda al sistema de salud
- Favorece el desarrollo de formas de TB extrapulmonar y baciloscopias negativas.⁵

En los países industrializados, el 80% de los infectados por *M.tuberculosis* son mayores de 50 años, mientras que el 85-90% de los infectados por el VIH se encuentran por debajo de esa edad. En las naciones en vías de desarrollo, además de que tienen un gran número de infectados por ambos patógenos, tanto los infectados por *M.tuberculosis* como por VIH están coincidiendo en los mismos grupos de edad (población de 20-49 años). Se estima que la incidencia de la TB en personas con VIH es 100 veces mayor que en la población en general; según datos de la OMS el 40% de los pacientes mueren con TB.⁹

En pacientes inmunodeprimidos con VIH/SIDA y otras inmunosupresiones se han aislado no solo micobacterias del CMT sino también micobacterias no tuberculosas (MNT);¹⁰ las más frecuentemente reportadas como causantes de enfermedad pulmonar y diseminada pertenecen al complejo MAC que incluye a *M.intracellulare* y *M.avium*.¹¹ La incidencia de infecciones por este tipo de micobacterias ha aumentado en los últimos años por lo que se ha recomendado que en el caso de infecciones micobacterianas se realice el diagnóstico a nivel de especie, ya que el tratamiento del CMT es diferente al que se administra a los pacientes infectados con MNT. Para el CMT se administra Rifampicina, Isoniacida, Pirazinamida, Etambutol y Estreptomina en diferentes combinaciones y dosis dependiendo tanto si la TB es localizada o diseminada y de la inmunosupresión del paciente. Mientras que para las MNT en su mayoría se tratan con Claritromicina, Azitromicina, Rifabutina o Rifampicina. También es importante diferenciar *M.bovis* de *M.tuberculosis* dentro del complejo CMT ya que en el caso de *M.bovis* se elimina la Pirazinamida que es la más hepatotóxica de todas las drogas antifímicas.¹²

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Para este trabajo se recolectaron 65 cepas provenientes de 45 pacientes procedentes de muestras clínicas tales como esputo, aspirado bronquial, orina, biopsias de ganglios y tejidos, sangre periférica, médula ósea, líquido pleural, líquido de ascitis, líquido cefalorraquídeo, abscesos, huesos, etcétera; de pacientes tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos que estuvieron hospitalizados o que asistieron a la consulta externa del Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” del ISSSTE. Las edades de los pacientes oscilaron entre 15-81 años, además de una niña de 2 años que resultó afectada por *M.bovis*.

De estas 65 cepas la amplificación y diferenciación se logró en 57 de ellas pertenecientes a 42 pacientes.

4.2 Cultivo de muestras

Las muestras se sembraron en medio Lowestein -Jensen (LJ) o MGIT(Tubo Indicador de Crecimiento de Micobacteria), a partir de los cuales cuando fueron positivos se realizó un frotis teñido por Kinyoun para verificar que se trataba de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR), posteriormente se resembraron en 15 mL de medio Dubos enriquecido con OADC/PANTA (Ácido oleico, Albumina, Dextrosa, Catalasa/Polimixina B, Anfotericina B, Acido Nalídixico, Trimetoprima y Azlocilina), el cual se incubó a 37°C de 7 a 20 días. Una vez que se observó el desarrollo en dicho medio se realizó nuevamente un frotis y se tiño por Kinyoun para verificar la pureza del cultivo. Este procedimiento se realizó con la finalidad de aumentar la población de micobacterias de cada cepa y así tener suficiente material biológico para poder realizar la estandarización de la técnica.

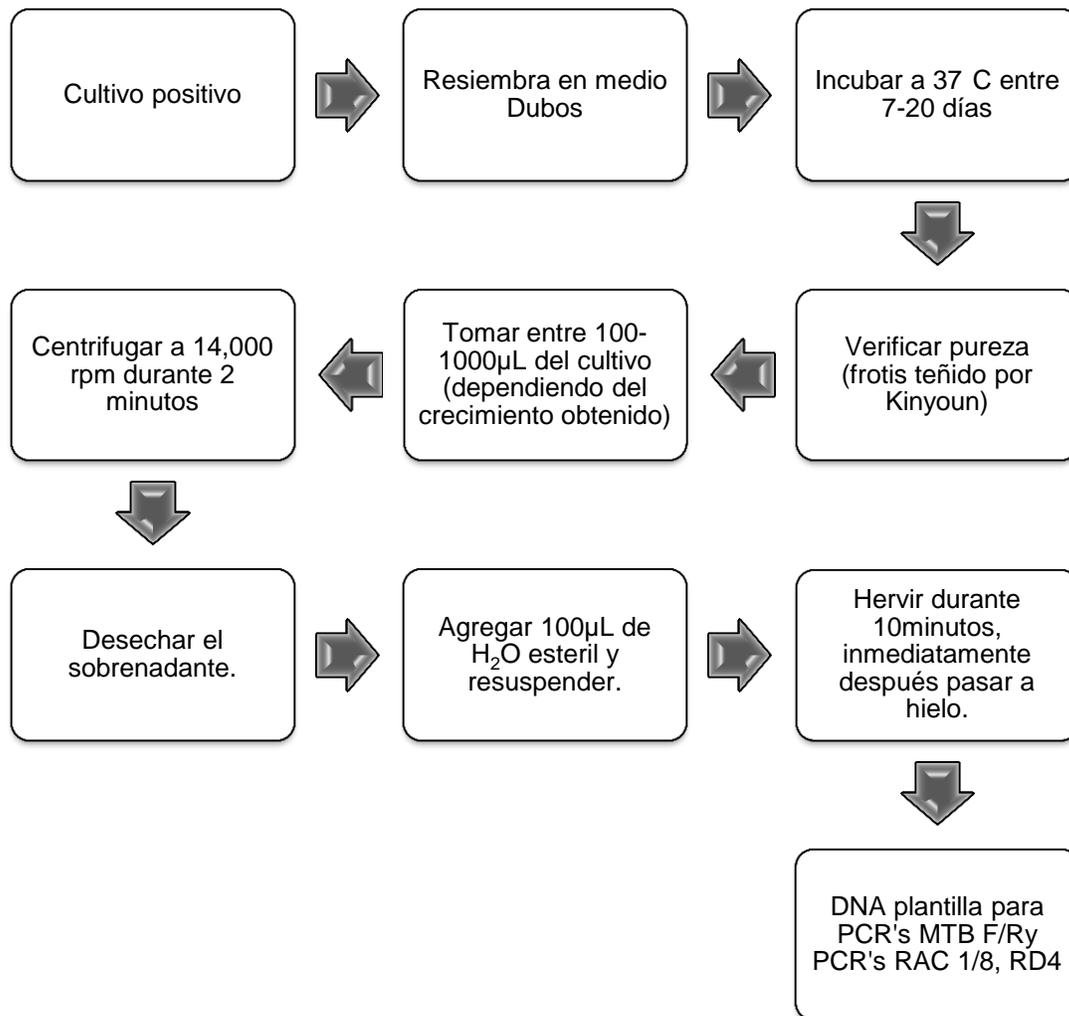
4.3 Extracción del DNA para la realización de la PCR

4.3.1 Cultivo líquido.

Confirmada la pureza del cultivo se utilizaron entre 100-1000µL de este, dependiendo del crecimiento. Estos se centrifugaron a 14,000 rpm por un periodo de 2 minutos, al obtener un botón se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100µL de agua estéril. Esta suspensión se hirvió durante 10 minutos e inmediatamente después se pasó a hielo. Esta técnica se tomó de un trabajo donde fue utilizada para la extracción de DNA de *Escherichia coli* por Cobos-Marin¹³

Esta suspensión se utiliza como plantilla de DNA para efectuar la PCR de diferenciación de especie (Esquema1)

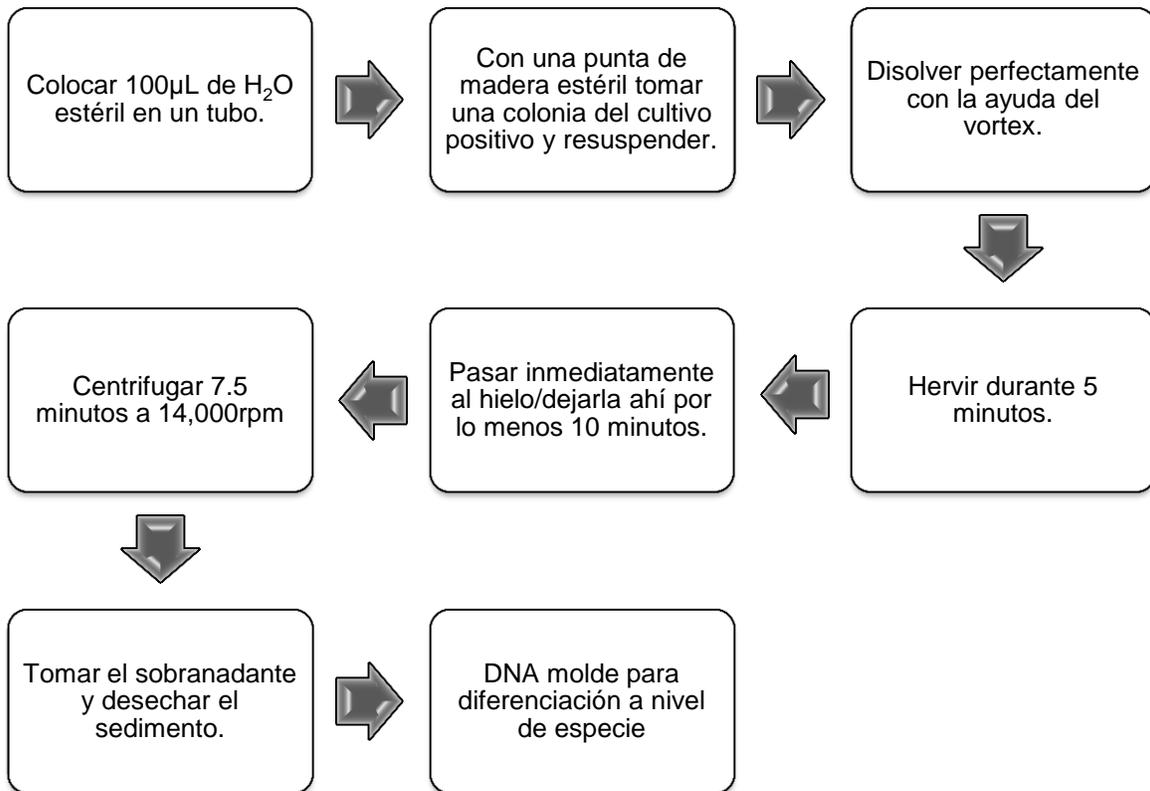
Esquema 1. Extracción de DNA para la PCR de diferenciación de especie de *Mycobacterium* de un cultivo proveniente de medio líquido.



4.3.2 Cultivo sólido

Para los cultivos en medio sólido de LJ se procedió a tomar una asada de la cepa y resuspenderla en 100µL de agua estéril¹³. Esta suspensión se hirvió durante 10 minutos y posteriormente se le dió un choque térmico en hielo en donde se dejó reposar por lo menos 5 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó la suspensión 7.5 minutos a 14,000 rpm.¹³ Se tomó el sobrenadante y se reservó en otro tubo estéril; este es el DNA plantilla para la realización de las PCR's

Esquema 2. Extracción de DNA para la PCR de diferenciación de *Mycobacterium* proveniente de un cultivo sólido



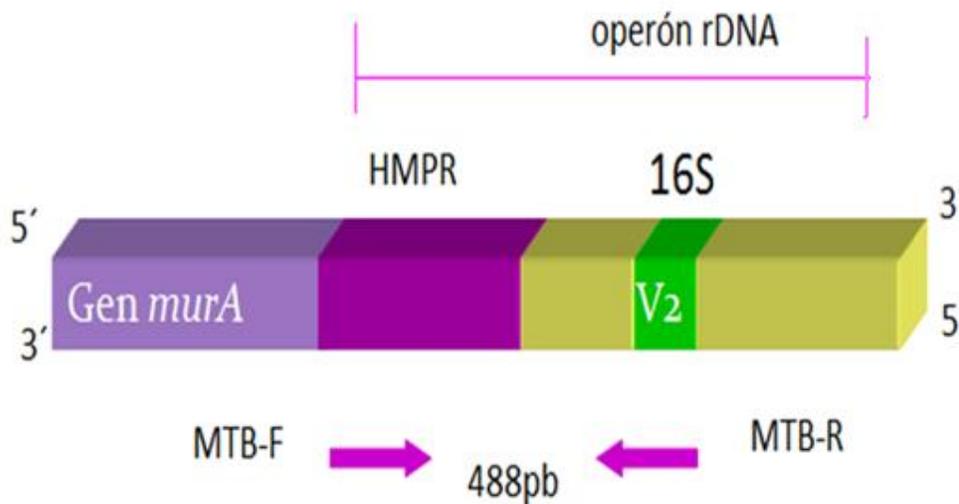
Para lograr la diferenciación a nivel de especie de las cepas estudiadas se usaron dos PCR's desarrolladas por Cobos – Marin y colaboradores en 2003.¹²

4.4 PCR para identificar micobacterias del CMT

Se utilizaron los iniciadores MTB-F/MTB-R, que amplifican un fragmento de 488pb, exclusivo de los miembros del complejo *M.tuberculosis*.^{14,15}(Figura 2 y Tabla 4).

El blanco para el iniciador MTB-F es la secuencia complementaria a los últimos 15 nucleótidos del Gen *murA* y los primeros 6 nucleótidos de la región de promotores del operon rDNA 16S.¹⁴ El blanco para el iniciador MTB-R es la secuencia complementaria a los nucleótidos 192-210 de la región V2 del rDNA 16S.¹⁵

Figura 2. PCR utilizando los iniciadores MTB-F/MTB-R



Se utilizó un volumen de mezcla de 25 μL , las condiciones de la PCR fueron:

Tabla 2. Condiciones de la PCR usando MTB F/R (Identificación de complejo *M.tuberculosis*)

Reactivo	Concentración	Ciclos en el termociclador	Temperatura/tiempo
MgCl ₂	1.7mM	1 ciclo	95°C/5 min
Taq polimerasa	1U	36 ciclos	95°C/30 seg
Mezcla MTB F/R	0.4 μM		58°C/1 min
DNA	1.5 ó 3.0 μL *		72°C/2 min
DNTP's	200 μM		1 ciclo

*1.5 μL si es de un cultivo líquido y 3 μL si es a partir de un cultivo sólido.

Los productos de amplificación de esta PCR se separan en un gel de agarosa al 1.5% con TAE (40mM Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA) usando este mismo como buffer de corrida. También se utiliza un marcador en escalera de 100pb. De cada producto de PCR se corren 9 μL mezclados con 1 μL de colorante de corrida, se complementa la corrida del gel usando un blanco y un control positivo. En el caso del control positivo se utiliza una plantilla de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Esta cepa y todas las demás usadas como referencia en este trabajo fueron amablemente donadas por el Doctor Jorge A. González y Merchand; Jefe del Departamento de Microbiología Molecular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Cada gel se corre a 90volts por alrededor de una hora y treinta minutos. Los resultados de cada gel se revelan al sumergirlos por 10 minutos en bromuro de etidio (150 mg de bromuro de etidio/100mL H₂O) y exponerlos posteriormente a luz UV a una frecuencia de 302nm.

La aparición de una banda cercana a los 500pb (488pb) que coincida con la banda del control positivo indica la presencia de una micobacteria perteneciente al CMT (Figura 3), más sin embargo con esta PCR no se pueden aun diferenciar *M.bovis* de *M.tuberculosis*, por lo que se necesita hacer una segunda PCR para poder llevar a cabo una correcta diferenciación.¹³

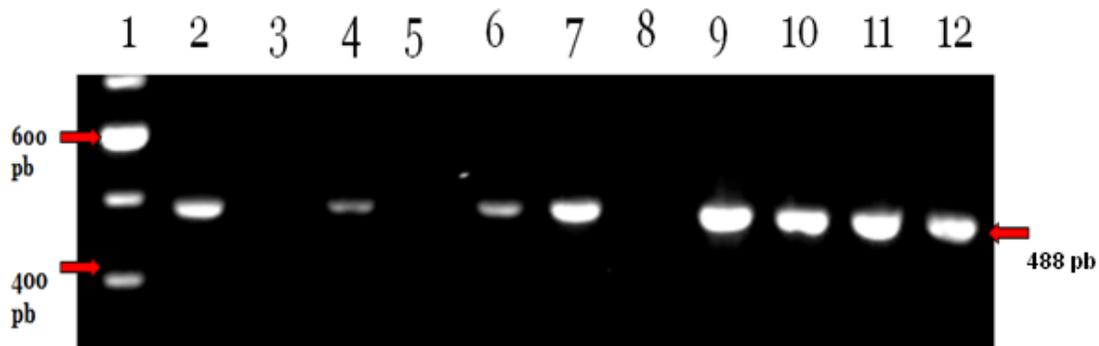


Figura 3. Interpretación de los resultados de la PCR para diferenciar micobacterias pertenecientes al CMT. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control positivo (*M.tuberculosis* H37Rv), Carril 3: Control negativo (*M. avium*), Carriles 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12: Micobacterias pertenecientes al complejo *M.tuberculosis*, Carriles 5 y 8: Micobacterias no tuberculosas (MNT)

4.4 PCR múltiple para identificar género *Mycobacterium* y diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

Se realizó una PCR multiplex usando la combinación de los iniciadores RAC1/RAC8 y Y277-32F/ Y277-32R. Los iniciadores RAC1/RAC8 amplifican un fragmento que abarca desde los últimos 99 codones del gen *murA* a la posición 357 del gen *rDNA* 16S y cuyo tamaño puede variar entre 900 a 1500pb (Tablas 4 y 5) dependiendo de la especie micobacteriana, hasta ahora este fragmento se ha encontrado en todas las especies micobacterianas que se han estudiado.^{14,16,17} Los iniciadores Y277-32F/ Y277-32R amplifican una porción de 1031 pb de la región de diferenciación 4(RD4) que está presente en el genoma de todos los miembros del CMT excepto en *M. bovis*.^{6,18,19} (Figura 4 y Tabla 4)

Figura 4. PCR múltiple utilizando los iniciadores RAC1/RAC8 y Y277-32F/ Y277-32R

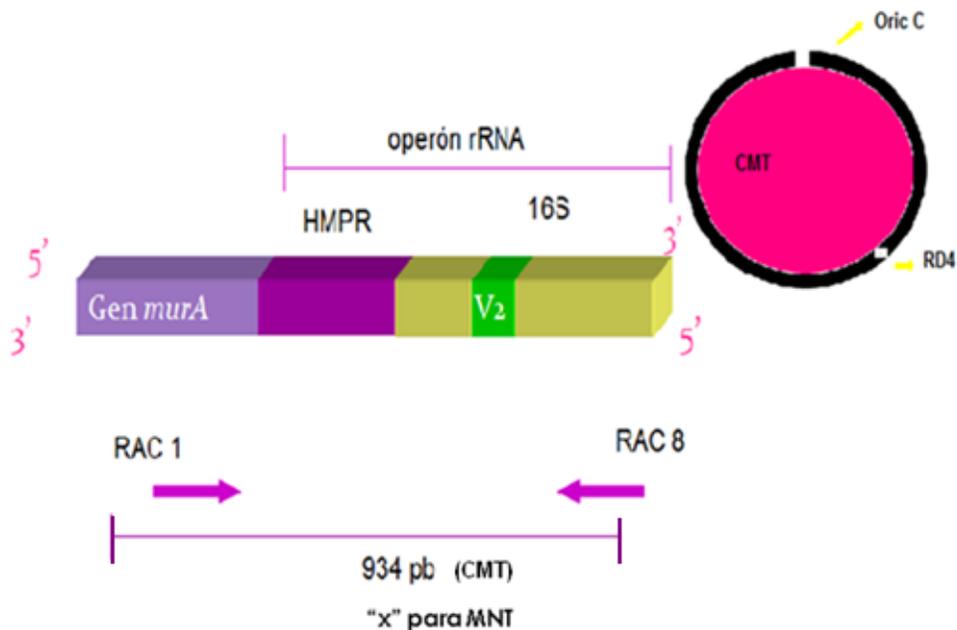


Tabla 3. Condiciones de la PCR múltiple RD4, RAC 1/8 (Diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* de MNT)

Reactivo	Concentración	Ciclos en el termociclador	Temperatura/tiempo
MgCl ₂	1.5mM	1 ciclo	95°C/5 min
Taq polimerasa	0.15	36 ciclos	95°C/30 seg
Mezcla RAC 1/8	0.1µM		56.2°C/1 min
Mezcla RD4 F/R	0.4µM		72°C/2 min
DNA	1.0 ó 2.0 µL*	1 ciclo	72°C/5 min
DNTP´s	200µM		
DMSO	10%		

El volumen de mezcla fue de 25 µL y las condiciones de la PCR:

*1.0µL si es de cultivo líquido y 2.0µL si es de cultivo sólido

Tabla 4. Iniciadores¹³

INICIADOR	SECUENCIA 5'-3'	FRAGMENTO AMPLIFICADO	PRESENTE EN:	TAMAÑO DEL FRAGMENTO
RAC 1	TCGATGATCACCG AGAACGTGTTC	Una región localizada dentro del extremo 3' del gen mura y una parte del gen 16S del rRNA	Género <i>Mycobacterium</i>	900-1500pb
RAC8	CACTGGTGCCTCC CGTAGG			
MTB-F	CGGGTATGCTGTT AGGCGACG	Un fragmento que contiene la región de promotores del operón del rRNA y del extremo 5' del gen 16S del rRNA	Miembros del CMT	488pb
MTB-R	CCACCACAAGACA TGCATG			
Y277-32F	GACATGTACGAGA GACGGCATGAG	Una porción de la región de diferenciación RD4	Miembros del CMT excepto <i>M.bovis</i>	1031 pb
Y277-32R	AATCCAACACGCA GCAACCAG			

Fuente: Cobos Marin et al. "A novel multiplex PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* un clinical isolates of both veterinary and human origin" (2003)

Tabla 5. Tamaño de las bandas para RAC 1/ RAC 8²⁰

Micobacteria	Pares de bases (pb)
<i>M.gordonae</i>	934
<i>M.intracellulare</i>	1000
<i>M.abscesus</i>	1300
<i>M.avium</i>	1000
<i>M.fortuitum</i>	1000~1100
<i>M.kansassii</i>	934
<i>M.tuberculosis</i>	934
<i>M.bovis</i>	934
<i>M.canetti</i>	934

Fuente: Perez-Martinez Iza et al, " A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact".

Los productos de amplificación de esta PCR se separan en un gel de agarosa al 1.5% con TBE1X (TRIS 89mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2mM) usando este mismo como buffer de corrida. También se utiliza un marcador en escalera de 100pb. De cada producto de PCR se corren 9µL mezclados con 1µL de colorante de corrida, se complementa la corrida del gel usando un blanco y un control positivo. En el caso del control positivo se utiliza una plantilla de DNA de *Mycobacterium avium* o *Mycobacterium intracellulare* (ENCB,IPN).

Cada gel se corre a 90volts por alrededor de una hora y treinta minutos. Los resultados de cada gel se revelan al sumergirlos por 10 minutos en bromuro de etidio (150 mg de bromuro de etidio/100mL H₂O) y exponerlos posteriormente a luz UV a 320nm.

La aparición de dos bandas, una cerca por arriba de mil pares de bases (1031pb) y otra cerca de 900 pares de bases (934pb) indica la presencia de *M. tuberculosis*, una sola banda alrededor de 934pb, que adicionalmente haya sido positiva en la PCR para CMT indica la presencia de *M. bovis*, si aparece alguna otra banda entre 934-1500pb pertenece a alguna MNT (Figura 5). De acuerdo a los tamaños

presentados en la tabla 4, podemos darnos una idea de qué tipo de micobacteria no tuberculosa ha amplificado, sin embargo no se puede asegurar la especie de esta manera.

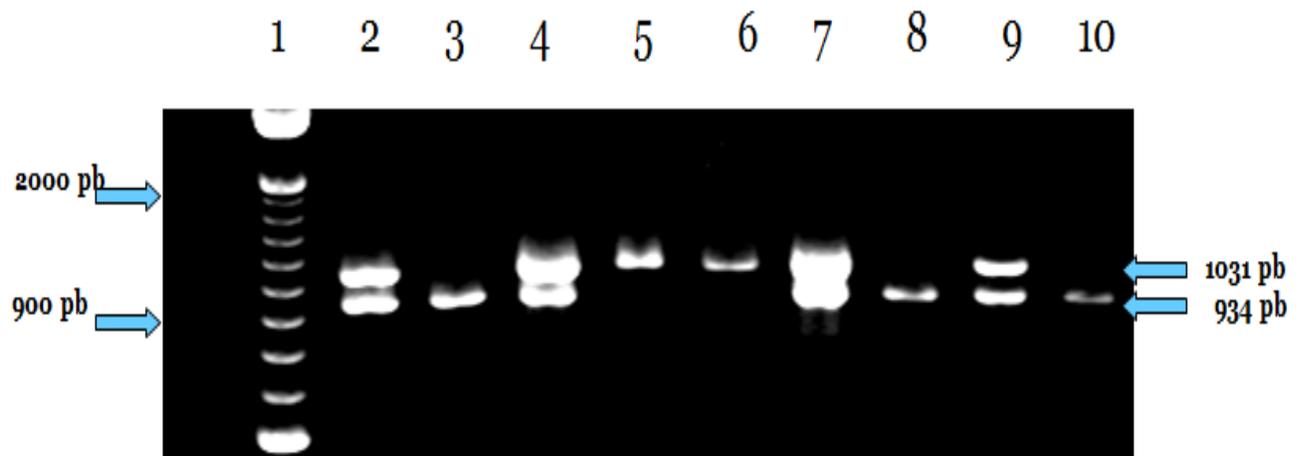
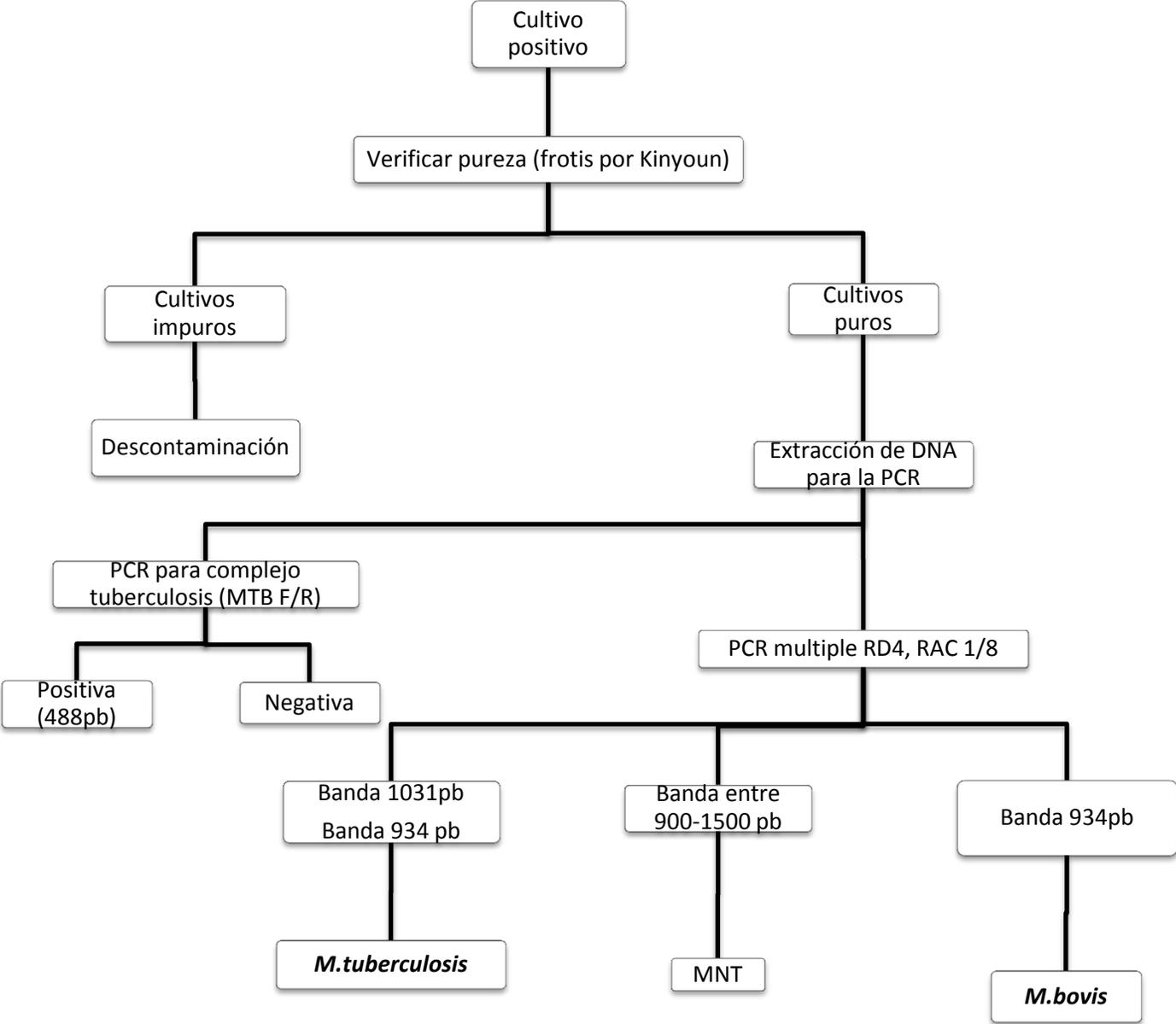


Figura 5. Interpretación de resultados de la PCR múltiple para identificar género *Mycobacterium* y diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control positivo (*M. tuberculosis* H37Rv), Carril 3: Control positivo (*M. bovis* AN5), Carriles 4,7 y 9: *M. tuberculosis*, Carriles 5 y 6: MNT, Carriles 8 y 10: *M. bovis*

Esquema 3. Protocolo general de trabajo e interpretación de resultados



5.- RESULTADOS

Se recolectaron 65 cepas provenientes de 45 pacientes diferentes, de estas cepas se logró una identificación exitosa en 57 de 42 pacientes diferentes. De estos 42 pacientes el 79% (33) de ellos tiene algún tipo de inmunosupresión, de las que destacan el VIH y la diabetes con 13 y 14 casos respectivamente (Figuras 6 y 7).

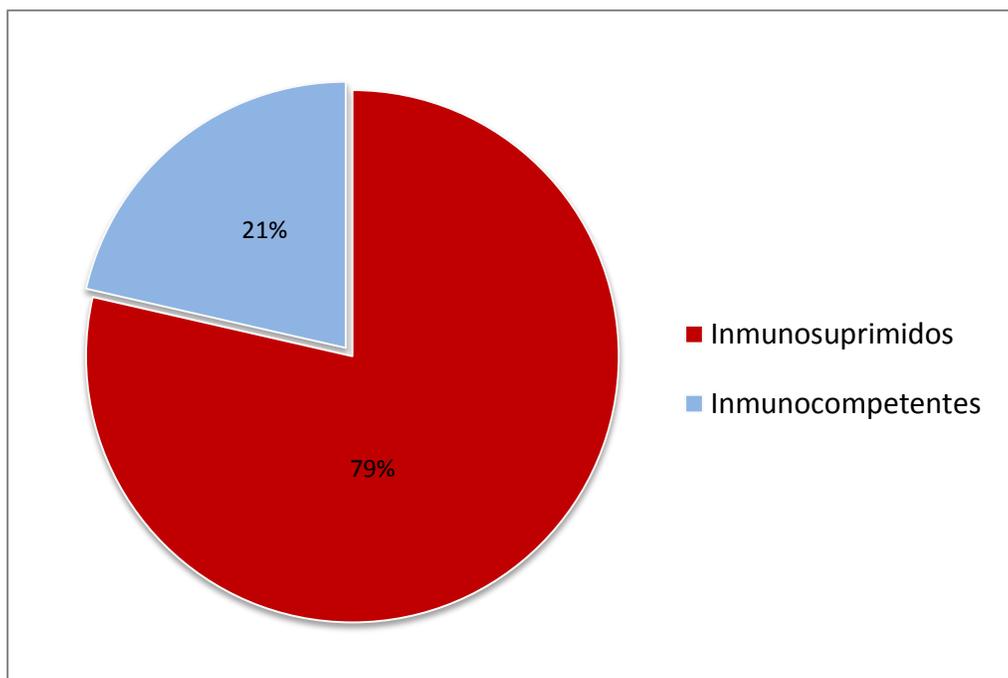


Figura 6. Distribución de los pacientes estudiados de acuerdo a su estado inmunológico

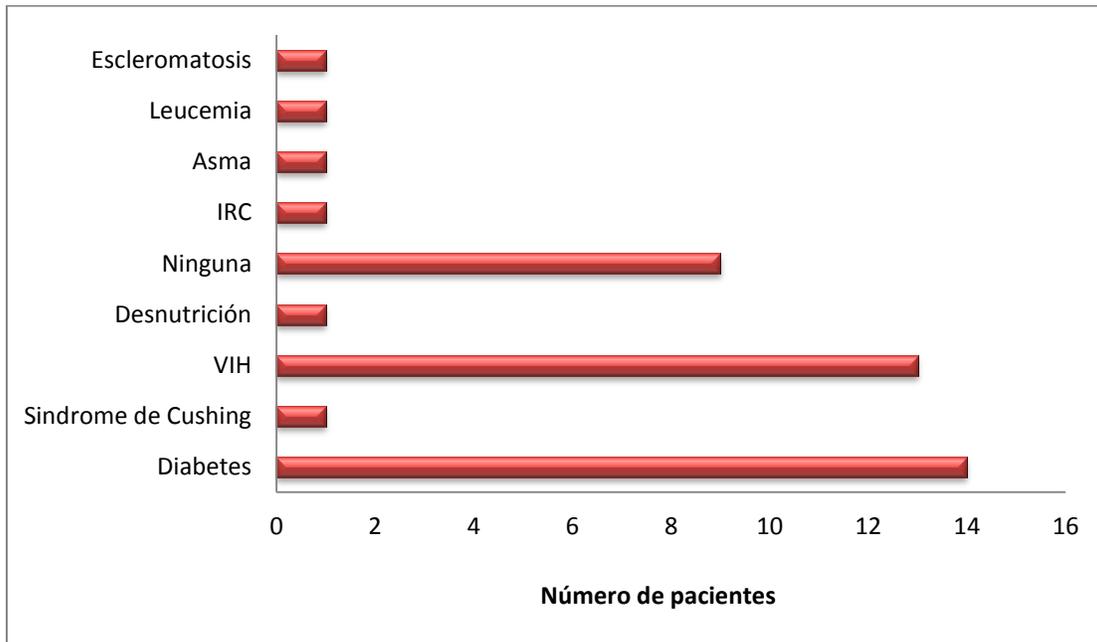


Figura 7. Inmunosupresión asociada a la TB

El 68% de las cepas estudiadas fueron de origen pulmonar (se consideran aspirados bronquiales, esputos y jugos gástricos) (Figura 8). Del 32% correspondiente a las muestras extrapulmonares las cepas se aislaron en su mayoría de sangre, medula ósea y orina (23/57) (Figura 9). Destaca el hecho de que los pacientes con VIH solo hubo una muestra de origen pulmonar.

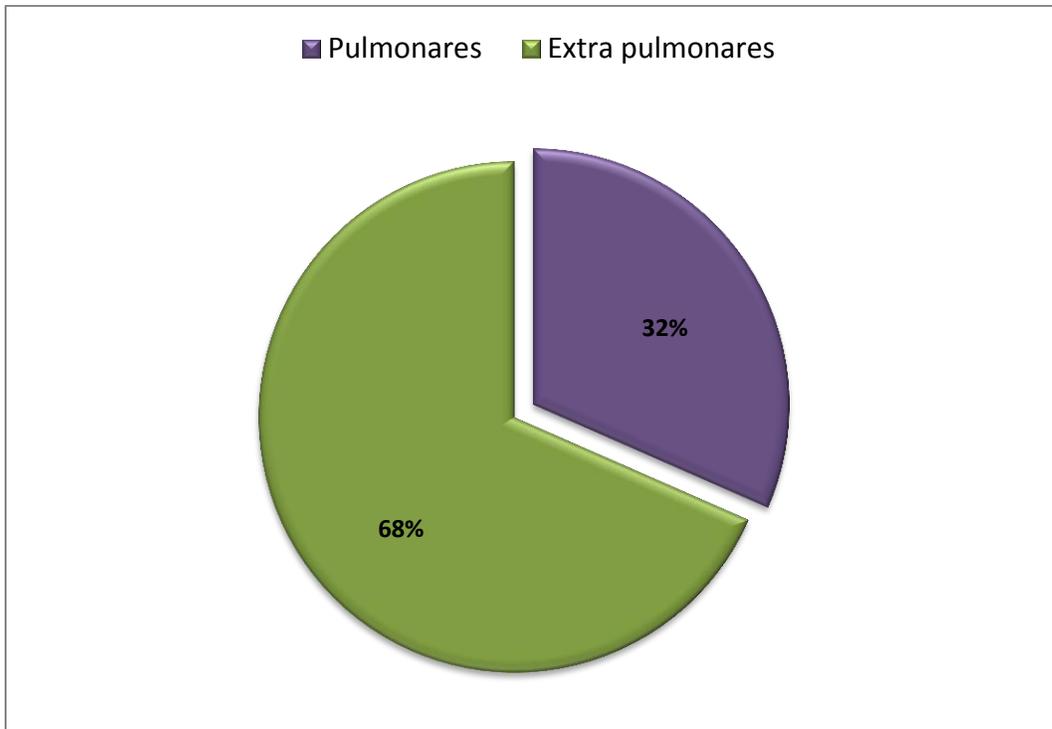


Figura 8. Distribución de las cepas de acuerdo a su localización anatómica

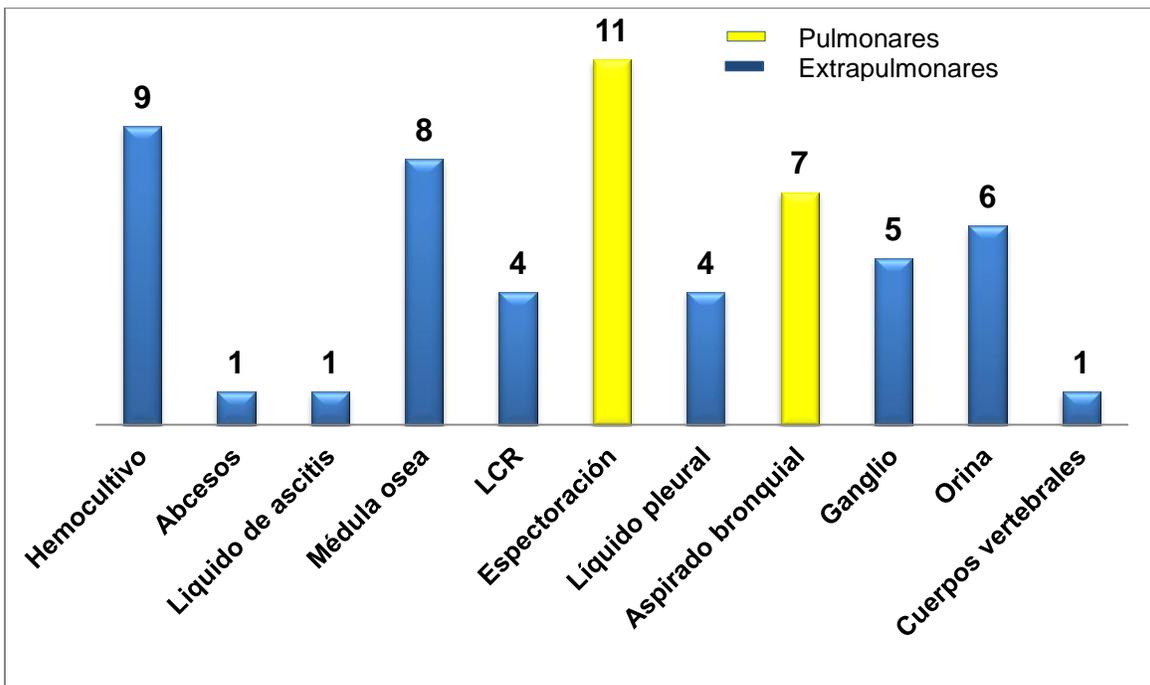


Figura 9. Origen de las muestras

En cuanto a la influencia del sexo no se observó una prevalencia importante sobre hombres o mujeres ya que resultaron ser afectados de manera muy similar (Figura 10), a pesar de que en la literatura se reporta una mayor tendencia de los hombres a ser afectados sobre las mujeres.⁴

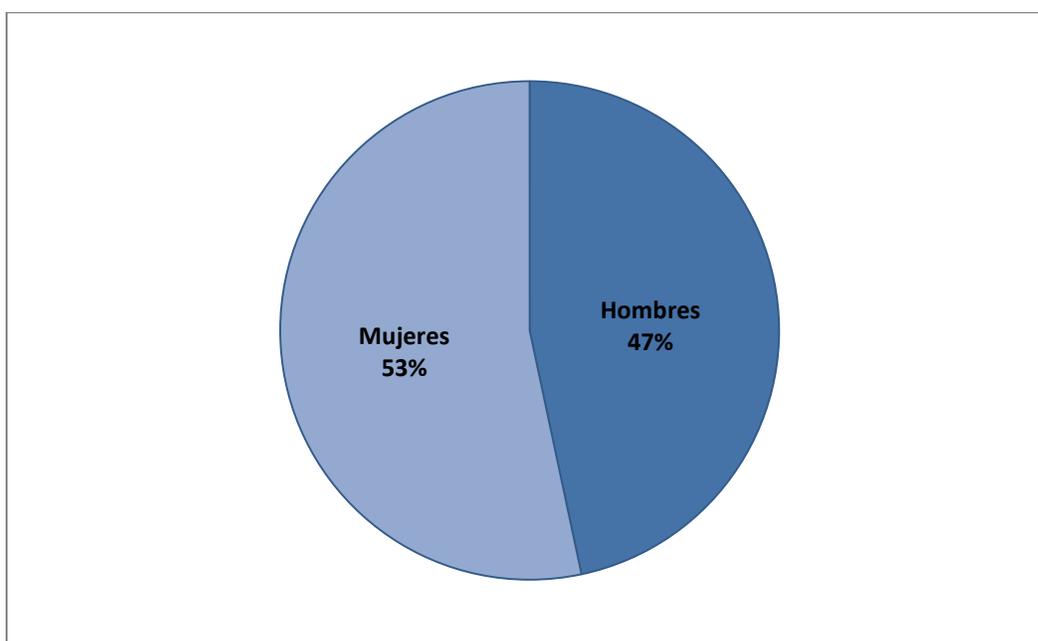


Figura 10. Prevalencia de la TB según el sexo.

El 63% de las cepas estudiadas resultaron pertenecer al CMT: 61% *M. tuberculosis*, 2% *M.bovis* y el 37% restante perteneció a las MNT (Figura 11)

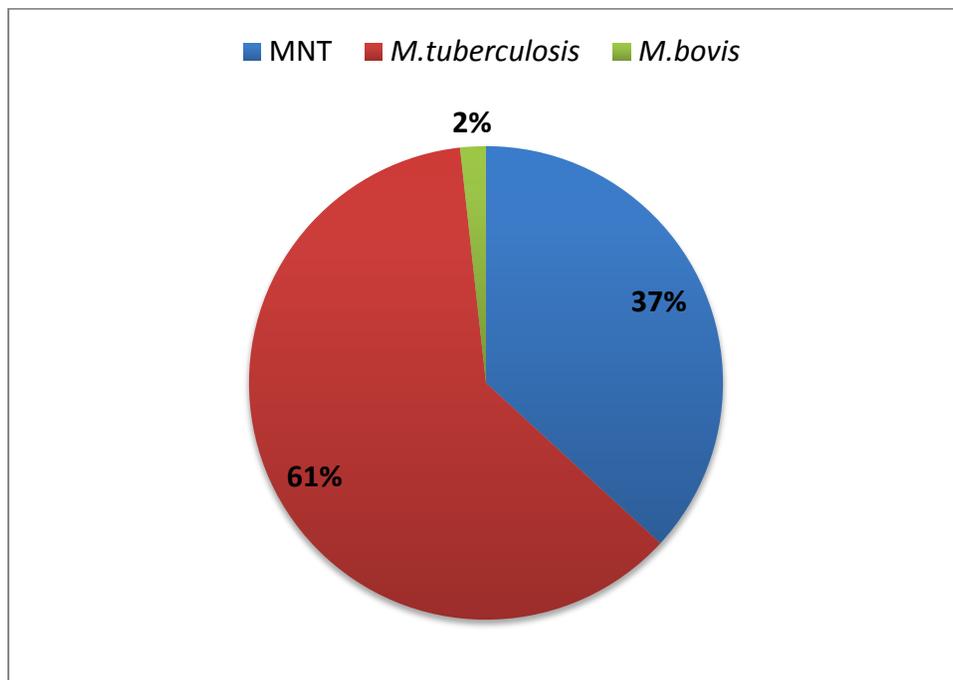


Figura 11. Diferenciación a nivel de especie de las cepas

En cuanto al estado inmunológico y el tipo de micobacteria encontrada destacan los resultados de los pacientes con VIH, ya que muestran una relación prácticamente igual entre el número de MNT y CMT encontrados en sus muestras. Estos datos reafirman lo comentado en el planteamiento de este protocolo, que indica que los pacientes VIH son infectados de manera similar por los dos grupos micobacterianos (Figuras 12 y 13)

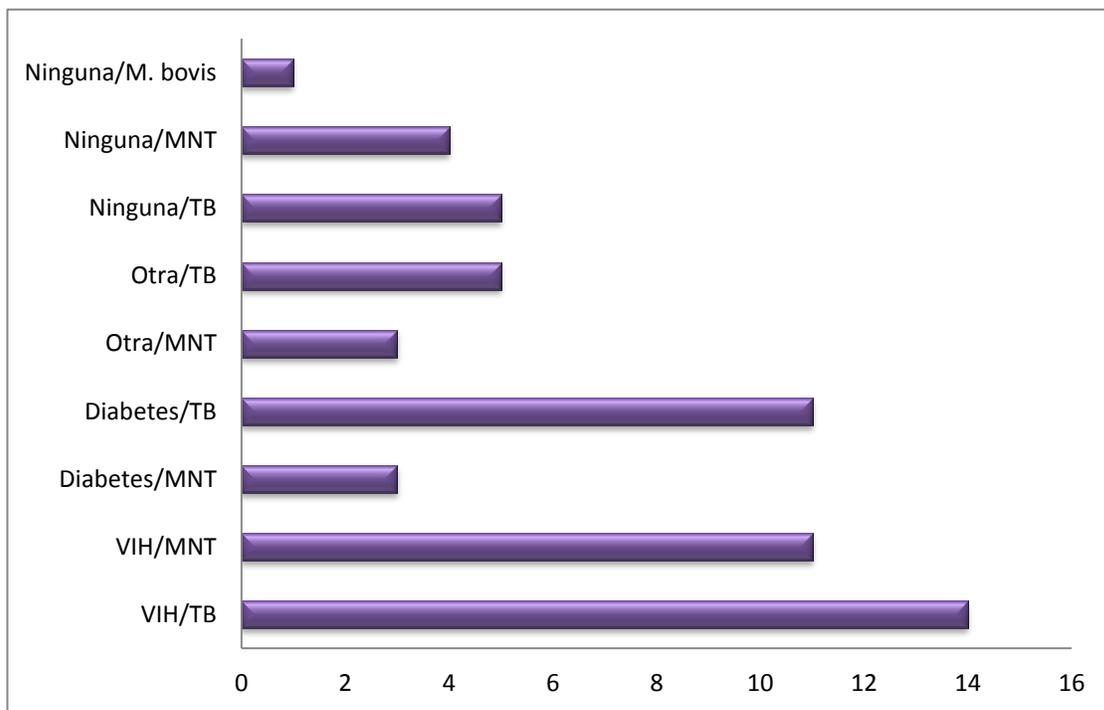


Figura 12. Relación de la inmunosupresión del paciente con el tipo de micobacteria identificado.

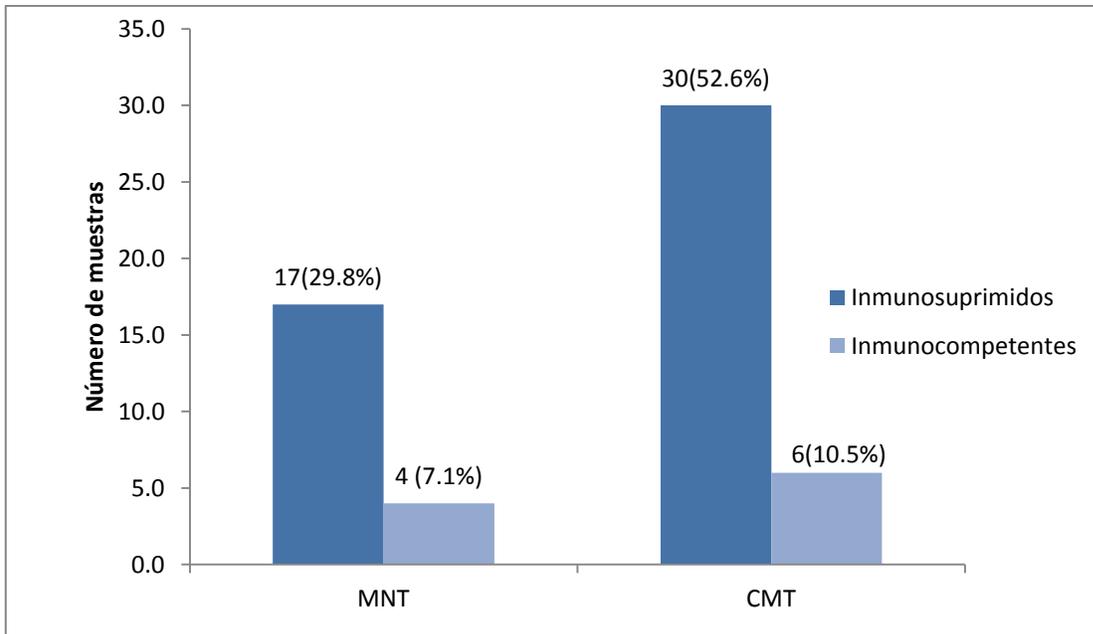


Figura 13. Relación estado inmunológico del paciente-grupo micobacteriano detectado.

Los casos de TB pulmonar en este estudio resultaron encontrarse casi en su totalidad en pacientes inmunosuprimidos; para el caso de la TB extrapulmonar se encontró una frecuencia similar entre pacientes inmunosuprimidos e inmunocomprometidos. (Figura 14).

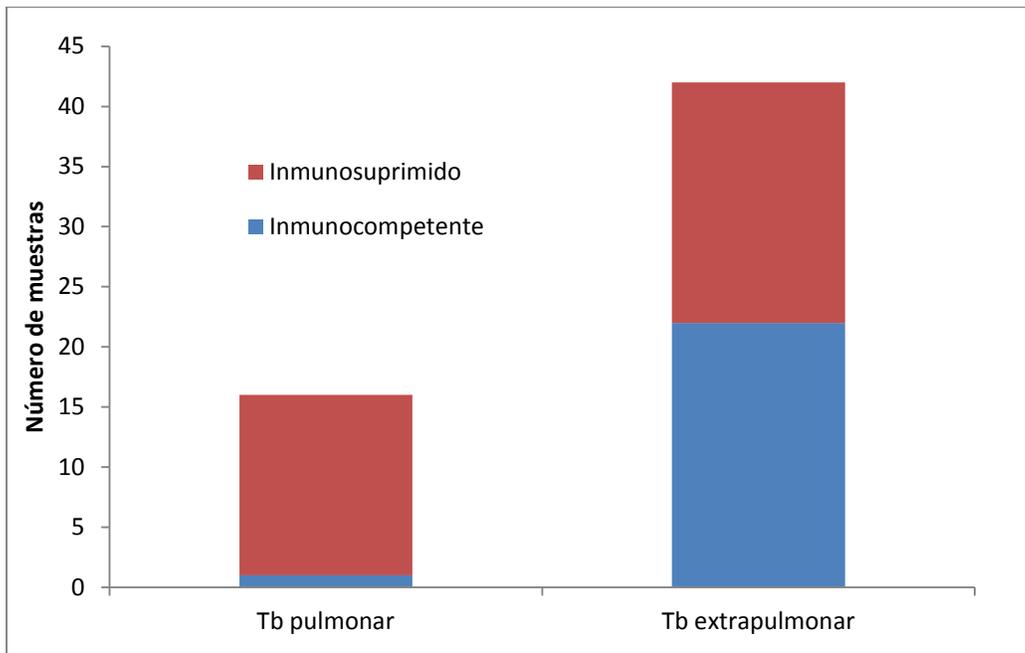


Figura 14. Relación entre el estado inmunológico del paciente y la localización de la tuberculosis

6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Comúnmente en el Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” ISSSTE los pacientes que son diagnosticados con una baciloscopía o cultivo positivo son inmediatamente tratados con medicamentos para una TB originada por *Mycobacterium tuberculosis*. El medicamento indicado por los médicos es el RIFATER® o DOTBAL®, (el primero incluye la Rifampicina, Isoniacida, Pirazinamida, en una sola tableta y el segundo además de las anteriores incluye al Etambutol). Como se mencionó anteriormente este tratamiento es eficiente cuando la micobacteria que se combate es perteneciente al CMT, sin embargo si la micobacteriosis es causada por una MNT, este esquema terapéutico será ineficiente y adicionalmente resulta ser más agresivo para el paciente. En este estudio detectamos que un 37% de las cepas estudiadas resultaron ser MNT (Figura 11), porcentaje importante considerando que el tratamiento inmediato que se les dio a estos pacientes fue inadecuado.

La frecuencia de las MNT en pacientes inmunocomprometidos en esta investigación resulta ser importante y particularmente alta (29.8%) (Figura 13) al compararlos con estudios epidemiológicos similares. Tal es el caso del trabajo realizado en Bogotá Colombia en 2007²¹ donde encontraron que de un grupo de 92 pacientes con VIH solo el 8.2% de ellos se les detectó MNT, siendo las más frecuentes las pertenecientes al complejo *M. avium*. Este dato resulta ser más elevado en este estudio debido a que también se estimó a los pacientes con Diabetes o con algún otro tipo de inmunosupresión, como la desnutrición o anemia; pero demuestra la importancia de hacer una diferenciación a nivel de especie de las micobacterias para poder proporcionar a estos pacientes un tratamiento adecuado y pronta recuperación.

En México en 2007 se registraron 16,964 casos de tuberculosis en todas sus formas clínicas, con una tasa de 16.03 por cada 100 mil habitantes, en estos casos la mitad no presentaba una enfermedad concuminante no obstante las más frecuentemente asociadas a tuberculosis resultan ser: Diabetes Mellitus con 18%

(35% en mayores de 40 años), desnutrición 11.6% (24% en niños), alcoholismo 6.8% y VIH/SIDA 4%.²²

Estos datos sugieren que en la población mexicana la asociación más común con la TB la tiene la Diabetes Mellitus, seguida de los problemas nutricionales que son tan comunes en el país. Es importante este análisis debido a que en México la Diabetes es uno de los principales problemas de salud, y presenta una tasa de incidencia creciente en los últimos años.²³ Así mismo existen reportes como los de Durson Tatar y colaboradores²⁴ en 2003 que han estudiado la epidemiología existente entre la Diabetes y la TB y han demostrado que la Diabetes Mellitus aumenta el riesgo de padecer tuberculosis de 3 a 7 veces más que en los pacientes no diabéticos y la forma más común es por medio de una reactivación de una TB latente.

Los dos grupos inmunosuprimidos más notables a partir de los resultados obtenidos fueron el VIH y la diabetes (Figura 7). Particularmente se pudo observar que los pacientes diabéticos tienen una mayor predisposición para ser más agredidos por las micobacterias pertenecientes al CMT que por las MNT. De forma diferente los pacientes con VIH, resultan ser infectados casi de manera similar por los dos grupos micobacterianos (Figura 12). Estos resultados destacan la importancia de obtener un adecuado diagnóstico para la enfermedad, el cual incluya la especie micobacteriana, sobre todo en estos pacientes que presentan mayor predisposición a contraer o reactivar la tuberculosis.

En el caso del VIH se ha demostrado que hay una actividad sinergista entre el virus del SIDA y la TB. Es por eso que actualmente se recomienda que los pacientes que son diagnosticados con tuberculosis se realicen una prueba para saber si son VIH positivos.²⁵

También se ha observado que en pacientes que no tienen tan dañado su sistema inmune ($CD4+ > 200/cm^3$) es mucho más común ver casos de TB pulmonar que extrapulmonar.²⁵ En el caso de los resultados obtenidos casi todos los casos de TB pulmonar que se reportan pertenecen a pacientes que tienen algún tipo de

inmunosupresión (Figura 14). Lamentablemente, debido a que el Hospital no realiza el conteo diferencial de linfocitos, un dato comparativo entre los niveles reportados en la literatura y el de los pacientes estudiados no se logró realizar. Sin embargo cuando se realizó el análisis de los expedientes clínicos se encontró que los enfermos de VIH eran catalogados como estadio C3, en algunos casos por estudios externos pagados por el mismo paciente o debido al avanzado deterioro ocasionado por la enfermedad el médico podía obtener la clasificación de manera directa sin la necesidad de estos estudios.

Por otra parte a pesar de que se han publicado trabajos en los que se reconoce una predisposición mayor de los hombres a ser atacados por la tuberculosis⁴ en el grupo de estudio se encontró una tendencia ligeramente diferente, más mujeres enfermas de tuberculosis que hombres (Figura 10), este resultado probablemente es el reflejo de la tendencia de los pacientes inmunosuprimidos en este estudio, ya que los pacientes diabéticos en su mayoría se trataban de mujeres y en estas se ha encontrado que cuando padecen Diabetes Mellitus poseen mayor tendencia a desarrollar tuberculosis que los hombres.²⁴

En la literatura generalmente se encuentra reportado el diagnóstico de la tuberculosis realizado con la tinción de Ziehl –Neelsen; se dice que es el método más empleado en la mayoría de países de escasos recursos por lo barato y fácil de usar, sin embargo su baja sensibilidad es un gran defecto. Se estima que detecta del 30 al 60 % de los casos que resultan con cultivo positivo. El cultivo sigue siendo el mejor método para diagnóstico, sin embargo son necesarias de 3 a 6 semanas para obtener resultados positivos. Las pruebas de diagnóstico para la tuberculosis se han mantenido sin cambios durante casi un siglo, pero las nuevas tecnologías prometen una revolución en el diagnóstico de la tuberculosis.^{26,27}

En los países en desarrollo se ha demostrado que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede usar para amplificar el DNA de *Mycobacterium tuberculosis* y ofrece una posibilidad de resultados sensibles, específicos y rápidos de diagnóstico. En Brasil se realizó un estudio en 2009 que reporta sensibilidades de la PCR que van desde un 75 al 95% y especificidades de un 95%, usando

como estándar de oro el cultivo.²⁷ Así mismo en Kenia en 2003, Kivihya y colaboradores²⁶ realizaron un trabajo similar de detección de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes VIH por medio de la PCR, los autores reportan una sensibilidad del 93% y una especificidad del 84% comparado con el cultivo como estándar; adicionalmente se reporta que el estatus del VIH no afecta la sensibilidad de la prueba, ya que por su alta sensibilidad no importa en qué momento se tome la muestra, factor que sí influye en el ZN, en el cual se prefiere que las muestras, cuando son pulmonares, se tomen a primera hora por la mañana.

Las nuevas técnicas son muy necesarias, y los análisis moleculares de amplificación como la PCR han demostrado ser alternativas prometedoras, incluso para los países en vías de desarrollo. La PCR tiene el potencial de ser una alternativa rentable. Si el diagnóstico se puede establecer más rápido, y adicionalmente el proceso se hace menos complicado para el laboratorio, la PCR puede reducir la demora tanto en el diagnóstico y en el inicio del tratamiento.

Por otra parte la implementación de este tipo de diagnóstico, en un hospital donde hay gran prevalencia de tuberculosis y VIH, además de un creciente número de casos de diabetes, será de gran ayuda para el laboratorio de Bacteriología; ya que les permitirá hacer un análisis más certero y de forma más oportuna.

El ISSSTE al ser una institución gubernamental, financia el tratamiento de cada derechohabiente; como parte de las ventajas que se obtienen al dar un adecuado diagnóstico de la tuberculosis que incluya la especie micobacteriana, se proporciona al paciente el tratamiento correcto para su enfermedad evitando gastos innecesarios en medicamentos no indicados, evitándole su toxicidad. Otras ventajas son disminuir la posible aparición de cepas resistentes, ahorro de recursos al instituto en pruebas de gabinete e incapacidades y finalmente y lo más importante se promueve una pronta reincorporación del paciente a su vida social y laboral.

7.- CONCLUSIONES

- Los resultados de este trabajo muestran que en pacientes que tienen comprometido su sistema inmune se pueden presentar casos de tuberculosis causada por micobacterias pertenecientes al complejo CMT y micobacteriosis causadas por micobacterias no tuberculosas. De igual forma pasa con los pacientes inmunocompetentes, aunque en estos es más común la infección por las micobacterias pertenecientes al CMT que por las micobacterias no tuberculosas (MNT)
- Las MNT tienen un tratamiento diferente a las pertenecientes al CMT, por lo que una diferenciación a nivel de especie es sumamente importante.
- Como se esperaba por lo reportado en otros trabajos los grupos más susceptibles dentro de los inmunodeprimidos son los VIH positivos y los diabéticos. En el presente estudio el mayor número de muestras de pacientes inmunosuprimidos la aportaron los diabéticos debido a que la incidencia de diabetes en el país es más alta que la de VIH.
- En el Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” anclado en la zona oriente de de la Cd de México encontramos un alto porcentaje de MNT (37%) contra un 63% de micobacterias del CMT; sin embargo, inicialmente el tratamiento que se da a todos los pacientes es para el CMT, lo que redundaría en falla terapéutica que muchas veces lleva a la muerte del paciente. Con la identificación de la especie de una manera temprana se cambia el tratamiento, lo que significa que cada paciente tiene un tratamiento individualizado administrándosele la terapia adecuada en un lapso de tiempo más corto, lo que evita daños colaterales como son la hepatotoxicidad, además se ahorra en fármacos, estudios de gabinete,

tiempo estancia hospitalaria, pago de incapacidades y el paciente se reintegra rápidamente a sus actividades laborales; además con el tratamiento oportuno se evita la diseminación de nuevos casos de tuberculosis.

8. – BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Global Tuberculosis control report. 2010.
2. Aaron et al. "Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review"(2004) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 10: 388–398.
3. CDC, Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Facilities. (1994)
4. Caminero Luna "Tuberculosis para médicos especialistas". Unión internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias (UICter). Francia (2003)
5. OPS. Guía Clínica. Coinfección VIH/TB. Biblioteca Sede OPS. USA 2010
6. Brosh et al. "A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex" (2002) Evolution vol 99. No.6 3684-3689
7. Koneman –Winn "Diagnostico Microbiológico" 6ta edición. Médica Panamericana (2008).
8. Murray. "Microbiología médica"5ª. Edición. Elsevier España (2007)
9. Nunn et al. "Tuberculosis control in the era of HIV"(2005) Nature reviews Immunology. Vol 5: 819-826.
10. Primm et al. "Health Impacts of Environmental *Mycobacteria*"(2004) Clinical microbiology reviews Vol. 17, No.1 98–106

11. Horsburgh RC, et al "Disseminated *Mycobacterium Avium* Complex disease among patients infected with Human Immunodeficiency Virus, 1985-2000" (2001) *Infectious Diseases* 33: 1938-1943.
12. Hass, W.D *Mycobacterium tuberculosis* in Mandell, L.G; J.E Bennett and R. Dolin (Eds). Vol. 2. Principles and practices of Infectious disease. 5th edition. (2000) Health Science Company Phyladelphia Pennsylvania
13. Cobos-Marin et al "A novel multiplex-PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* in clinical isolates of both veterinary and human origin"(2003) *Epidemiol. Infect.*130, 485–490
14. González y Merchand et al "The rRNA operons of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* :comparison of promoter elements and of neighbouring upstream genes" (1996) *Microbiology* , 142,667-674
15. Kirschner P. et al "Genotypic identification of *mycobacteria* by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory" (1993) *Journal of Clinical Microbiology*. November; 31(11): 2882–2889.
16. González y Merchand et al "Strategies Used by Pathogenic and Nonpathogenic *Mycobacteria* To Synthesize rRNA"(1997) *Journal of bacteriology*. Vol. 179, No. 22 6949–6958
17. Kempell et al "The nucleotide sequence of the promoter, 16s rRNA and spacer region of the ribosomal RNA operon of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with *Mycobacterium leprae* precursor rRNA" (1992), *Journal of General Microbiology*. 138, 1717-1727

18. Behr MA et al “Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray” (1999) *Science*. May 28; 284:1520-1523
19. Gordon SV et al “New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv” (1999) *Microbiology* Apr; 145:881-892.
20. Perez-Martinez Iza et al,” A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact”. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27(2008),:451-459.
21. Murcia MI. et al “Mycobacteria-HIV/AIDS association in patients attending a teaching-hospital in Bogotá, Colombia”(2007) *Rev Salud Pública (Bogota)*. Jan-Mar;9(1):97-105
22. SSA. Subsecretaria de prevención y promoción de la salud “Programa de acción específico 2007-2012: Tuberculosis” (2008),17-25
23. Ponce de León et al. “Tuberculosis and diabetes in southern Mexico” (2004) *Diabetes Care*. Jul; 27(7):1584-1590
24. Durson Tatar et al “Tuberculosis in diabetics Features in the endemic area” (2009) *Infectious Diseases* 62: 423-427.
25. Sharma SK et al “HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management” (2005) *Indian J Med Res* 121, pp 550-567
26. Kivihya Lydia, et al “Comparison of PCR with the Routine Procedure for Diagnosis of Tuberculosis in a Population with High Prevalences of Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus”(2004) *Journal of clinical microbiology* Vol 42:p. 1012–1015

27. Scherer Luciene et al "Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis" (2009) BMC Infectious Diseases, 9:216