



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS A TRAVÉS DE LA SECUENCIACIÓN DE 16S RRNA, *HSP65*, *RPOB* Y *SODA* EN MUESTRAS DE TEJIDO DE LESIONES EMBEBIDAS EN PARAFINA CON HALLAZGOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS SUGERENTES DE MICOBACTERIOSIS ATÍPICA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA

PRESENTA:

FERNANDO LÓPEZ VÁZQUEZ

TUTORES PRINCIPALES:

DR. ROBERTO ARENAS GUZMÁN
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



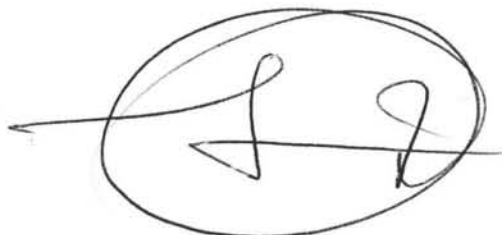
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

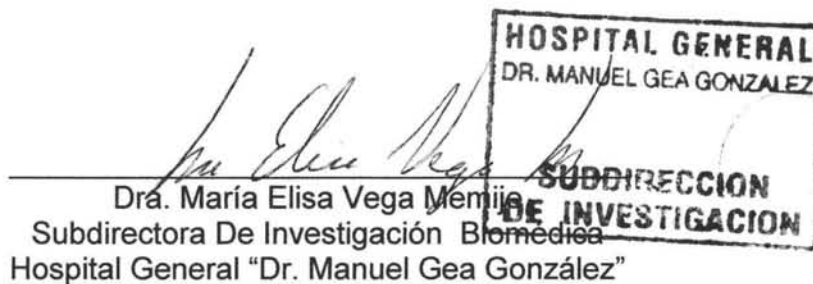
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

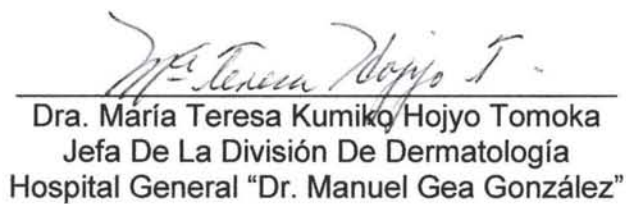
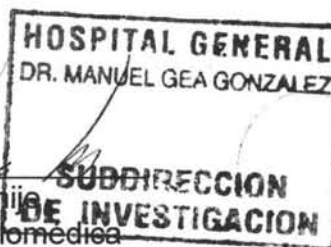
Autorizaciones



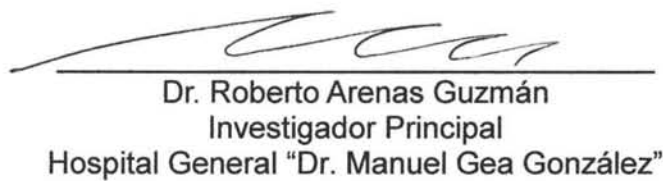
Dr. Octavio Sierra Martínez
Director De Enseñanza E Investigación
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dra. María Elisa Vega Memije
Subdirectora De Investigación Biomédica
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"




Dra. María Teresa Kumiko Hojyo Tomoka
Jefa De La División De Dermatología
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dr. Roberto Arenas Guzmán
Investigador Principal
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Este trabajo de tesis con **No. 06-29-2012** presentado por el alumno Fernando López Vázquez se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis **Dr. Roberto Arenas Guzmán**, con fecha Julio 2016 para su impresión final.



Dra. María Elisa Vega Memije
Subdirectora De Investigación Biomédica
Hospital General "Dr. Manuel Gea
González"



Dr. Roberto Arenas Guzmán
Investigador Principal
Hospital General "Dr. Manuel Gea
González"

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “**Dr. Manuel Gea González**” en el servicio de Dermatología bajo la dirección del Dr. Roberto Arenas Guzmán con el apoyo del Dr. Rigoberto Hernández Castro y la Dra. Sonia Toussaint Caire.

Agradecimientos

A mis padres y hermana que me apoyaron desde el principio de este largo viaje y que siempre alentaron en mi el espíritu y la vocación de un médico.

A Carolina el amor de mi vida, por acompañarme en este largo camino, y ayudarme a superar cada prueba, con paciencia y sabiduría.

A mis tutores, que me guiaron para completar esta difícil pero gratificante tarea.

Al hospital general “Dr. Manuel Gea González” y al servicio de Dermatología sede de la cual egreso con orgullo.

RESUMEN DE TESIS

Titulo: Identificación de micobacterias no tuberculosas a través de la secuenciación de 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* y *sodA* en muestras de tejido de lesiones embebidas en parafina con hallazgos clínicos e histológicos sugerentes de micobacteriosis atípica.

Dr. Fernando López, Dr. Rigoberto Hernández, Dra. Sonia Toussaint, Dr. Roberto Arenas

Antecedentes: Existen alrededor de 142 especies de Micobacterias no tuberculosas (MNT) de las cuales aproximadamente la mitad son consideradas como una fuente potencial de enfermedad para el ser humano. Son ubicuas en la naturaleza y se han aislado de fuentes tan diversas como suelo, polvo, agua, leche y animales.

Objetivo: Identificación de las MNT en muestras embebidas en parafina de lesiones de piel con un cuadro clínico e histopatológico sugerente de micobacteriosis atípica a través de la secuenciación del gen de la subunidad 16S rRNA.

Materiales y método: Se tomaron bloques de parafina de pacientes con diagnóstico clínico y patrón histopatológico sugerente de micobacteriosis del Hospital General "Dr. Manuel Gea González desde enero del 2001 a junio del 2016. Se extrajo el ADN de las muestras y se amplificó el gen de la subunidad 16S rRNA por reacción de cadena de polimerasa (PCR), se realizó secuenciación, la cual fue sometida a la base de datos del GenBank para buscar homologías mediante el sistema BLASTN y determinar género y especie.

Resultados: Se realizó la PCR de la 16S rRNA en 61 muestras. De estas, 14 fueron negativas para cualquier tipo de micobacteria, 12 muestras (26%) se identificaron como *M. tuberculosis* complex, y 36 muestras correspondieron a diferentes especies de MNT, siendo las más frecuentes. *M. abscessus* 19% (N=9), *M. massiliense* 17% (N=8), *M. fortuitum* 13%(N=6). El patrón histológico más frecuente corresponde al granuloma supurativo en 38% (N=18), y reacción granulomatosa inespecífica en 23% (N=11). La localización más frecuente fue en miembros superiores en 31% (N=15), seguido de cabeza y cuello en 19% (N=9) y miembros pélvicos en 17% (N=8). Las variedades clínicas observadas en orden de frecuencia fueron placa verrugosa 27% (N=13), abscesos 19% (N=9), lupus-like 15% (N=7), nodular diseminada 12% (N=6), paniculitis 10% (N=5), esporotricoides 8% (N=4) y ulcerosa 6% (N=3).

Conclusión: Se plantea el uso de la PCR en forma rutinaria para el diagnóstico de micobacteriosis atípica en sospecha clínica e histopatológica de micobacteriosis cutánea. Este estudio refuerza la utilidad de la secuenciación del gen 16S rRNA para la identificación de MNT.

Introducción

Las micobacterias son bacterias aerobias en forma de bastón, aparecen ligeramente curvadas y miden de 2 a 4 μm de largo y 0.2 a 0.5 μm de ancho.¹ Estos organismos no forman esporas, son inmóviles, resisten a la decoloración con ácido o alcohol, son de crecimiento lento y poseen un genoma con alto contenido de guanina y citosina (61 – 71%) en su DNA.²

Existen alrededor de 142 especies de MNT de las cuales aproximadamente la mitad son consideradas como una fuente potencial de enfermedad para el ser humano.^{1,3} El agua potable es considerado el mayor reservorio para las MNT.^{4,5,1}

Tradicionalmente las MNT han sido divididas en diferentes grupos basados en la morfología de las colonias, la velocidad de crecimiento y pigmentación, factores que se consideran en el sistema de clasificación de Runyon, descrito en 1959 (Tabla 1).^{6,1}

A. Crecimiento lento	
I. Fotocromógenas Producen cristales amarillos por exposición a la luz.	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. simiae</i>
II. Escotocromógenas Desarrollan un pigmento amarillo brillante, en la luz y en la oscuridad.	<i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. szulgai</i>
III. No cromógenas No producen pigmento o producen una pequeña cantidad de pigmento amarillo pálido. Expuestas a la luz brillante no intensifican su coloración.	<i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. shimodei</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. nonchromogenicum</i>
B. Crecimiento rápido	
IV. No cromógenas	<i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. neoaurum</i> , <i>M. vaccae</i> , <i>M. pheli</i> , <i>M. thermoristibile</i> , <i>M. canariense</i> , <i>M. cosmeticum</i> , <i>M. monacense</i> , <i>M. psychrotolerans</i>
Modificado de Arenas R. Micobacteriosis atípicas. En: Arenas R. Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento. 4ta. ed. México: Mc Graw Hill; 2009, p.395-397.	

En México existe poca información acerca de la epidemiología molecular de las especies de micobacterias. En 2009, Alvarado-Esquivel, *et al.*, reportaron su experiencia con el estudio a través de métodos moleculares para determinar las especies de micobacterias presentes en 30 cultivos de éstas y 42 muestras de tejido embebido en parafina.⁷ De los 72 extractos de DNA encontraron positividad en 26 (36.1%) y 23 (31.9%) para especies de micobacterias por PCR o ensayo por sonda lineal, respectivamente. Se encontraron a *M. tuberculosis complex* y *M. genus* en ganglios linfáticos; *M. genus* en muestras de cerebro y vagina, *M. tuberculosis* en líquido sinovial. Se aisló *M. gordonae*, *M. smegmatis*, *M. kansasii*, *M. genus*, *M. fortuitum/M. peregrinum* y *M. tuberculosis* en orina. *M. chelonae/M. abscessus* se encontraron en líquido pericárdico y *M. kansasii* en aspirado gástrico.

La enfermedad ocurre usualmente en pacientes con enfermedad pulmonar previa o con condiciones de inmunodepresión.⁸ En el caso particular de las infecciones por MNT en piel o articulaciones, en pacientes sin inmunodeficiencias es frecuente encontrar el antecedente de traumatismos o inyecciones de esteroides; lo cual no se reporta en pacientes con deterioro de la inmunidad.⁹ (Tabla 2)

Tabla 2. Principales micobacterias ambientales que pueden causar enfermedad en seres humanos	
Especies	Principales sitios de infección
<i>M. avium</i> ^a	Pulmonar
<i>M. intracellulare</i>	Ganglios linfáticos
<i>M. scrofulaceum</i>	Pulmonar, Ganglios linfáticos
<i>M. kansasii</i>	Pulmonar
<i>M. xenopi</i>	Pulmonar
<i>M. malmoense</i>	Pulmonar
<i>M. fortuitum</i>	Tejidos blandos/heridas quirúrgicas
<i>M. chelonae</i>	Tejidos blandos/heridas quirúrgicas
<i>M. ulcerans</i>	Tejidos blandos
<i>M. marinum</i>	Tejidos blandos/heridas quirúrgicas
^a El complejo de <i>M. aviumintracellulare</i> (MAC), también es conocido como <i>M. aviumintracellulare</i> <i>scrofulaceum</i> (MAIS).	
Tomado de Davies, PDO. The mycobacterioses. <i>Imaging</i> 2008; 20 :252–263.	

El estudio histológico convencional es de utilidad ya que permite una estrategia rápida de aproximación diagnóstica de micobacteriosis. Sin embargo, frecuentemente carece de datos característicos durante los tres primeros meses,¹⁰ la sensibilidad de la microscopía se ha calculado en 22-65%.¹¹ Se ha reportado la presencia granulomas supurativos, tuberculoideos, sarcoidales y similares a nódulos reumatoideos. Un granuloma se define como la colección de histiocitos, usualmente epitelioides. Existen varios tipos de granulomas. (Fig. 1)

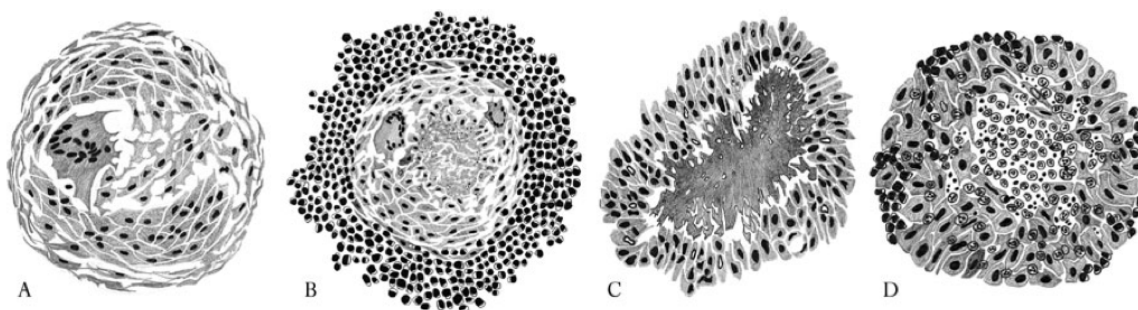


Fig. 1. Patrones de inflamación granulomatosa. A. Granuloma sarcoidal. B. Granuloma tuberculoide. C. Granuloma en empalizada. D. Granuloma supurativo. Un quinto patrón es el granuloma intersticial¹².

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA en particular. El fragmento que se amplifica, una vez secuenciado permite identificar organismos a nivel de género y de especie.¹³ La subunidad de la 16S rRNA es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 bp, a partir de cuya secuencia se puede

obtener información filogenética y taxonómica. Es el más utilizado para la identificación de especies, cuenta con más de 90.000 secuencias de numerosos géneros bacterianos en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).¹⁴ No existen guías que regulen los parámetros al comparar la similitud de secuencias para la identificación bacteriana a partir de la subunidad 16S rRNA. Se ha propuesto un nivel de semejanza de 97% para determinar la especie bacteriana.¹⁵

El objetivo de este estudio fue realizar la identificación molecular de las MNT de muestras embebidas en parafina a través de la secuenciación del gen de la subunidad 16S rRNA, que contaran con datos clínicos e histológicos compatibles con micobacteriosis atípica del Hospital General Manuel Gea González.

Material y Método

Se realizó un estudio descriptivo, observacional, abierto, retrospectivo y transversal. Se estudiaron muestras de tejidos incluidos en bloques de parafina de pacientes con hallazgos clínicos e histopatológicos sugerentes de micobacteriosis atípica de la División de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" desde Enero de 2000 hasta junio del 2016. Se incluyeron muestras que tuvieran suficiente material para las pruebas moleculares.

Se realizó el pretratamiento de desparafinización colocando una pequeña sección (20 mg) de tejido embebido en parafina en un tubo de 2 ml y mediante la utilización de xilol y alcohol fue desparafinado. La extracción de ADN se realizó utilizando el sistema comercial DNeasyBlood and Tissue (Qiagen, Ventura, CA. USA). Brevemente, al tejido sin parafina y seco se le agregó buffer de lisis y proteinasa K (20 µg/ml) y se incubó a 56°C por 12 h.

Posteriormente para purificar el ADN, la mezcla de lisis fue colocarla en una columna de afinidad y centrifugar a 8 mil rpm durante 1 min. La columna que contiene el ADN fue lavada y centrifugado a 13 mil rpm durante 1 min. El ADN se obtuvo al colocar 50 µl de agua estéril en la columna y centrifugar a 13 mil rpm durante 1 min.

El ADN fue visualizado en el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para determinar su pureza, concentración e integridad. Posteriormente la concentración de DNA fue determinada utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta de 260 nm-280 nm y se utilizaron 100 ng de ADN total para amplificar el gen de la subunidad 16S rRNA. Finalmente al ADN fue almacenado a 4°C hasta su uso.

Amplificación de la subunidad 16S rRNA: Se amplificó un producto de 1120 pbutilizando los iniciadores fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de amplificación inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de

35 ciclos de amplificación a 96°C por 30 segundos, alineación a 70°C por 1 minuto y extensión a 72°C por un minuto, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos.¹⁶

Los productos de amplificación se purificaron con el sistema comercial Gelextracción kit (Qiagen, La Jolla, CA. USA) para su secuenciación en ambas direcciones mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing, en el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. La secuencia completa de nucleótidos se comparó con la base de datos del GenBank para determinar su homología mediante el sistema nucleotide Blast del National Center of Biotechnology Information (NCBI) para la identificación de cada microorganismo evaluado.

Resultados

Se realizó la extracción de ADN total de 61 muestras (N=61) (Fig. 2a). En 47 muestras se amplificó un producto de 1200 pb aproximadamente (Fig. 2b). Los 47 productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambos sentidos y se obtuvo una secuencia consenso (Fig. 2c). La secuencia de nucleótidos fue sometida a la base de datos del GenBank y se encontraron homologías en todas las secuencias comparadas con el sistema BLASTN.

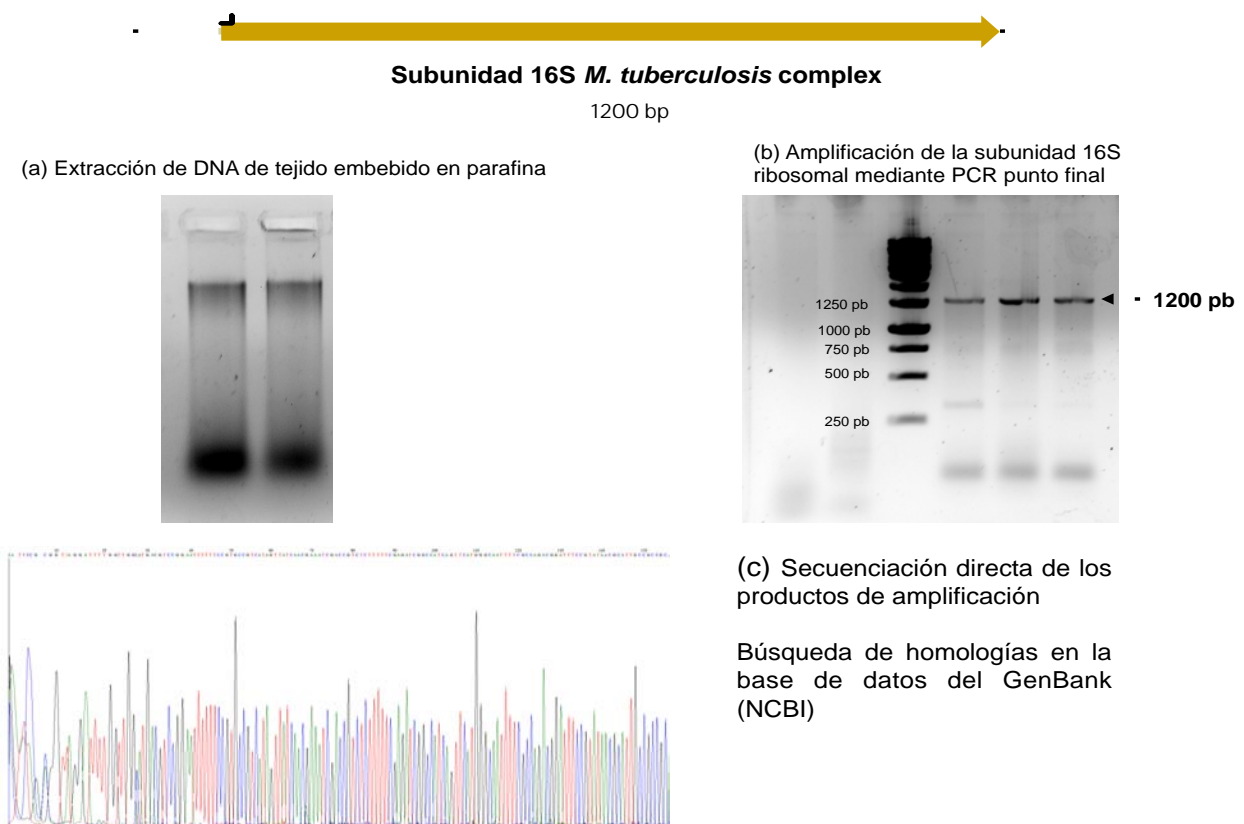
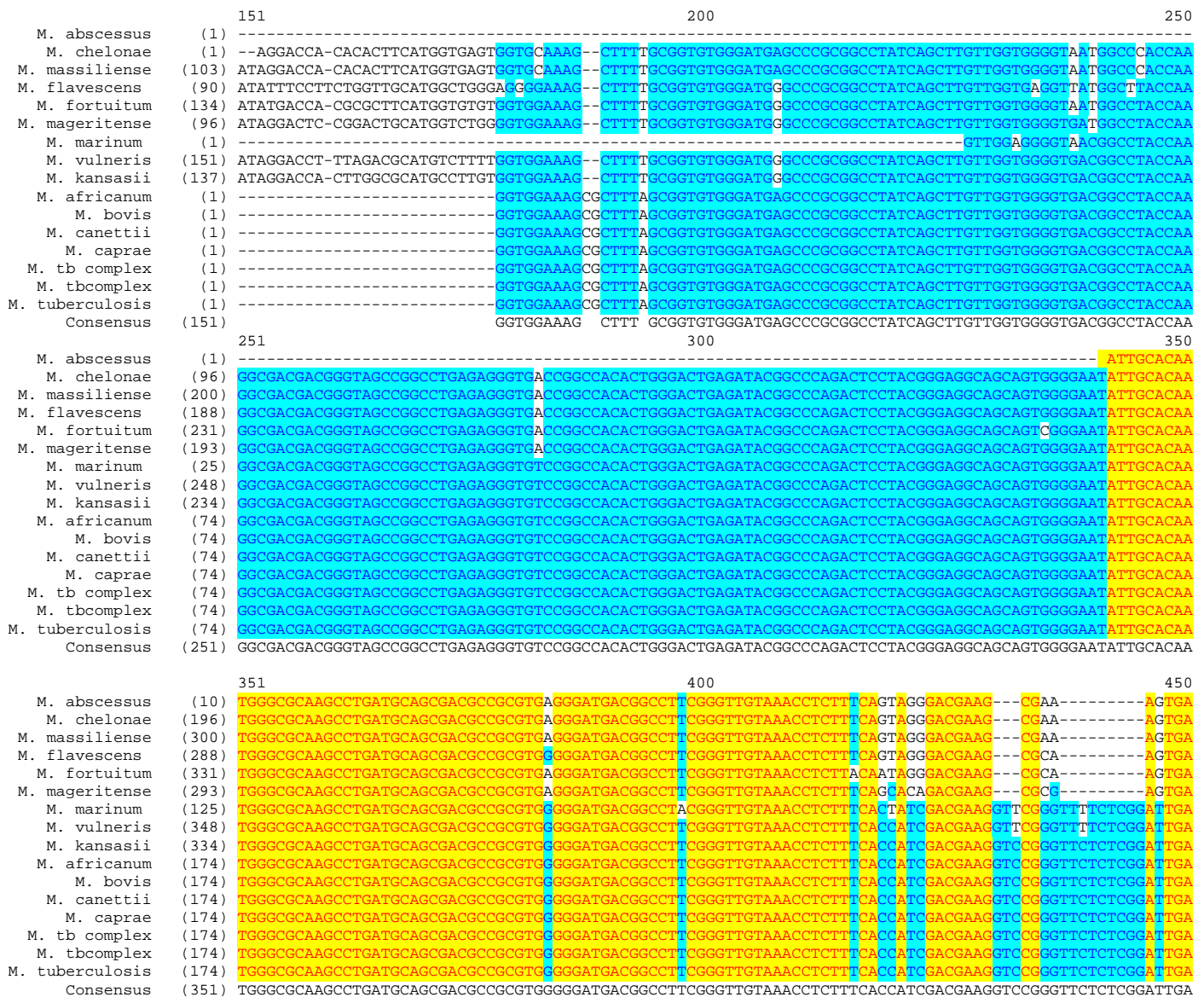


Fig. (2) proceso de identificación mediante PCR del gen 16s. (a) extracción de DNA total, (b) amplificación de la subunidad 16S mediante PCR en gel de agarosa, carril 3 marcador de peso molecular 1200 pb, carril 4 - 6 muestras positivas para micobacterias a 1200 pb aproximadamente. (c) secuencia de nucleótidos.

Una vez realizada la búsqueda de homologías, se alinearon las secuencias por medio del programa vector NTI, para encontrar las diferencias nucleotídicas en las regiones variables del gen 16SrRNA de las muestras analizadas (Fig. 3). Para la visualización gráfica de los resultados obtenidos en la secuencias se utilizó el programa TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). En el cual se observa el brazo principal comprendido por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. tbcomplex* (muestra clínica), *yM. tbcomplex* (muestra clínica). Se observa estrecha relación de *M. kansasii* con el brazo principal por una diferencia de 6 nucleótidos en el alineamiento. Las micobacterias más alejadas de *M. tuberculosis* son *M. fortuitum*, *M. massiliense*, *M. chelonae*, con diferencia de al menos 50 nucleótidos en las regiones variables de la secuencia del gen 16SrRNA (Fig. 4).



M. flavescens	(1276)	TTC-----
M. fortuitum	(1115)	-----
M. mageritense	(1141)	-----
M. marinum	(1007)	-----
M. vulneris	(1201)	-----
M. kansasii	(1261)	-----
M. africanum	(1173)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
M. bovis	(1173)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
M. canettii	(1173)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
M. caprae	(1173)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
M. tb complex	(1173)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
M. tbcomplex	(1173)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
M. tuberculosis	(1173)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
Consensus	(1351)	TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC

Fig. (3) alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la subunidad 16S rRNA, de diferentes especies de *Mycobacterium*, mediante el método del vecino más cercano “neighbourJoining” con el programa vector NTI. Bloques amarillos (regiones conservadas), bloques azules (regiones variables). Fila inferior correspondiente a secuencia consenso.

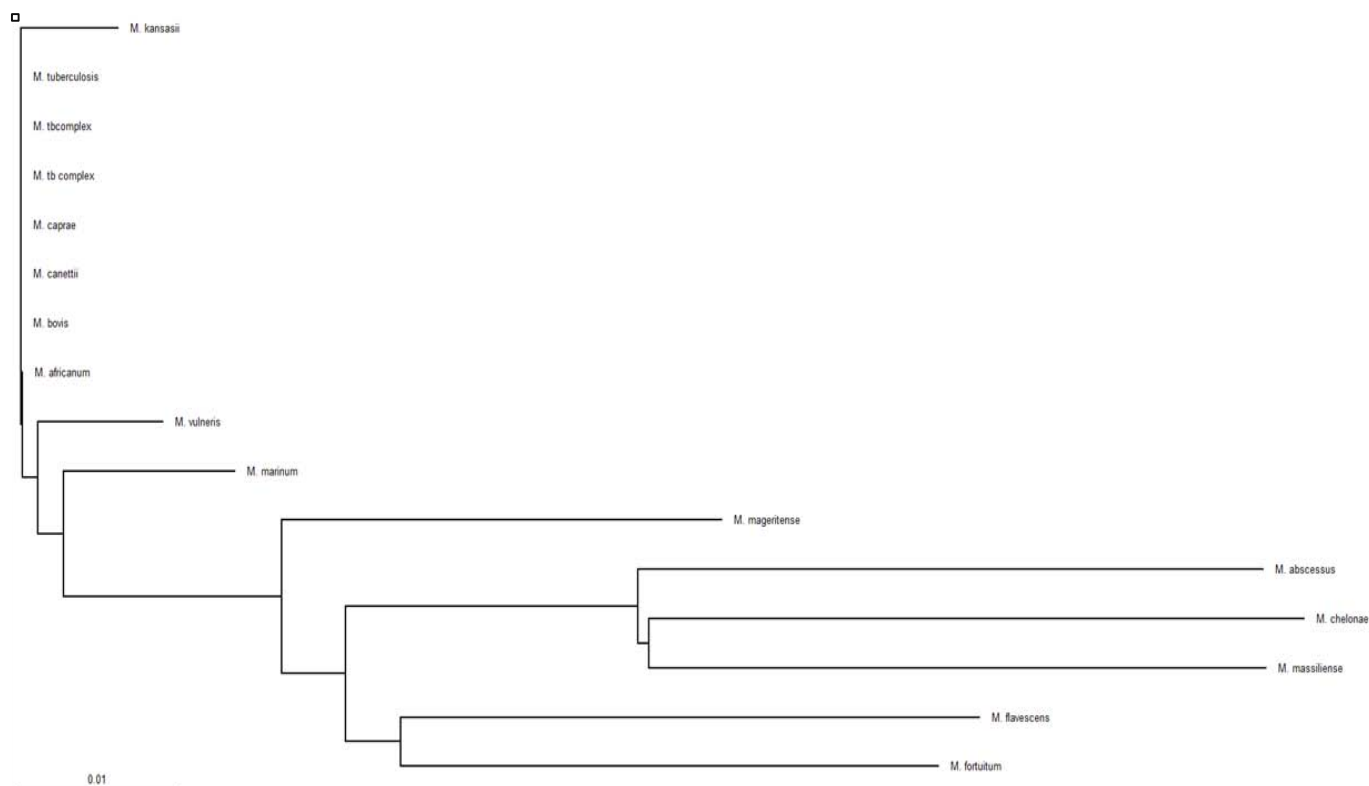


Fig. (4) Árbol filogenético (filograma) de las secuencias de nucleótidos de especies encontradas del género *Mycobacterium*, utilizando el gen de la subunidad 16S rRNA ribosomal. La raíz del árbol pertenece a la secuencia de *M. tuberculosis*.

De las 61 muestras analizadas por PCR, 14 fueron negativas para el género *Mycobacterium*, se identificó *M. tbcomplex* en el 26% (N=12), las otras especies de micobacterias identificadas fueron *M. abscessus* 19% (N=9), *M. massiliense* 17% (N=8), *M. fortuitum* 13% (N=6), *M. chelonae* 8.5% (N=4), *M. flavescens* y *M. mageritense* 4% (N=2) respectivamente, *M. marinum*, *M. vulneris*, *M. fuerthensis*, *M. kansasii* se identificaron en 1 muestra correspondiente al 2% respectivamente. En una de las muestras (Gea716-09), se identificaron 2 micobacterias (*M. tbcomplex* y *M. abscessus*).

El análisis de los datos clínicos reveló que la edad mínima fue 12 años y máxima de 93 años, con una media de 38 años, el 49%(N=23) se presentó entre la segunda y tercera década de la vida. La localización más frecuente corresponde a miembros torácicos en 31%(N=15), cabeza y cuello en 19%(N=9), miembros pélvicos en 17%(N=8) y abdomen en 10%(N=5). El tiempo de evolución de la dermatosis varía desde una semana hasta 15 años. Las variedades clínicas observadas en orden de frecuencia fueron placa verrugosa 27% (N=13), abscesos 19% (N=9), lupus-like 15% (N=7), nodular diseminada 12% (N=6), paniculitis 10% (N=5), esporotricoides 8% (N=4) y ulcerosa 6% (N=3).

El patrón histológico más frecuentemente encontrado corresponde al granuloma supurativo en 38% (N=18), seguido de la reacción granulomatosa inespecífica en 23% (N=11), un patrón mixto en 10% y tuberculoides en 8.5% (N=4), también se observaron paniculitis, alopecia cicatrizal y cicatriz.

Discusión

Este estudio contiene una de las muestras más grandes de MNT en los últimos años en nuestro país y es el más grande realizado en lesiones de piel en México hasta la fecha. Se obtuvieron datos epidemiológicos importantes, a partir de técnicas moleculares que permiten identificar el género y la especie. En México son escasos los estudios en los cuales se ha utilizado la identificación molecular de MNT. Recientemente se utilizó este método para identificar MNT en vegetales listos para comer (Ready-to-eat) y agua potable en la ciudad de México.^{17,18} El uso de marcadores genéticos en bacterias tales como 16S, *hsp65*, *sodA* y *rpoB*, para su identificación ha ganado terreno en los últimos años y es la secuencia 16S ribosomal una de las más comúnmente utilizadas para la identificación de las especies de MNT ya que es altamente específica y sensible detectando incluso muestras con ADN escaso.¹⁹ En este estudio se observó viabilidad para realizar PCR de MNT en muestras de tejido embebidas en parafina de hasta con 10 años de antigüedad, otros estudios han demostrado la alta sensibilidad y especificidad de PCR en este tipo de muestras.

Es importante destacar que a diferencia de la enfermedad pulmonar en donde el grupo *M. avium* complex (MAC) es el más prevalente.^{21,25} en nuestro estudio realizado en muestras de piel embebidas en parafina no se identificó este microorganismo. Aunque no era el objetivo de este estudio, la micobacteria principalmente identificada fue *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) grupo al cual recientemente se agregaron *M. canettii*, y *M. caprae*.^{22,23} Esto resalta la importancia epidemiológica de las micobacterias, ya que México permanece como un país con alta prevalencia en tuberculosis.²³

En nuestro país se han observado todas las formas clínicas y aislado gran parte de las MNT patógenas; Sin embargo; en este estudio se identificaron MNT rara vez reportadas, tal es el caso de *M.*

fuert (*fuertensis*) encontrado en una paciente que presentó abscesos posterior a aplicación de mesoterapia, esta micobacteria fue descrita recientemente como idéntica a *M. chelonae* que hasta hace poco no se conocía como causante de enfermedad en humanos. *M. chelonae* es una micobacteria de crecimiento rápido que rara vez afecta humanos, se encuentra principalmente en agua corriente y se ha relacionado en múltiples reportes con el uso de terapias alternativas como la mesoterapia.²⁶

Las técnicas moleculares empleadas permiten además identificar subespecies o especies estrechamente relacionadas, tal es el caso de *M. massiliense* la cual se encuentra incluida en el grupo *M. abscessus*,²⁶ pero que su identificación es de relevancia clínica, ya que esta MNT presenta alta susceptibilidad a terapia con claritromicina, piedra angular del tratamiento en casos de micobacterias atípicas a diferencia de *M. abscessus* subsp. *abscessus* que presenta resistencia a este medicamento hasta en el 86% de los casos.²⁷

En la literatura se habla de una estrecha relación entre los estados de inmunosupresión y su asociación con infecciones por MNT, sobre todo en el grupo de pacientes con VIH/SIDA.²⁹ La predisposición en estos pacientes se da por un defecto o desregulación en la inmunidad mediada por células. En las muestras analizadas en este estudio se encontró solo 1 caso de infección HIV/MNT, asociada a *M. massiliense*, que pertenece al grupo de micobacterias de crecimiento rápido (*M. abscessus*, *M. chelonae*, y *M. fortuitum*) que juegan un rol importante en infecciones de piel y catéteres en los pacientes con inmunosupresión.²⁹

Una de las entidades clínicas más reconocidas en la literatura, es el granuloma de las piscinas o granuloma de las peceras; cuyo agente causal es *M. marinum*, esta MNT causa enfermedad sistémica crónica en los peces y accidentalmente infecta humanos, sobre todo trabajadores de acuarios, ya que su aislamiento principal proviene de peces ornamentales.³⁰ En este estudio se identificó únicamente un caso relacionado con esta micobacteria.

Conclusión

Los hallazgos encontrados en este estudio apoyan el uso de PCR en caso de sospecha de micobacteriosis atípica en lesiones de piel como herramienta diagnóstica, esto podría impactar de manera positiva en el tratamiento de pacientes con infección por estos agentes, acortando el tiempo de diagnóstico y para la elección de tratamiento específico cada agente. La secuencia del gen 16S de la subunidad rRNA permite identificar de manera sensible y específica las MNT en muestras embebidas en parafina.

Referencias

1. Brown-Elliott BA, Wallace Jr RJ. Infections caused by nontuberculous mycobacteria. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6ta ed. Philadelphia:Elsevier Churchill Livingstone Inc.;2005, p.2909-2916.
2. Godoy MJ, Orozco L, Hernández C, Da Mata O, De Waard J, González-Rico S. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *RevSoc Ven Microbiol* 2008;**28**:96-104.
3. Gomez NA. Micobacterias no tuberculosas: ¿unainfecciónemergente?.*AnPediatr (Barc)* 2009;**71**:185-188.
4. Galassi L, Donato R, Tortoli E, Burrini D, Santianni D, Dei R. Nontuberculous mycobacteria in hospital water systems: application of HPLC for identification of environmental mycobacteria. *J WaterHealth*. 2003;**1**:133-9.
5. Turenne CY, Thibert L, Williams K, Burdz TV, Cook VJ, Wolfe JN, Cockcroft DW, Kabani A. . *Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobe-positive for *Mycobacterium avium* complex. *Int J SystEvolMicrobiol* 2004;**54**:659-667.
6. Runyon EH. Anonymousmycobacteria in pulmonarydisease. *MedClin North Am* 1959;**43**:273-290.
7. Alvarado-Esquivel C, Garcia-Corral N, Carrero-Dominguez D, Enciso-Moreno JA, Gurrola-Morales T, Portillo-Gomez L, Rossau R, Mijs W. Molecular analysis of *Mycobacterium*isolatesfromextrapulmonaryspecimensobtainedfrompatients in Mexico. *BMC ClinPathol* 2009;**9**:1.
8. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Jr., Winthrop K. An official ATS/ IDSA statement: Diagnosis, treatment and prevention of non-tuberculous mycobacterial diseases. American Thoracic Society Statement. *Am J RespCrit Care Med*. 2007;**175**:367-416.
9. Sanders JW, Walsh AD, Snider RL, Sahn EE. Disseminated*Mycobacteriumscrofulaceum*infection: a potentiallytreatablecomplication of AIDS. *ClinInfectDis* 1995;**20**:549.
10. Witteck A, Ohlschlegel C, Boggian K. Delayed diagnosis of atypical mycobacterial skin and soft tissue infections in non-immunocompromized hosts. *Scand J InfectDis* 2008;**40**:877-880.
11. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnosticmycobacteriologylaboratory. *Eur J ClinMicrobiolInfectDis* 1994;**13**:961-979.
12. Ackerman B, Briggs P, Bravo F. Differential Diagnosis in Dermatopathology III. 3rd ed. Michigan: Lea&Febiger; 1993, p.198-201.

13. Bartlett JM, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol*, 2003;**226**:3-6
14. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004;**17**:840-862.
15. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1994; **44**: 846-849.
16. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991;**173**:697-703.
17. Cerna-Cortes JF, Leon-Montes N, Cortes-Cueto AL, et al. Microbiological Quality of Ready-to-Eat Vegetables Collected in Mexico City: Occurrence of Aerobic-Mesophilic Bacteria, Fecal Coliforms, and Potentially Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria. *BioMed Research International*. 2015;2015:789508. doi:10.1155/2015/789508.
18. Perez-Martinez I, Aguilar-Ayala DA, Fernandez-Rendon E, et al. Occurrence of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria in Mexican household potable water: a pilot study. *BMC Research Notes*. 2013;6:531. doi:10.1186/1756-0500-6-531.
19. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(8):1751-1759.
20. Lee HS, Park KU, Park JO, Chang HE, Song J, Choe G. Rapid, Sensitive, and Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Real-Time PCR on Paraffin-Embedded Human Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*. 2011;13(4):390-394. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.02.004.
21. Andrzejak C, Almeida DV, Tyagi S, Converse PJ, Ammerman NC, Grosset JH. Characterization of Mouse Models of *Mycobacterium avium* Complex Infection and Evaluation of Drug Combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(4):2129-2135. doi:10.1128/AAC.04841-14.
22. De la Fuente J, Díez-Delgado I, Contreras M, et al. Comparative Genomics of Field Isolates of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* Provides Evidence for Possible Correlates with Bacterial Viability and Virulence. Vinetz JM, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(11):e0004232. doi:10.1371/journal.pntd.0004232.
23. Miltgen J, Morillon M, Koeck J-L, et al. Two Cases of Pulmonary Tuberculosis Caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*. *Emerging Infectious Diseases*. 2002;8(11):1350-1352. doi:10.3201/eid0811.020017.
24. Young BN, Rendón A, Rosas-Taraco A, et al. The Effects of Socioeconomic Status, Clinical Factors, and Genetic Ancestry on Pulmonary Tuberculosis Disease in Northeastern Mexico. Mokrousov I, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e94303. doi:10.1371/journal.pone.0094303.

25. Panagiotou M, Papaioannou AI, Kostikas K, et al. The Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria: Data from a General Hospital in Athens, Greece, 2007–2013. *Pulmonary Medicine*. 2014;2014:894976. doi:10.1155/2014/894976.
26. Ivan M, Dancer C, Koehler AP, Hobby M, Lease C. *Mycobacterium chelonae* Abscesses Associated with Biomesotherapy, Australia, 2008. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(9):1493-1495. doi:10.3201/eid1909.120898.
27. Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics*. 2014;15(1):359. doi:10.1186/1471-2164-15-359.
28. Nie W, Duan H, Huang H, Lu Y, Chu N. Species Identification and Clarithromycin Susceptibility Testing of 278 Clinical Nontuberculosis Mycobacterial Isolates. *BioMed Research International*. 2015;2015:506598. doi:10.1155/2015/506598.
29. Henkle E, Winthrop K. Nontuberculous Mycobacterial Infections in Immunosuppressed Hosts. *Clinics in chest medicine*. 2015;36(1):91-99. doi:10.1016/j.ccm.2014.11.002.
30. Slany M, Makovcova J, Jezek P, Bodnarova M, Pavlik I. Relative prevalence of *Mycobacterium marinum* in fish collected from aquaria and natural freshwaters in central Europe. *J Fish Dis*. 2014 Jun;37(6):527-33. doi: 10.1111/jfd.12135. Epub 2013 Aug 16.