



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Determinación de la frecuencia de especies de Micobacterias mediante
PCR (HAIN) en muestras de pacientes de los cuatro hospitales del
Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro
Social**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
JOSÉ ALBERTO VILLAGRÁN GAMA**

ASESORA: Q.F.B. GUADALUPE HERNANDEZ TORRES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación de la frecuencia de especies de micobacterias mediante PCR (HAIN) en muestras de los cuatro hospitales del Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Que presenta el pasante: **José Alberto Villagrán Gama**

Con número de cuenta: **402116976** para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Noviembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
1er. SUPLENTE	M. en C. Nydia Berenice González Ángeles	
2do. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos:

A Dios por haberme dado la vida y la oportunidad de terminar este proyecto.

A mi Madre, mi Padre y mi Hermana por ser un apoyo incondicional y siempre tener fe en mí.

A mi esposa y mis hijos, por ser mi gran inspiración cada día.

Al resto de mi familia y amigos que siempre estuvieron y estarán en las buenas y malas, a todos ustedes que forman parte de mi vida, los amo, muchas gracias.

Un Agradecimiento especial para el Dr. Gustavo Barriga Angulo, Jefe del laboratorio Clínico del Hospital de infectología del CMN La raza del IMSS, por haberme permitido realizar este proyecto y por toda la paciencia y consejos recibidos durante todo este proceso.

Y gracias a mi Universidad, mis maestros y asesores que me dieron valiosos conocimientos y la oportunidad de ser mejor cada día.

Índice

1. Índice de abreviaturas	2
2. Resumen	3
3. Justificación.....	4
4. Objetivo general.....	5
4.1. Objetivos particulares.....	5
5. Antecedentes.....	6
5.1. Epidemiología.....	6
5.2. Etiología.....	6
5.3. Análisis de laboratorio.....	8
5.3.1. Tipo de muestra.....	8
5.3.2. Procesamiento de la muestra.....	8
5.3.3. Tinción.....	9
5.3.4. Baciloscopia.....	9
5.3.5. Cultivo.....	10
5.3.6. PCR.....	11
5.3.7. Identificación.....	12
5.4. Transmisión y patogénesis.....	13
5.5. Fármacos y tratamiento antituberculoso.....	15
5.5.1. Clasificación de fármacos antituberculosos.....	15
5.5.2. Mecanismo de acción de fármacos antituberculosos.....	16
5.5.2.1. Antituberculosos de primera línea.....	16
5.5.2.2. Antituberculosos de segunda línea.....	17
5.5.3. Terapia de la tuberculosis.....	17
5.5.4. Terapia de las infecciones por MAC.....	18
6. Materiales y métodos.....	19
6.1. Material biológico.....	19
6.2. Material de laboratorio.....	19
6.3. Cultivo de muestras.....	20
6.4. Tipificación.....	22
6.4.1. Aislamiento del DNA.....	25
6.4.2. Amplificación.....	27
6.4.3. Hibridación.....	30
7. Resultados.....	43
8. Discusión de resultados.....	48
9. Conclusiones.....	52
10. Glosario.....	53
11. Bibliografía.....	55

Índice de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
BSL	Nivel de bioseguridad (del inglés <i>Biosafety level</i>)
CM	Micobacterias comunes (del inglés <i>Common Mycobacteria</i>)
CMN	Centro médico nacional
HPLC	Cromatografía líquida de alta densidad (del inglés <i>High-performance liquid chromatography</i>)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Genero <i>Mycobacterium</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MDR	Multi-drogo resistente (del inglés <i>multi-drug resistant</i>)
MGIT	Tubo indicador de crecimiento Micobacteriano (del inglés <i>Mycobacterium grow indicator tube</i>)
MNT	Micobacteria no tuberculosa
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
NALC	N-acetil-L-cisteína
NaOH	Hidróxido de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>)
PPD	Derivado proteico purificado (del inglés <i>purified protein derivative</i>)
Rx	Radiografía de torax
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TB	Tuberculosis
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

Resumen

Hace más de un siglo Robert Koch descubrió el bacilo que causa la tuberculosis. En aquel momento causó 1 de 7 de todas las muertes en Europa y un tercio de las muertes eran adultos jóvenes en edad productiva. En la actualidad sigue siendo un problema de salud pública. Se calcula que en todo el mundo están infectadas 1700 millones de personas (un tercio de la población mundial), con 10 millones de nuevos casos y más de 3 millones de muertos anuales ¹. En 2012, 8.6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.3 millones murieron. Siendo esta la segunda causa de mortalidad a nivel mundial ocasionada por un agente infeccioso².

Recientemente se ha producido un aumento constante en el número de casos anuales de tuberculosis como consecuencia de la epidemia de SIDA ¹. Existen en el mundo 35 millones de personas infectadas simultáneamente por el VIH y el bacilo tuberculoso, aunque no padecen la enfermedad activa. Esta combinación es letal, ya que una infección acelera la evolución de la otra teniendo 30 veces más probabilidad de llegar a padecer tuberculosis activa que quienes no están infectados. En 2012 hubo aproximadamente 1.1 millones de casos nuevos de coinfección, de los cuales 320 000 fueron letales. Aproximadamente un 20% de las muertes de personas infectadas por el VIH son causadas por la tuberculosis.

Adicionalmente, en estos pacientes infectados por VIH se han incrementado las coinfecciones con MNT's. Las enfermedades causadas por este tipo especial de Micobacterias desde el punto de vista clínico, radiológico y microbiológico son prácticamente indistinguibles de las causadas por *M. tuberculosis*; sin embargo, el tratamiento es muy distinto dependiendo del grupo de Micobacterias que infecten al hospedero, por lo que es de suma importancia identificar la especie infectante⁷.

En el hospital de infectología del CMN La Raza se tiene una positividad de cultivos (MGIT y Lowenstein Jensen) de alrededor del 10% de las muestras cada año (según estadísticas internas del laboratorio) (Grafica 1), siendo entonces de suma importancia determinar qué tipo de Micobacterias está infectando al paciente utilizando el método de PCR (HAIN) y así poder utilizar el tratamiento adecuado.

Se utilizaron 623 cepas positivas en cultivo procedentes de aparato respiratorio (69%), sangre y medula ósea (7%); orina (9%), líquidos corporales (5%) y biopsias de tejido (9%), de pacientes provenientes de los 4 hospitales del Centro Médico Nacional la Raza, de las cuales las especies encontradas fueron las siguientes: *M. tuberculosis* con 77.7%, *M. avium* con 17.2%, *M. gordonae* con 2.2%, *M. bovis* con 1.3%, *M. kansasii* con 1.1% y *M. malmoense* con 0.5%. Esto es de suma importancia para un mejor tratamiento ya que para cada una de ellas es diferente, y un error podría resultar en un fracaso terapéutico y propagación de la enfermedad, y en consecuencia el fallecimiento del paciente.

Implementar las nuevas técnicas de diagnóstico e identificación de especies pertenecientes al género *Mycobacterium*, tales como la PCR (HAIN), han demostrado ser una muy buena alternativa para un pronto y correcto inicio del tratamiento además de una mejora considerable a la salud de los pacientes.

Justificación:

1. En el 2012 se reportaron en México 40 millones de casos de personas infectadas de tuberculosis, de los cuales 2.5 millones fueron letales. La aparición de cepas MDR, la epidemia de VIH, el incumplimiento del régimen terapéutico, la complicación con otras infecciones y factores sociales son algunas de las causas por las cuales han estado proliferando recientemente las Micobacterias, y ya que no todas tienen el mismo tratamiento es de suma importancia determinar la especie infectante, razón por la que se presenta este trabajo.

Objetivo general:

1. Determinar la especie de micobacterias infectantes por medio de la PCR (HAIN) de pacientes en los cuatro hospitales del CMN La Raza (Hospital de Ginecoobstetricia, Hospital de Especialidades, Hospital General y Hospital de Infectología) para dar un diagnóstico y poder establecer el tratamiento adecuado.

Objetivos particulares:

1. Diferenciar entre micobacterias tuberculosas de las no tuberculosas mediante los kits Genotype CM y Genotype MTBC para obtener la proporción entre ambos tipos de micobacterias y dar el tratamiento correcto.
2. Identificar los factores de riesgo predisponentes en los pacientes infectados por micobacterias revisando la historia clínica de ellos para obtener su tendencia.
3. Determinar la sensibilidad a antibióticos de cepas de micobacterias con el kit Genotype *MTDRplus* para obtener los casos donde haya existido fracaso terapéutico.

Antecedentes

Epidemiología

Se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años. Los primeros progenitores de MTB probablemente pertenecían a los homínidos del este africano hace 3 millones de años. Los miembros modernos del MTC se originaron desde un común progenitor hace cerca de 15,000 a 35,000 años³.

Desde el principio de la historia la TB ha marcado a la especie humana. Su agente causal *Mycobacterium tuberculosis* ha matado a más personas que cualquier otro agente patógeno³. A pesar de tener un origen tan antiguo, es sorprendente el desconocimiento que se tiene. MTB ha ido desplazándose hacia los sectores más vulnerables de la población mundial: extrema pobreza, hacinamiento, falta o nulo acceso a servicios de salud, son algunos de los factores que fomentan su subsistencia y transmisión. No en vano sigue siendo la enfermedad infecciosa humana más importante y el patógeno con mayor número de muertes al año.

Se estima que 1,700 millones de personas, un tercio de la población mundial, está infectada por MTB⁴. En México, en el 2012 se reportaron 40 millones de personas infectadas de tuberculosis, de los cuales 2.5 millones fueron letales y 27 millones de nuevos casos².

La aparición de cepas MDR es motivo de gran preocupación. El aumento de la cifra a causa de la epidemia de VIH, el incumplimiento del régimen terapéutico, la complicación con otras infecciones y factores sociales son algunas de las causas por las cuales han estado proliferando recientemente estas cepas⁴.

Etiología

La TB es una enfermedad infecciosa causada por los miembros del complejo MTC, el cual está formado por las especies *tuberculosis*, *bovis*, *bovis BCG* y *africanum* del género *Mycobacterium*⁴.

Los microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium* son bacilos inmóviles muy delgados (0.2-0.4 x 1-10 µm), pertenecientes a la familia *Mycobacteraceae* (único género de esta familia), orden *Actinomycetales* y clase *Actinomycetes*. Los géneros que están estrechamente relacionados con micobacterias son *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*. Las especies de *Mycobacterium* poseen una estructura poco común de la pared celular, con ácido N-glicolilmurámico en lugar de N-acetilmurámico, y un contenido muy elevado de lípidos. Debido a esta característica son muy difíciles de teñir con tinciones de uso habitual, como los usados en la tinción de Gram, pero estos resisten la decoloración con alcohol acidificado (3% de ácido clorhídrico) tras la exposición prolongada de fucsina básica y al calentamiento posterior. Esta propiedad importante que depende de su pared celular se le denomina ácido-alcohol resistencia y permite distinguirlas de otros géneros (figura 1). También se caracterizan por crecer con mayor lentitud (2 a 60 días a temperatura óptima) que la mayoría de las bacterias patógenas humanas,

debido a la superficie celular hidrófoba que los induce a formar grumos, por lo que los nutrientes ingresan con dificultad a la célula ⁴.

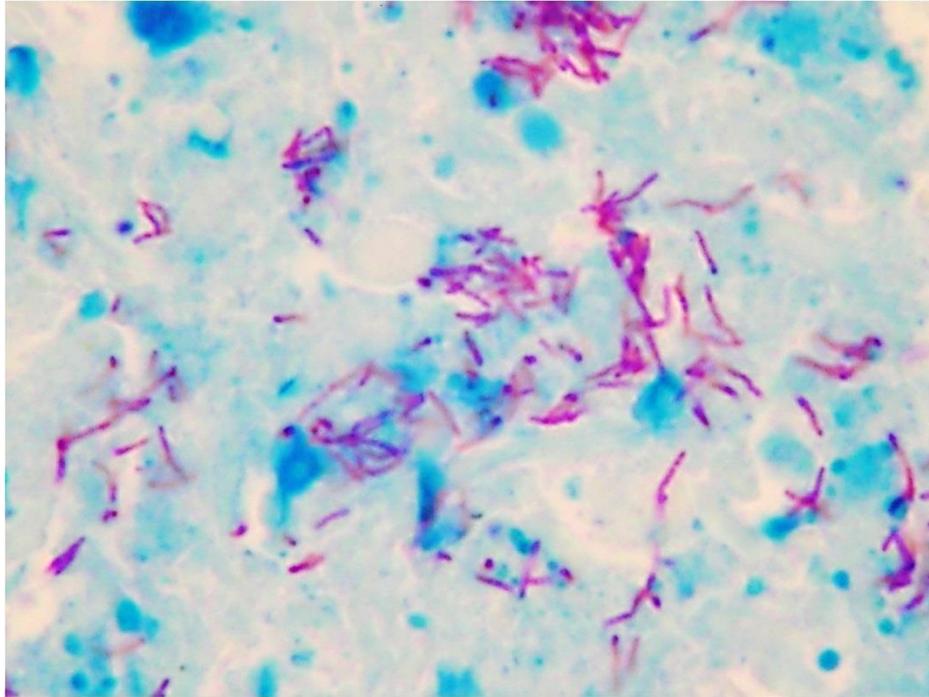


Figura 1. Bacilos ácido-alcohol resistentes teñidos con la tinción de Ziehl-Neelsen

En la actualidad hay 71 especies reconocidas del genero *Mycobacterium*. Clasificándose en dos grupos:

1. Las pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*tuberculosis*, *bovis* y *africanum*).
2. Las micobacterias no tuberculosas (MNT's)⁴.

Dentro de este último grupo se encuentran las especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium*, que desde el punto de vista taxonómico comprende a *avium*, *intracellulare*, *paratuberculosis*, *lepraemurium* y *silvaticum*. Pero para fines prácticos solo se analizan los microorganismos del complejo que causan infecciones humanas, es decir, *avium*, *intracellulare* y *paratuberculosis*. Dado que el aislamiento de *paratuberculosis* es muy poco frecuente, la denominación *avium* se aplica más a menudo a la identificación de *avium-intracellulare* ⁴.

Análisis de laboratorio

Tipo de muestra

Las micobacterias pueden ser aisladas de una gran variedad de muestras tales como esputo, lavado gástrico, aspiración transtraqueal, broncoscopía o hisopado laríngeo, orina, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, tejidos y líquidos corporales, heridas cutáneas, biopsias de tejido, aspirados (pus), sangre y medula ósea ⁴.

Procesamiento de la muestra

Las muestras como esputo, lavados gástricos, aspiración transtraqueal, broncoscopía o hisopado laríngeo y orina remitidas al laboratorio para cultivo presentan restos orgánicos, como mucina, tejido (células epiteliales), suero y otros materiales proteicos contaminados por microorganismos (algunas veces de flora normal y otras con microorganismos patógenos). Así que se debe procesar la muestra a modo de eliminar o reducir el número de bacterias rápidamente proliferativas que impiden el desarrollo de las micobacterias, además de liberar a los bacilos de las células y/o de la mucina existente en la muestra, a este proceso se le llama digestión/descontaminación ⁴.

Es lamentable que no exista un método de descontaminación ideal, razón por la cual los laboratorios padecen constantes limitaciones, pues se debe esforzar por incrementar al máximo el grado de supervivencia de los bacilos, eliminar la mayor cantidad posible de microorganismos contaminantes siendo lo menos agresivos posibles para tener un índice de contaminación máxima global aceptable del 5% ⁴.

Métodos de digestión/descontaminación:

1. NaOH
2. Zephiran-fosfato trisódico
3. NALC-NaOH.
4. Acido oxálico (más conveniente cuando las muestras están contaminadas con microorganismos gramnegativos, en particular *Pseudomonas* y *Proteus*).

El NaOH es el método más utilizado y muy conveniente porque además de ser descontaminante es mucolítico. Se pueden usar diversos agentes para licuar las muestras como el NALC, ditiotreititol (esputo lisina) y enzimas. Ninguno de estos agentes inhibe células bacterianas. Se utilizan estos elementos juntos en una mezcla enérgica con un mezclador (vortex) en un recipiente cerrado ⁴.

Después de la digestión/descontaminación se agrega buffer de fosfatos para neutralizar y se centrifuga a fin de concentrar las micobacterias y favorecer su detección en el frotis y el cultivo ⁴.

Las muestras que no requieren este proceso como el LCR, el líquido pleural y peritoneal solo son concentradas por centrifugación para la realización de frotis y cultivo ⁴.

En el caso de la sangre y medula ósea son recolectadas e inoculadas directamente en un caldo nutritivo (ej. BACTEC 13^a) con previa asepsia del sitio de punción.

Tinción

Las micobacterias poseen paredes celulares que contienen ácidos micólicos, que son ácidos grasos de cadena larga con múltiples enlaces cruzados. Estos ácidos micólicos de cadena larga forman complejos con los colorantes básicos y contribuyen así a la característica de ácido-alcohol resistencia que distingue a las micobacterias de otras bacterias ⁴.

Comúnmente se utilizan estos métodos de coloración:

1. Ziehl-Neelsen
2. Kinyoun
3. Fluorocromo (rodamina-auramina)

Los extendidos se preparan igual para cualquiera de los 3 métodos.

En la tinción de Gram, las micobacterias por lo general aparecen mal teñidas, al no poder captar el cristal violeta o la safranina. La ácido alcohol resistencia es afectada por la edad de las colonias, por el medio de cultivo y por la luz ultravioleta ⁴.

Baciloscopía

La baciloscopía es el procedimiento de elección en el que se aporta una confirmación preliminar del diagnóstico que sirve para iniciar el tratamiento y confirmar el caso. La más utilizada y aconsejable es la clásica tinción de Ziehl-Neelsen, en la que el bacilo se ve como pequeños bastones curvados de color rojo-fucsia sobre el fondo azulado⁵ (figura 1). Se deben de leer al menos 100 campos siendo más rápido con la técnica del fluorocromo, aunque tiene como desventaja que muchas micobacterias de crecimiento rápido no aparecen fluorescentes, así es que se recomienda confirmar todos los extendidos negativos con la técnica clásica de Ziehl-neelsen ⁴.

La baciloscopía tiene como característica que es sencilla de elaborar, rápida, reproducible, de bajo costo y elevada especificidad. La única limitante que tiene es su relativa baja sensibilidad ya que debe de contener al menos 10,000 bacilos por ml, lo que puede ocasionar que los casos detectados por esta técnica sean ya muy avanzados, así que la aparición de una baciloscopía negativa no descarta un diagnóstico de tuberculosis⁴.

Cultivo

Para optimizar la recuperación de micobacterias se deben utilizar por lo menos un medio sólido y uno líquido. Esta combinación permite la proliferación más rápida y abundante de micobacterias ⁴.

Existen dos tipos de medios sólidos:

1. Base agar
2. Base huevo

(Löwenstein-Jensen se encuentra en la clasificación de base huevo, además de contener verde de malaquita para inhibir el crecimiento de otras bacterias⁶)

Los medios en tubo se incuban en posición inclinada con las tapas de rosca sin ajustar durante una semana para permitir la evaporación del exceso de líquido ⁴.

Los cultivos se analizan todas las semanas para detectar desarrollo. Los contaminados se reportan como: "contaminados, imposible detectar micobacterias", y se solicitan nuevas muestras ⁴.

La mayoría de los aislamientos aparecen a las 3 o 6 semanas, algunos a las 7 u 8. Cuando aparecen el desarrollo se registra su velocidad, la pigmentación y la morfología de las colonias. Tras 8 semanas de incubación se informan los cultivos negativos y se descartan ⁴.

En los medios líquidos, por lo general, disminuye el tiempo total de aislamiento de bacilos a unos 10 días comparando con los sólidos de 17 o más días ⁴.

Para ambos medios, una vez observada la sospecha de aislamiento de bacilos, se debe hacer un extendido para confirmar que sean micobacterias, y también un Gram por si se sospecha de contaminación ⁴.

El cultivo es el único método que puede asegurar un diagnóstico certero de tuberculosis teniendo las siguientes ventajas:

1. Es el estándar de oro para la detección de micobacterias
2. Son mucho más sensibles que la baciloscopía, pudiendo detectar hasta 10 bacilos por muestra.
3. El aislamiento de las micobacterias es necesario para su tipificación.
4. Permite asegurar con certeza el término del tratamiento de un caso confirmado.

Aunque tiene las siguientes limitaciones:

1. Es un proceso muy tardado, dada la lenta capacidad de división de *M tuberculosis*.
2. Su costo se eleva con relación a la baciloscopía ya que para realizarlo se necesita de personal capacitado y equipo necesario para contener la formación de aerosoles provenientes de la muestra (campana de flujo laminar, centrifuga especial, equipo de protección personal, estufa para incubar, etc.).

PCR

El objetivo de la PCR es obtener muchas copias de un fragmento de ADN, para después utilizarlo en otras aplicaciones.

Los componentes son los siguientes:

- El ADN a partir del cual se quiere obtener una copia de un fragmento. A este se le llama ADN molde.
- Una enzima capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde, es decir, una polimerasa de ADN en un tampón apropiado para su mejor funcionamiento. Además de un cofactor de la enzima, generalmente se usa el cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
- Iniciadores de reacción. La enzima polimerasa únicamente es capaz de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de doble cadena de ADN, por lo tanto son necesarios moléculas cortas de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas se llaman cebadores o primers de la reacción. Que delimitan el fragmento a amplificar.
- Nucleótidos libres. La enzima polimerasa va a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador o primer que se ha unido a la cadena molde.

El proceso de la PCR se lleva a cabo en tres fases:

- Desnaturalización del ADN molde. Se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 95°C.
- Unión del cebador o primer a la cadena complementaria del ADN molde. Este paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir la unión complementaria del cebador o primer con el ADN molde (hibridación).
- Fase de elongación o extensión. La enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura en esta fase depende de la enzima utilizada. Si se usa la *Taq polimerasa* la temperatura de elongación suele ser de 72°C.

Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR. Únicamente una copia de un pequeño fragmento del DNA molde. Los fragmentos generados no tienen el mismo tamaño. La copia de cada cadena se inicia a partir del extremo 3', en el punto en el que el cebador o primer hibrida con el ADN molde y termina en el momento en el que la enzima no es capaz de añadir más nucleótidos.

La PCR se completa repitiendo entre 25 y 35 veces las tres fases anteriores. Si se analiza lo que sucede a partir del primer ciclo se forman fragmentos cuyo tamaño está delimitado por los puntos en lo que haya hibridado el cebador. Transcurridos varios ciclos más, los fragmentos mayoritarios serán aquellos limitados en sus extremos por los cebadores.

Si no se tiene en cuenta el hecho de que hace falta algunos ciclos para que la mayor parte de los fragmentos estén delimitados por los cebadores, se considera que por cada ciclo que se completa

se duplica la cantidad de fragmento a amplificar, es decir, que al final del proceso se obtiene aproximadamente una cantidad de fragmento igual al producto de la cantidad inicial del ADN molde por 2^n , siendo n el número de ciclos. Por lo que en el ciclo 20 se ha multiplicado por más de un millón la cantidad inicial del DNA molde³⁶.

En la PCR multiplex se puede amplificar simultáneamente más de una secuencia. Para ello, se combinan dos o más pares de cebadores en un mismo tubo de reacción, junto con el resto de reactivos de la reacción en cantidades suficientes para amplificar varios segmentos del ADN.

Identificación

Durante la última década se han empleado una serie de técnicas de biología molecular que permiten la amplificación de secuencias de ADN y ARN específicas⁴.

Se utiliza la hibridación de ADN para micobacterias comunes. Existen en el mercado sondas de ADN marcadas con acridinio, específicas para secuencias de ARN ribosómico micobacterianos (gen-probe)⁴.

El ARN ribosomal es liberado de las micobacterias mediante un agente lisante, sonicación y calor. Se deja reaccionar la sonda de ADN específica con el RNA ribosomal extraído, para formar un híbrido ADN-ARN estable. Todas las no hibridadas de ADN-éster de acridinio sufren degradación química. Cuando se agrega una solución alcalina de peróxido de hidrogeno para producir quimioluminiscencia, solo el éster de acridinio ligado al híbrido puede emitir luz, que está directamente relacionada con la cantidad de la sonda hibridada, y se mide con un quimioluminómetro⁴.

Se han utilizado métodos moleculares para identificar especies micobacterianas, por ejemplo, las regiones hipervariables de 16S del ARN ribosomal o la proteína de choque térmico de 65 kD de las micobacterias que tienen gran variabilidad de secuencias para diferenciar entre especies⁴.

También se ha utilizado el análisis cromatográfico en capa fina, de gas-liquido, de gas capilar y HPLC con fase inversa. Este último es un método muy específico y rápido para la identificación de especies. Los ácidos micólicos de cadena larga se separan mejor. Los patrones producidos por las distintas especies son fáciles de reproducir⁴.

Transmisión y patogénesis

La inhalación de un solo microorganismo viable (liberado de un paciente infectado) causa infección, tan solo del 15-20% de las personas infectadas desarrollan la enfermedad. Por lo general aparece algunos años después de la infección inicial, cuando el sistema inmune se deteriora^{1,4}.

Los casos de enfermedad pulmonar causada por MTC tienen un periodo de incubación de 4 a 12 semanas y son indistinguibles desde el punto de vista clínico, radiológico y anatomopatológico. Entre los síntomas de presentación común se encuentran fiebre, sudoración nocturna, fatiga, anorexia (pérdida de apetito), pérdida de peso, tos productiva, escalofríos, mialgias, es decir signos y síntomas similares a la gripe, bronquitis aguda o neumonía⁴.

Los bacilos inhalados son fagocitados por los macrófagos y la respuesta de hipersensibilidad provoca la formación de pequeños nódulos duros, llamados tubérculos. El proceso suele detenerse en esta fase, pero las bacterias a menudo permanecen vivas en el interior de los fagosomas de los macrófagos. Algunos mecanismos que explican la razón de que *M tuberculosis* permanezca de esta manera son:

1. La resistencia de los productos oxidativos.
2. La inhibición del proceso de fusión de los fagosomas con los lisosomas
3. La inhibición de la difusión de enzimas lisosomales¹.

Con el tiempo, el tubérculo formado puede evolucionar a una consistencia parecida a la del queso y pasa a denominarse lesión caseosa. Si esta lesión se calcifica, recibe el nombre de complejo de Ghon, que son llamativos en la radiografía de tórax. A veces, las lesiones tuberculosas se licúan y forman cavernas tuberculosas llenas de aire. A partir de estas cavidades la bacteria se puede diseminar a nuevos focos de infección por todo el cuerpo. Esta diseminación se denomina tuberculosis miliar, a causa de los numerosos tubérculos que se forman en el tejido infectado¹.

Evolución de la tuberculosis no tratada en el cuerpo humano:

1. **Tuberculosis primaria:** Prueba cutánea -, Rx-. Los bacilos son inhalados por los núcleos de gotitas. Se encuentran en los alveolos, donde los fagocitan los macrófagos¹.
2. **Tuberculosis diseminada:** Prueba cutánea -, Rx+. Una extensión directa de la tuberculosis primaria. Diseminación por todo el cuerpo. Se pueden formar muchos tubérculos pequeños (tuberculosis miliar). Se observa mayor incidencia en lactantes o personas debilitadas, a menudo es mortal. Hipersensibilidad ausente o escasa. Enfermedad generalizada progresiva y muerte¹.
3. **Tuberculosis latente:** Prueba cutánea +, Rx-. La mayoría de las personas permanece en este estado de por vida y sin tener ningún tipo de problema, incluso se tiene cierto grado de protección frente a una reinfección. Puede haber tubérculos de aparición precoz en el 5% de los casos¹.

4. **Tuberculosis activa:** Prueba cutánea +, Rx+, esputo+. Extensión lentamente progresiva de los tubérculos erosionando las vías respiratorias y los pequeños vasos sanguíneos. Las personas son altamente infecciosas y puede ser mortal si no es tratada adecuadamente¹.

Las personas infectadas desarrollan una inmunidad celular debido a que las bacterias son fagocitadas por los macrófagos, donde participan las células T sensibilizadas y constituye la base de la reacción cutánea de la tuberculina. En esta prueba se inyecta PPD de MTB en el interior de la piel (prueba de **mantoux**). Si la persona ha tenido tuberculosis, las células T sensibilizadas reaccionan con estas proteínas y se produce una reacción de hipersensibilidad retardada en 48 horas, apareciendo en forma de induración y enrojecimiento de la zona que rodea el lugar de la inyección. Una prueba cutánea positiva indica tuberculosis activa, enfermedad previa, vacunación o falso positivo. En cualquier caso se deben realizar estudios radiológicos y cultivo ^{1,4}.

La ingestión de leche proveniente de vacas infectadas con *M bovis* resulta en la penetración a través de la mucosa gastrointestinal además de invadir el tejido linfático de la orofaringe. El BCG es una cepa atenuada de *M bovis*, utilizada para vacunar y prevenir la tuberculosis ⁴.

En un pequeño porcentaje de los huéspedes infectados la enfermedad se disemina y afecta otros órganos además del pulmón como:

1. Aparato genitourinario
2. Ganglios linfáticos
3. Sistema nervioso central (meningitis)
4. Huesos y articulaciones
5. Peritoneo
6. Pericardio
7. Laringe

Los pacientes infectados con VIH tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar tuberculosis activa. En estos pacientes se desarrolla una enfermedad primaria rápidamente progresiva en lugar de una infección subclínica. Donde el diagnóstico se dificulta ya que aún no desarrollan una positividad a la prueba de PPD. Aun no hay hipersensibilidad retardada ⁴.

Las MNT's son microorganismos de vida libre y únicamente afectan en humanos si existen condiciones de inmunosupresión o si las barreras de la piel o mucosas han sido superadas, no existe evidencia de que su transmisión sea de persona a persona⁸. Comúnmente causan infecciones de la piel, tejidos blandos, linfadenitis, enfermedad pulmonar y se diseminan a todo el cuerpo en pacientes con SIDA ^{9,10}.

Con excepción de las enfermedades de la piel y tejidos blandos, la entrada principal de las MNT's que causan infecciones pulmonares, diseminadas y en otras localizaciones, son las vías gastrointestinal y respiratoria. Los factores de riesgo para estas micobacterias son los siguientes:

1. Las condiciones médicas coexistentes que afectan las barreras naturales y/o al sistema inmune como en el SIDA
2. El medio ambiente laboral o de vida
3. El ámbito demográfico donde se ha observado que las mujeres en la sexta década de la vida o mayores son consideradas como las más vulnerables a infecciones por MNT's especialmente pulmonares con *M avium*. A menudo este fenómeno está asociado con varias condiciones predisponentes, como anormalidades torácicas y enfermedades del tejido conectivo. Es importante enfatizar que el desarrollo de MNT's puede manifestarse sin obvias condiciones predisponentes.^{10, 11, 12.}

Fármacos y tratamiento antituberculoso

El resurgimiento de la tuberculosis a causa de la epidemia del VIH es un problema de salud pública mundial al inicio del siglo XXI. Causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo, especialmente en países donde esta infección es endémica¹³.

Existen 3 problemas en el tratamiento de la tuberculosis:

1. Incumplimiento de órdenes médicas por parte del paciente.
2. Toxicidad de los fármacos.
3. Aparición de resistencia antimicrobiana¹⁴.

Clasificación de fármacos antituberculosos

Los fármacos antituberculosos se clasifican en dos grupos como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación de fármacos antituberculosos

Primera línea	Segunda línea
Isoniazida	Ácido paraaminosalicílico
Rifampicina	Etionamida
Pirazinamida	Cicloserina
Etambutol	Kanamicina
Estreptomina	Amaracino
	Capreomicina
	Quinolonas

La resistencia a los fármacos, recientemente se ha convertido en un problema grave. Los mecanismos a isoniazida, rifampicina y pirazinamida, aún no está aclarado. Esto es consecuencia de un tratamiento inadecuado o de la falta de cumplimiento terapéutico por parte del paciente. La más problemática es la producida frente a la isoniazida y rifampicina¹³.

Mecanismo de acción de fármacos antituberculosos

Tabla 2. Mecanismo de acción de fármacos antituberculosos

Fármaco	Mecanismo de acción
Isoniazida	Inhibición de ácidos micólicos
Rifampicina	Inhibición de la ARN-polimerasa dependiente de ADN
Etambutol	Alteración de la biosíntesis de la pared celular
Estreptomina	Inhibición de la síntesis proteica
Pirazinamida	Alteración de la síntesis de ácidos grasos implicados en la biosíntesis de ácidos micólicos
Etionamida	Inhibición potente de la biosíntesis de ácidos micólicos
Cicloserina	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana (reacciones en las que interviene la D-alanina).

Antituberculosos de primera línea

1. Isoniazida

Fármaco antituberculoso más importante. Requiere activación relacionada con la actividad catalasa-peroxidasa de las micobacterias. Cuando este gen muta, se genera resistencia ya que no se activa. Inhibe la síntesis de ácidos micólicos, tiene efecto bactericida en microorganismos en división y se comporta como bacteriostático frente a micobacterias en reposo. Es ineficaz para el tratamiento de *M avium*. Dosis diaria: 5mg/kg^{13,14}.

2. Rifampicina

Antibiótico macrólido producido por *Streptomyces mediteranei*. Inhibe los mecanismos de transcripción de las micobacterias. Es bactericida frente a cepas activas y posteriormente tiene un efecto esterilizante en cepas menos activas. La aparición de la resistencia se da por una mutación en el gen que codifica la subunidad β de la ARN-polimerasa (rpoB), que impide la fijación del antibiótico. Dosis diaria: 10mg/kg^{13,14}.

3. Rifabutina

Derivado de la rifamicina. Comparte el mecanismo de acción con rifampicina (inhibición de la polimerasa de RNA micobacteriana) pero es aún más activa. Posee mayor actividad contra MAC que la rifampicina. Bloquea la proliferación de casi todas las cepas de MAC. Dosis 300 mg/día^{13,14}.

4. Pirazinamida

Análogo sintético de la nicotinamida. Efectiva sobre bacilos poco activos. En combinación con rifampicina corta el tratamiento de un año a meses. Parece actuar sobre enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos necesarios para la producción de ácidos micólicos. Se activa mediante

la piracinamidasa presente en las micobacterias. Muy eficaz frente a MTB intracelulares (macrófagos), donde el pH es bajo, se comporta como bactericida. La resistencia a este fármaco se debe a la pérdida en la actividad de la piracinamidasa por mutación del gen. No se puede producir resistencia cruzada con la isoniacida. Muy hepatotóxico. Importante en tratamientos de corta duración y cuando existe resistencia a varios fármacos. Dosis 40-50 mg/kg^{13,14}.

5. Etambutol

Actúa exclusivamente sobre micobacterias en fase de crecimiento probablemente alterando la síntesis de la pared celular. Tiene acción bacteriostática incluso frente a cepas resistentes a isoniacida y rifampicina. Cuando se utiliza solo se desarrolla una resistencia lenta en relación con cambios en el gen embA. Produce alteraciones visuales. Eficaz en recaídas y cuando hay resistencia a isoniacida y rifampicina. Dosis diaria: 20 mg/kg¹³.

6. Estreptomina

Aminoglucósido. Su uso como antituberculoso disminuyó desde la aparición de fármacos menos tóxicos activos por vía oral como la isoniacida, rifampicina y Etambutol. No destruye microorganismos intracelulares. Dosis diaria: 1g^{13,14}.

Antituberculosos de segunda línea

1. Ácido paraaminosalicílico

Bacteriostático débil frente a MTB. Derivado del ácido salicílico. Fármaco de bajo costo. No pasa a LCR. Dosis diaria: 4g¹³.

2. Etionamida

Análogo estructural de la isoniacida. Potente inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos. No se conoce el mecanismo de resistencia. Dosis diaria inicial: 250 mg y aumenta lentamente a 15-20 mg/kg hasta un máximo 1 g al día¹³.

3. Cicloserina

Actividad bacteriostática frente a MTB. Altera la síntesis de la pared bacteriana inhibiendo las reacciones en las que interviene la D-alanina. Con elevada toxicidad, solo indicado cuando MTB fue resistente a otros fármacos o a recaídas. Dosis: 250-500 mg 2 veces al día¹³.

Terapia de la tuberculosis

El tratamiento debe tener como mínimo dos fármacos a los que sea sensible la bacteria. Dura 6 meses, los primeros 2 con isoniazida, rifampicina y pirazinamida, y los siguientes 4 con isoniacida y rifampicina. Ante la frecuencia cada vez mayor de resistencia a los fármacos la CDC ha recomendado la terapéutica con 4 fármacos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol o

estreptomicina. Para obtener mejores resultados el tratamiento debe ser observado de manera directa para garantizar tasas de consumación de alrededor 90% ¹⁴.

Se debe tener cuidado con las interacciones farmacéuticas, en especial con los paciente que reciben antiretrovirales. Las rifamicinas aceleran el metabolismo de los inhibidores de proteasas y de la inversotranscriptasa. De las rifamicinas, la rifabutina tiene el menor efecto sobre las concentraciones de *indinavir* y *nelfinavir* ¹⁴.

Terapia de las infecciones por MAC

El uso de un solo fármaco es acompañado por la aparición de cepas resistentes. En la actualidad casi todos los clínicos tratan infecciones por MAC con claritromicina, azitromicina y etambutol. En algunas ocasiones se le ha agregado al régimen anterior rifabutina, clofazimina y una quinolona. La isoniazida y la pirazinamida no tienen efecto contra MAC.

Materiales y métodos

Material biológico

Para este trabajo se utilizaron 6470 muestras de las cuales 2688 fueron de origen respiratorio (esputo y lavado bronquial), 1646 de sangre y medula ósea, 1209 de orina, 477 de líquidos corporales (incluye líquido pleural, ascitis y cefalorraquídeo), 393 de biopsias de tejido y 57 de otro origen distinto con sospecha clínica de infección por micobacterias. De los cuales solo el 10 % (623 muestras) resultaron positivas al diagnóstico.

Material de laboratorio

Para todos los procesos se utiliza el siguiente equipo de protección personal:

- Bata quirúrgica
- Guantes de látex o nitrilo estériles
- Mascarilla de alta eficiencia N95

Para cultivo:

- Tubos cónicos de 50 ml
- Agitador vortex
- Pipetas Pasteur estériles
- Micropipeta 100/1000 μ l
- Puntas para micropipeta de μ l
- Hidróxido de sodio 4N estéril
- Buffer de fosfatos o PBS estéril
- Campana de flujo laminar clase II tipo A2

Para tipificación:

- Tubos eppendorf de 1000 μ l
- Pipetas de transferencia
- Placas de incubación a 95°C
- Termómetro
- Microcentrifuga
- Micropipeta de 100/1000 μ l y de 10/100 μ l
- Puntas para micropipeta de 1000 μ l y 100 μ l
- Tubos para PCR
- Agitador vortex
- Sonicador
- Termociclador

Cultivo de muestras

Las muestras consideradas como potencialmente contaminadas con otro tipo de bacterias patógenas y/o de flora normal (esputo, lavado bronquial, jugo gástrico y orina) fueron concentradas y descontaminadas utilizando el método de Petroff modificado ¹⁵. Las muestras provenientes de zonas estériles del cuerpo (biopsia de tejido, líquido pleural, líquido de ascitis y líquido cefalorraquídeo) se cultivaron directamente con previa concentración por centrifugación. Las muestras de sangre y medula ósea se inoculan directamente en el caldo nutritivo Bact/ALERT® MB, previa asepsia del sitio de punción.

Ambos tipo de muestras antes mencionadas se sembraron en medio líquido (MGIT) y sólido (Lowenstein-Jensen) y se monitorearon. El líquido en un sistema estandarizado cada 30 min y el sólido se verificó visualmente cada 3 o 4 días si existía crecimiento.

Una vez detectado el crecimiento, por cualquiera de los dos métodos, se realizó un frotis y tinción de Ziehl neelsen para verificar que las bacterias obtenidas pertenecen al género de las micobacterias (Diagrama 1).

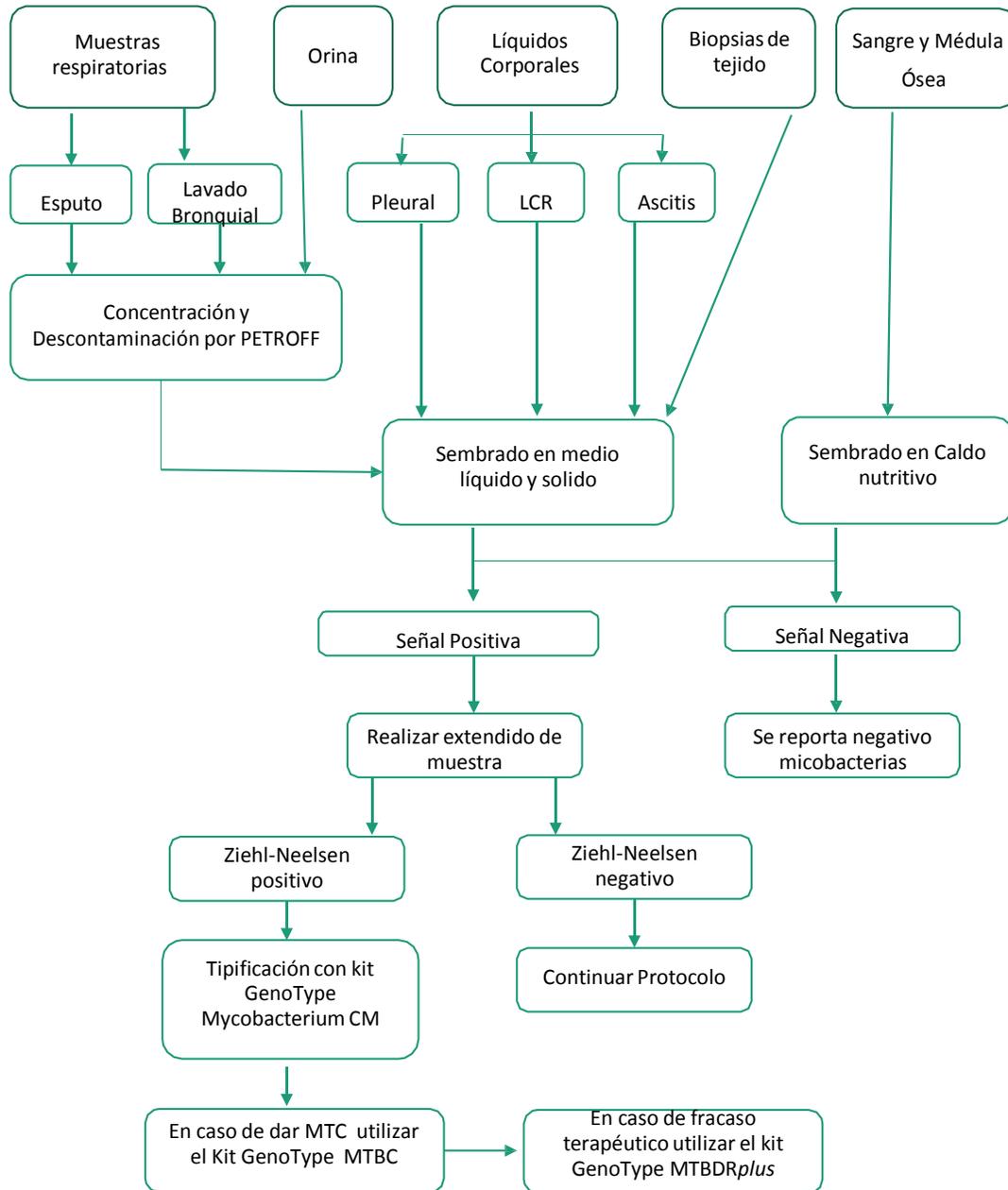


Diagrama 1. Diseño experimental para la tipificación de micobacterias provenientes de muestras de pacientes

Tipificación

Una vez confirmado el género por la tinción (se observan los bacilos ácido-alcohol resistentes color rojizo-rosado) se procede a realizar el test para la diferenciación de especie con kits basados en la tecnología que se explica a continuación:

La tecnología **DNA•STRIP®** consiste en sondas altamente específicas y complementarias a las secuencias de ácidos nucleicos selectivamente amplificadas y marcadas con biotina (amplicón). El amplicón monocatenario se une específicamente a las sondas analógicas durante la hibridación (Figura 2), mientras que los amplicones unidos no específicamente se retiran en etapas de lavados posteriores.

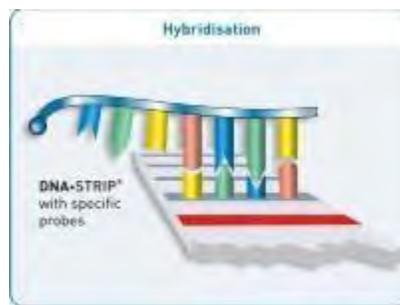


Figura 2. Hibridación del amplicón con la sonda específica en la tecnología DNA•STRIP®

Durante la reacción del conjugado, el amplicón específicamente unido se marca con la enzima fosfatasa alcalina y luego se hace visible una reacción de detección colorimétrica (Figura 3).



Figura 3. Reacción del amplicón marcado con el conjugado en la tecnología DNA•STRIP®.

De esta manera, un patrón de bandas específicas se desarrolla en la tira. Utilizando una plantilla de evaluación de la prueba específica, el resultado de la prueba se puede leer con rapidez y claridad. Usando este ensayo se puede determinar de forma fiable el genotipo del patógeno presente, así como sus resistencias.

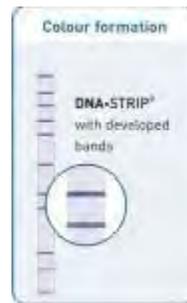


Figura 4. Patrón de bandas obtenido con la tecnología DNA•STRIP®

Primero se utilizó el kit GenoType Mycobacterium CM basado en la tecnología **DNA•STRIP®** que permite la identificación de las siguientes especies de micobacterias: *M avium ssp.*, *M chelonae*, *M abscessus*, *M fortuitum*, *M gordonae*, *M intracellulare*, *M scrofulaceum*, *M interjectum*, *M kansasii*, *M malmoense*, *M peregrinum*, *M marinum/M ulcerans*, *M tuberculosis complex*, y *M xenopi*.

En caso de dar *M tuberculosis complex*, se utilizó el kit GenoType MTBC que diferencia al complejo en: *M tuberculosis/M canettii*, *M africanum*, *M microti*, *M bovis subsp. Bovis*, *M bovis subsp caprae*, y *M bovis BCG*.

Para las cepas de *M tuberculosis complex* que tenían una aparente resistencia a rifampicina e isoniacida se utilizó el kit GenoType MTBDR*plus* que detecta para la resistencia a rifampicina las mutaciones asociadas más significativas del gen *rpoB* (que codifica por la subunidad β de la RNA polimerasa). Y para isoniacida se examina el gen *katG* (que codifica para la catalasa-peroxidasa), y la región del promotor del gen *inhA* (que codifica por la NADH enoil ACP reductasa).

El procedimiento completo (para cualquiera de los tres procedimientos anteriores) se divide en tres pasos:

1. Aislamiento de DNA procedente de cultivo (sólido y/o líquido)
2. Amplificación múltiple con primers marcados con biotina
3. Hibridación reversa.

La hibridación incluye los siguientes pasos:

1. Desnaturalización química del producto a amplificar
2. Hibridación de amplicones en una sola cadena, marcados con biotina a sondas unidas a membrana
3. Lavado astringente
4. Adición de conjugado de fosfatasa alcalina/estreptavidina
5. Tinción mediada por estreptavidina en una plantilla que asegura la interpretación sencilla y rápida dependiendo del esquema de bandas obtenido.

Aislamiento de DNA

1. En caso de provenir de medio líquido tomar 1000 μ l de cultivo. En caso de provenir de medio sólido agregar 300 μ l de agua grado molecular y tomar una asada de cultivo y poner ambos tipos de muestras en un tubo eppendorf de 1 ml.
2. Centrifugar a 14 000 rpm/15 min.
3. Retirar el sobrenadante con pipeta de transferencia para utilizar solo el sedimento
4. Agregar 1000 μ l de agua grado molecular para igualar volúmenes
5. Homogeneizar en vortex hasta resuspender el sedimento
6. Incubar a 95°C/20 min
7. Retirar de la incubadora y sonicar durante 15 min
8. Retirar del sonicador y centrifugar a 14 000 rpm/5 min
9. Trasvasar con pipeta de transferencia el sobrenadante hacia otro tubo eppendorf de 1 ml.
10. Guardar el sobrenadante obtenido a -70°C hasta su utilización.

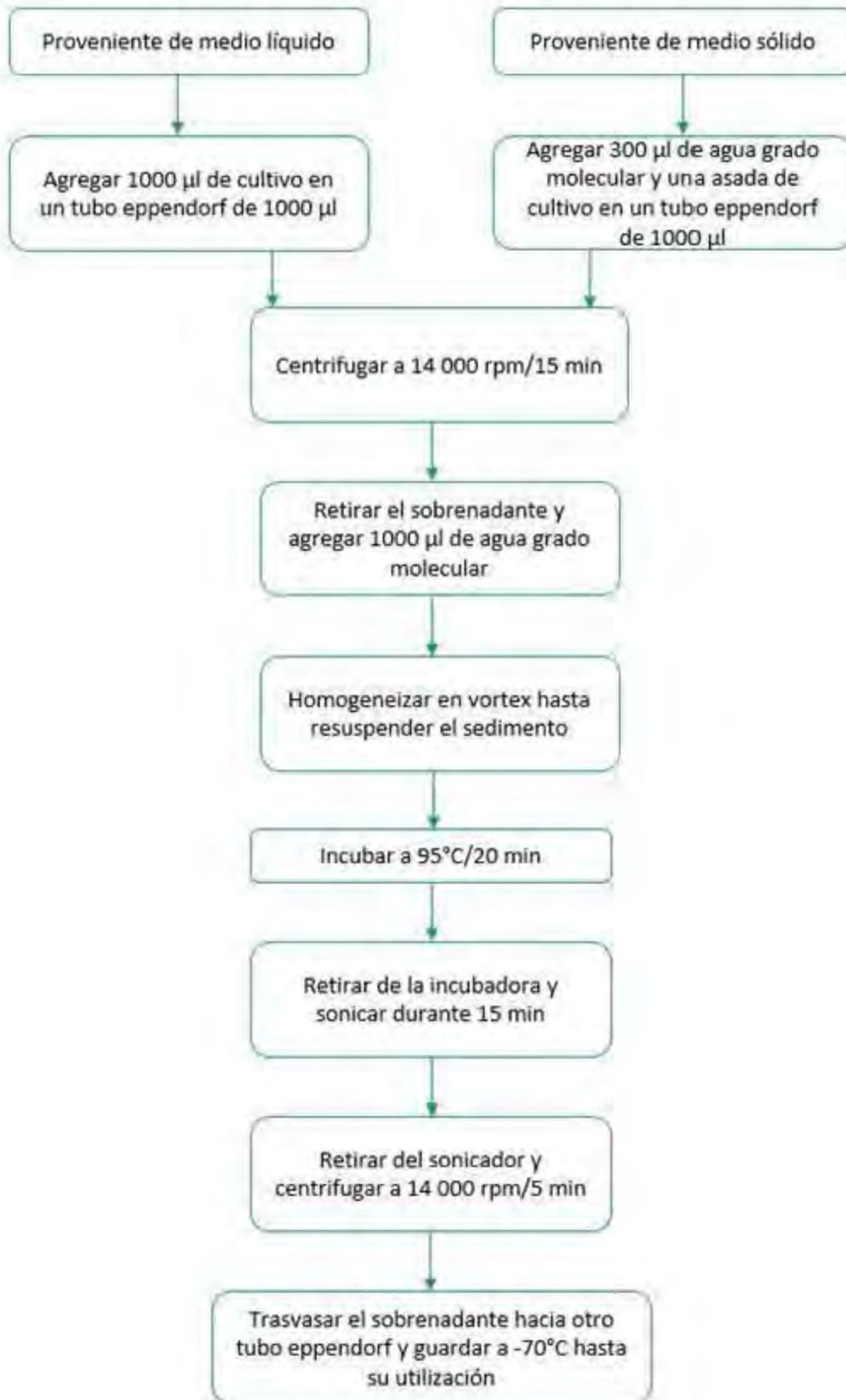


Diagrama 2. Aislamiento de DNA

Amplificación

1. Agregar 5 μl del sobrenadante previamente obtenido y descongelado (DNA bacteriano) a 45 μl del master mix previamente alicuotado. NOTA: depende de lo que se desee es el master mix utilizado.

Para los kits GenoType Mycobacterium CM y GenoType MTBDR*plus* la mezcla de amplificación (Master mix) se prepara de la siguiente manera: 35 μl de PNM (Primer/Nucleótido. Contiene primers unidos a biotina para la amplificación del genoma de las bacterias además de los nucleótidos necesarios para la reacción), 5 μl de buffer para PCR 10x, 2 μl de MgCl_2 , 3 μl de agua y 0.2 μl de Taq Polimerasa (Figura 5).



Figura 5. Mezcla de amplificación por muestra necesaria para los kits GenoType Mycobacterium CM y MTBDR*plus*.

Para el kit GenoType MTBC los reactivos necesarios para la amplificación están incluidos en las mezclas de amplificación A y B (AM-A y AM-B). La Mezcla de amplificación A (AM-A) contiene tampón, primers específicos, nucleótidos y Taq polimerasa. La mezcla de amplificación B (AM-B) contiene tampón, sales y colorante. Se añaden 10 μl de AM-A y 35 μl de AM-B para preparar el master mix.

2. Colocar el tubo eppendorf con la mezcla anterior en el termociclador con el siguiente ciclo:

15 min/95 °C	1 ciclo
30 seg/95 °C	10 ciclos
2 min/ 58 °C	
25 seg/95 °C	20 ciclos
40 seg/53 °C	
40 seg/70 °C	
8 min/70 °C	1 ciclo

Tabla 2. Ciclos programados en el termociclador para la PCR multiplex para los kits Genotype Mycobacterium CM, GenoType MTBC y MTBDR*plus*.

El producto de la reacción anterior son fragmentos específicos de ADN de doble cadena marcados con biotina (Figura).

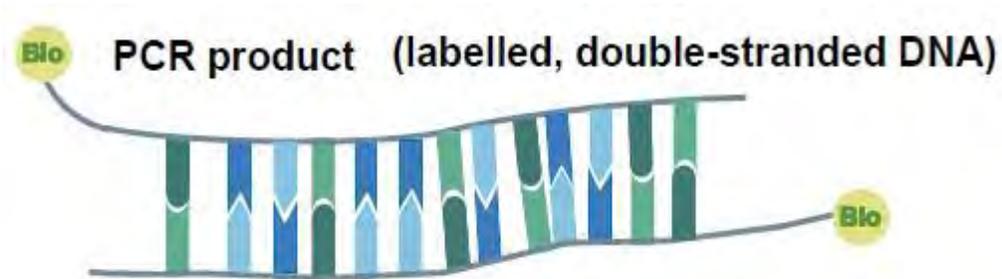


Figura 6. Fragmentos específicos de ADN marcados con biotina producto de la PCR multiplex.



Diagrama 3. Amplificación de DNA

Hibridación

1. Sacar los tubos eppendorf del termociclador.
2. Agregar a cada pocillo 20 μ l de solución DEN (desnaturalizante, contiene <2% NaOH y colorante) mas 20 μ l de la muestra amplificada. Incubar 5 min/TA (Figura 7).

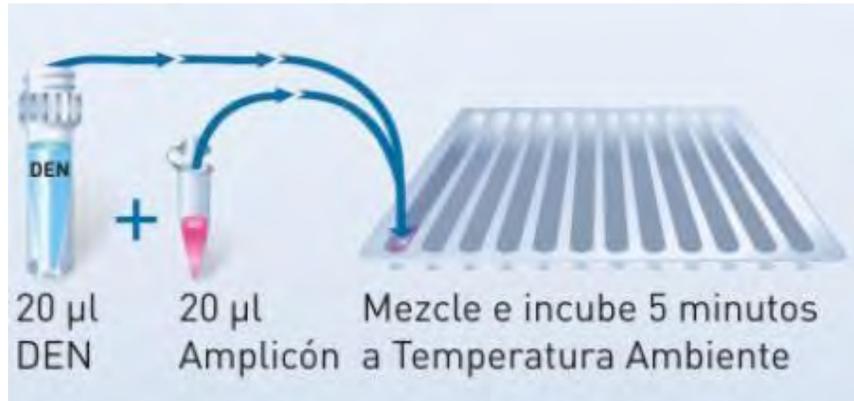


Figura 7. Paso de la Hibridación donde se agrega la solución DEN mas la muestra amplificada

La solución DEN desnaturaliza químicamente la doble cadena de ADN marcada con biotina en cadenas sencillas (Figura 8).

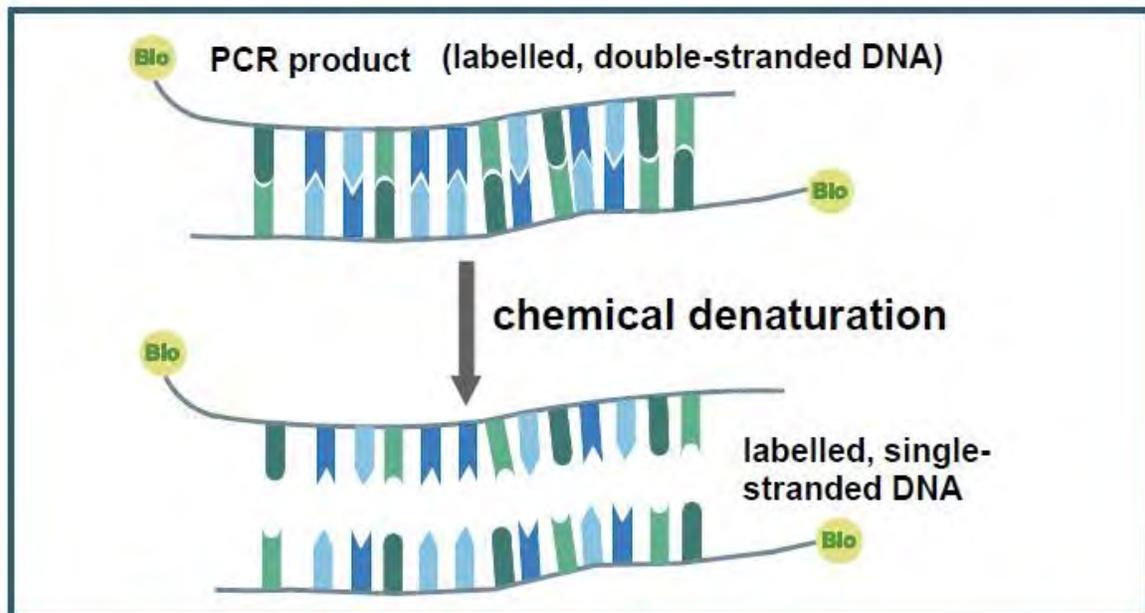


Figura 8. Desnaturalización química de la doble cadena de ADN marcada con biotina en cadenas sencillas.

3. Añadir a cada pocillo 1000 μ l de HYB (Tampón de hibridación, contiene tenso-aniónico <10% y colorante) (Figura 9).



Figura 9. Paso de la Hibridación donde se agrega la solución HYB

4. Poner la tira de membrana recubierta con sondas específicas en cada pocillo teniendo cuidado de que estén totalmente cubiertas por la solución y el lado de la sonda hacia arriba (Figura 10). Incubar con agitación la bandeja con pocillos en el TwinCubator® a 45°C/30 min. Aspirar el líquido de la mezcla anterior con una pipeta de transferencia.



Figura 10. Paso de la Hibridación donde se agrega la tira DNA•STRIP®, se incuba y aspira la solución HYB

Los fragmentos de cadena sencilla de ADN (Amplicones) se unen a sondas específicas dentro de la tira (hibridación) a temperatura adecuada para su reacción (Figura 11).

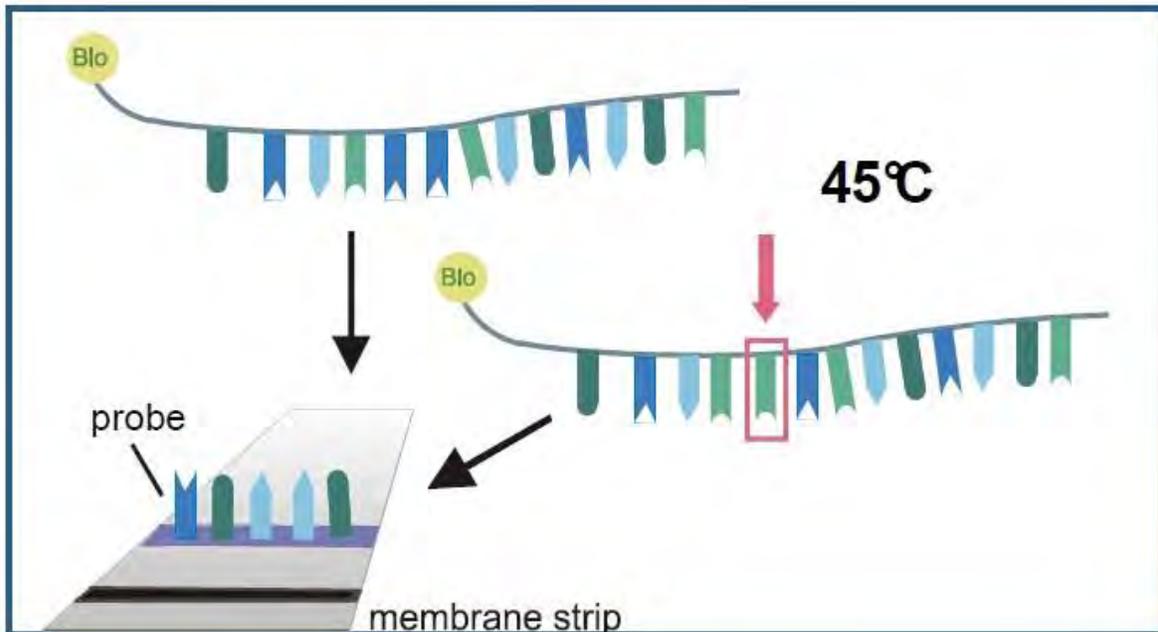


Figura 11. Hibridación a temperatura óptima de los amplicones con la tira DNA•STRIP®

5. Agregar 1000 µl de STR (solución astringente, contiene compuesto cuaternario de amonio al >25%, tenso-aniónico <1% y colorante). Incubar con agitación a 45°C/15 min. Aspirar el STR con una pipeta de transferencia (Figura 12).

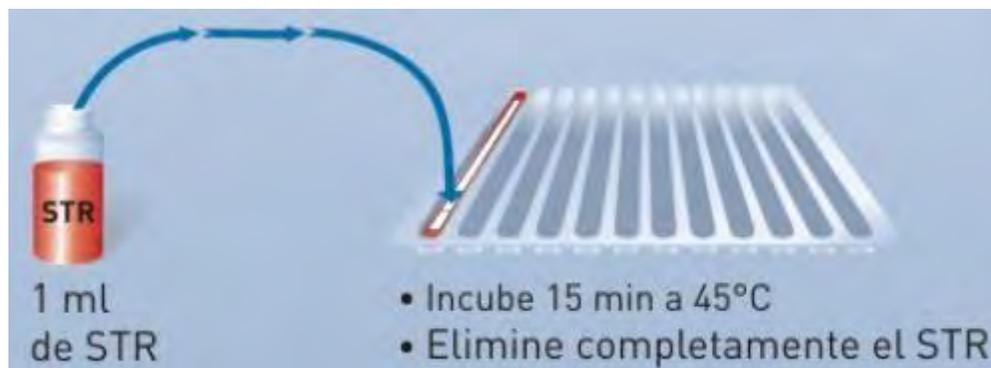


Figura 12. Paso de la hibridación donde se agrega la solución STR

La alta especificidad de unión de las sondas con el ADN complementario está asegurada por las condiciones astringentes resultantes de la combinación de la composición del tampón y la correcta temperatura. De este modo las sondas discriminan de manera fiable las diferentes secuencias de las especies bacterianas (Figura 13).

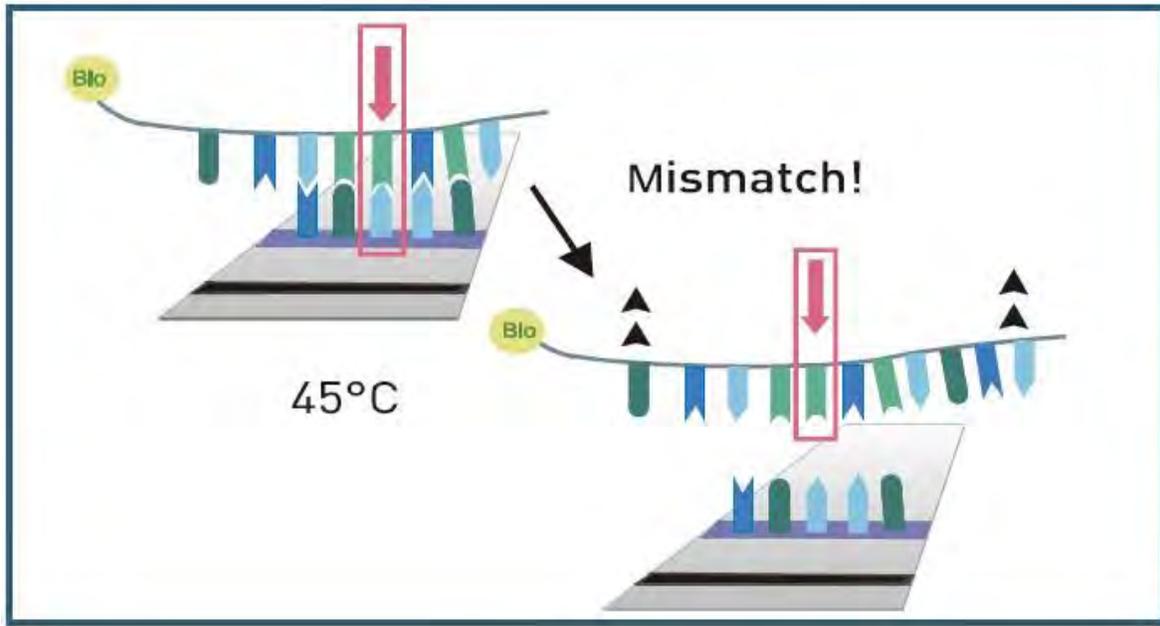


Figura 13. Discriminación de amplicones en la hibridación.

6. Agregar 1000 μ l de RIN (solución de aclarado, contiene tampón, tenso-aniónico <1% y colorante) para lavar la tira. Agitar 1 min/TA. Aspirar el RIN con pipeta de transferencia (Figura 14).



Figura 14. Paso de la hibridación donde se agrega la solución RIN

7. Añadir 1000 μl de concentrado diluido (990 μl de CON-D + 10 μl CON-C. CON-D contiene tampón, reactivo de bloqueo al 1% y $<1\%$ NaCl y CON-C contiene fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina y colorante). Agitar 30 min/TA. Retirar el concentrado con una pipeta de transferencia (Figura 15).



Figura 15. Paso de la hibridación donde se agrega el concentrado diluido

La fosfatasa alcalina conjugada con la estreptavidina se une a la biotina de los amplicones a través de la fracción de estreptavidina (Figura 16).

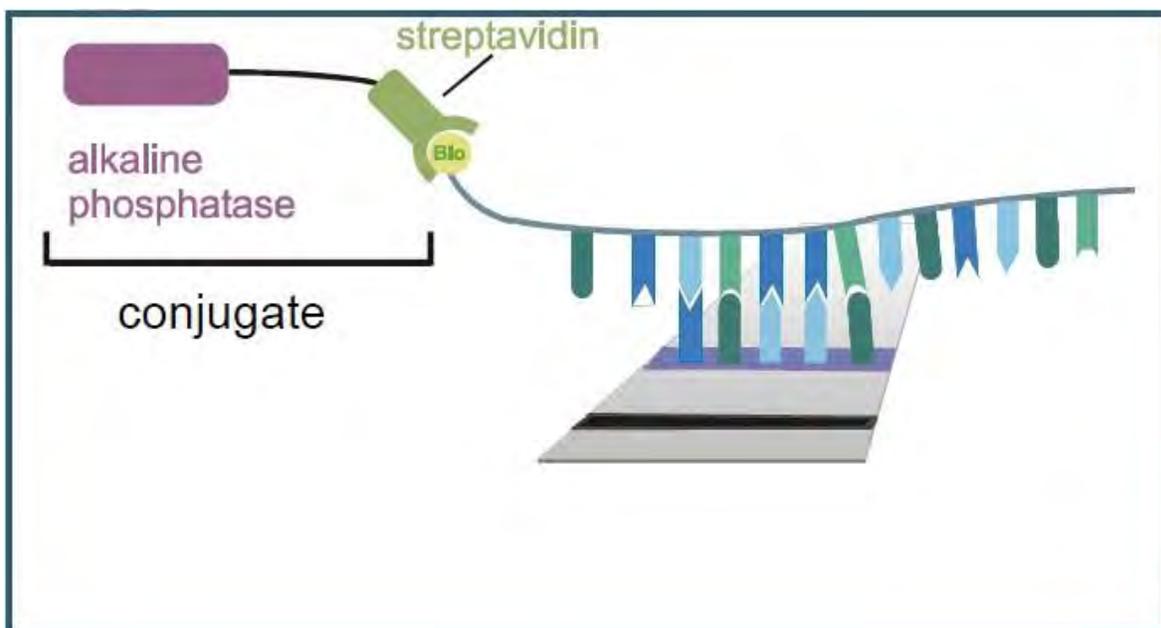


Figura 16. Unión de la fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina a la biotina del amplicón unido a la tira DNA•STRIP®

8. Lavar 2 veces con 1000 μ l de RIN durante 1 min/TA (Figura 17).



Figura 17. Paso de la hibridación donde se lava dos veces con solución RIN

9. Lavar con 1000 μ l de agua destilada durante 1 min/TA (Figura 18).

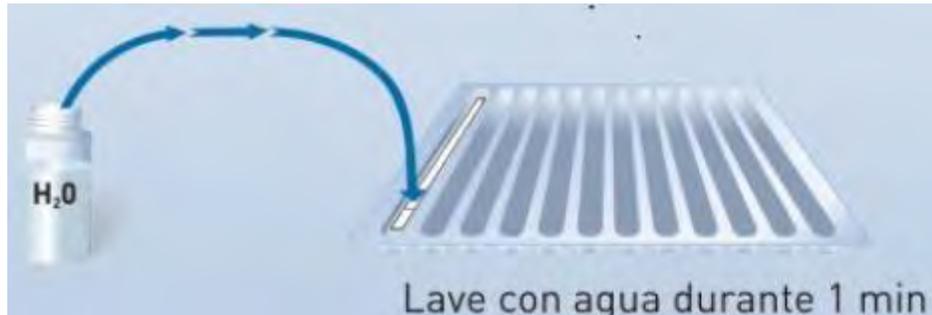


Figura 18. Paso de la hibridación donde se lava con agua destilada

10. Añadir 1000 μ l del sustrato diluido (990 μ l SUB-D + 10 μ l SUB-C. SUB-D contiene tampón, <1% $MgCl_2$ y <1% NaCl y el SUB-C contiene <70% dimetilsulfóxido, <10% 4-nitroazul de tetrazolio (NBT) y <10% 5-bromo-4-cloro-3-indolilo fosfato). Incubar sin agitación 5 min/TA procurando proteger de la luz (Figura 19).



Figura 19. Paso de la hibridación donde se agrega el sustrato diluido

Finalmente la fosfatasa alcalina transforma el sustrato añadido en un colorante que resulta visible en la membrana en forma de precipitado de color (Figura 20).

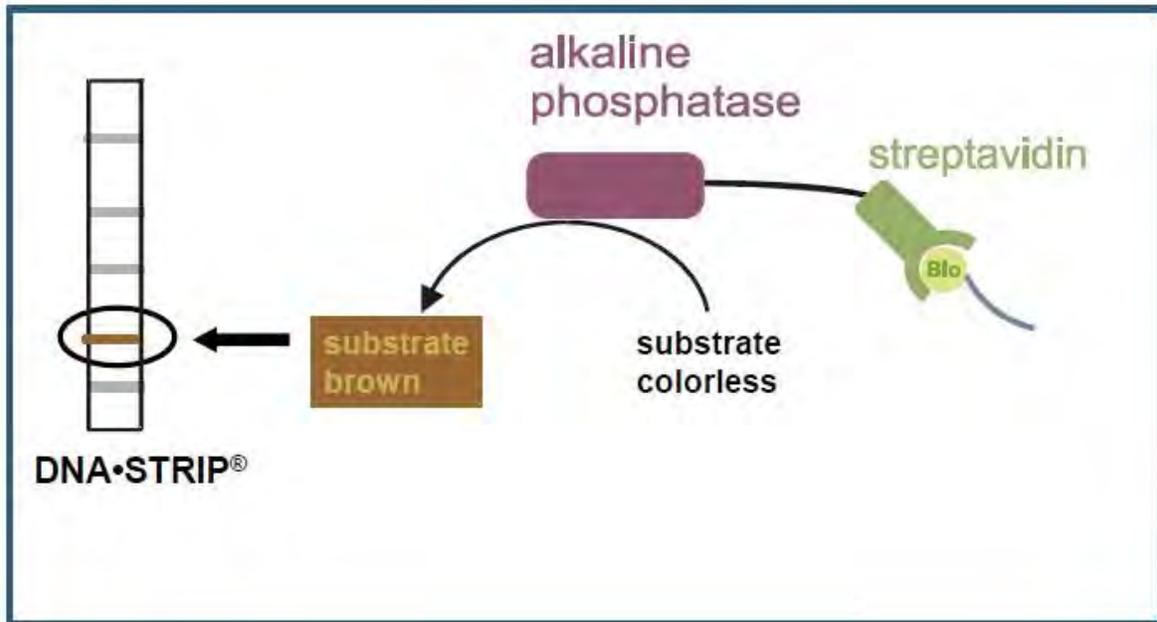


Figura 20. Transformación del sustrato por la fosfatasa alcalina en un colorante visible en la tira DNA•STRIP®

11. Lavar 2 veces con 1000 μ l de agua destilada durante 1 min/TA (Figura 21).



Figura 21. Paso de la hibridación donde se detiene la reacción colorida con agua

12. Sacar la tira e interpretar el resultado (Figura 22).

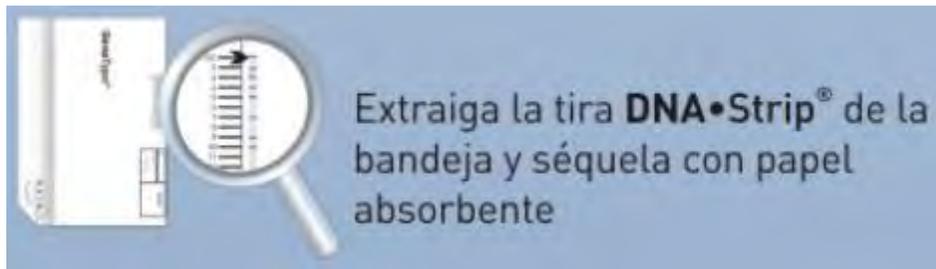


Figura 22. Paso de la hibridación donde se extrae y seca la tira DNA•STRIP®

A continuación se muestran las tablas de interpretación de la tira de resultados de cada uno de los kits utilizados.

Genotype Mycobacterium CM

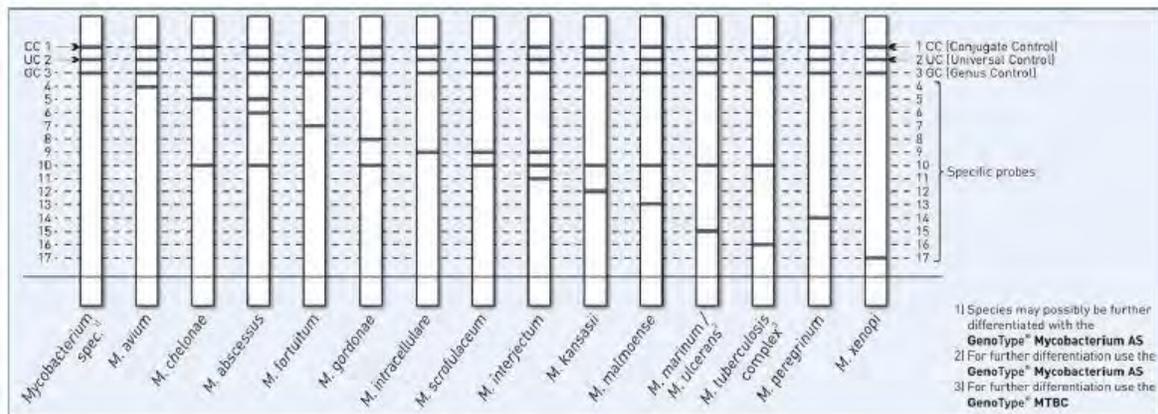


Figura 23. Tabla de interpretación del kit Genotype Mycobacterium CM

Genotype MTBC

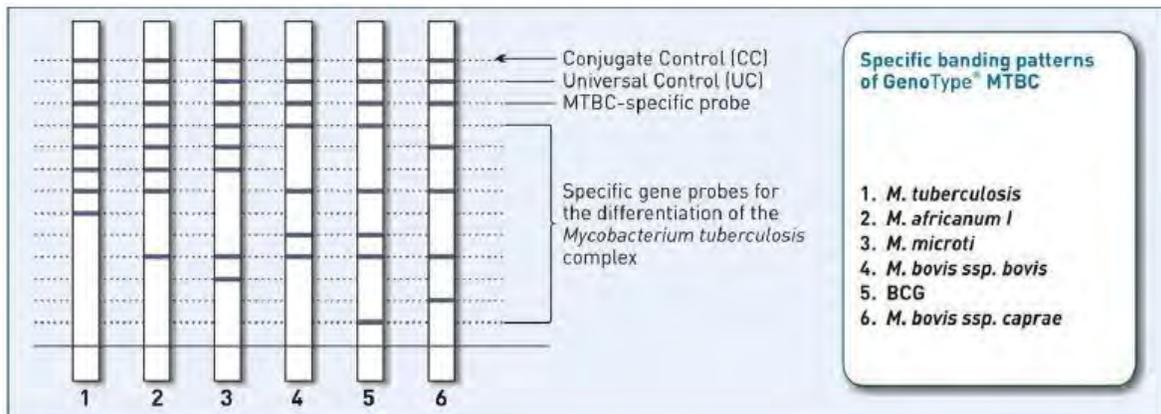


Figura 24. Tabla de interpretación del kit Genotype MTBC

Genotype MTBDRplus

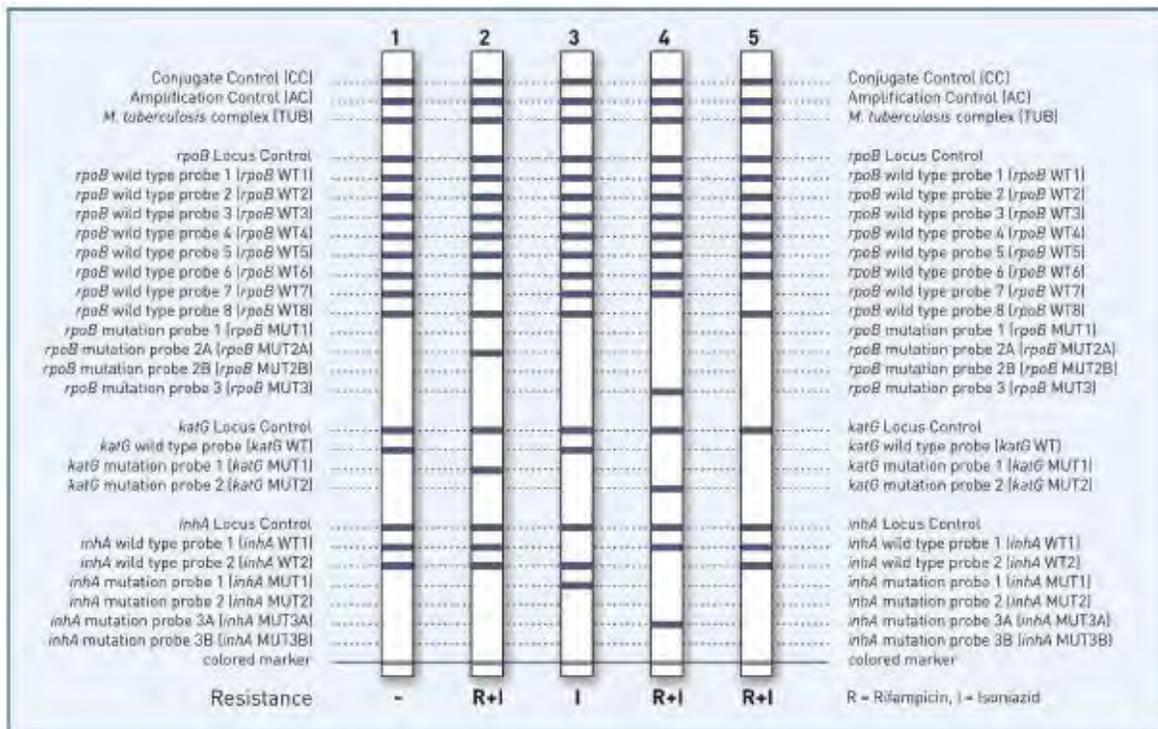


Figura 25. Tabla de interpretación del kit Genotype MTBDRplus

A fin de validar el funcionamiento correcto de los test y la funcionalidad de los kits, cada uno contiene en la tira zonas de control:

Zonas de control para el kit GenoType Mycobacterium CM

Cada tira incluye 3 zonas de control:

- Zona de control de conjugado (CC) para comprobar la unión del conjugado a la tira y una reacción cromogénica correcta.
- Zona de control universal (UC) que detecta todas las micobacterias conocidas y miembros del grupo de bacterias Gram-positivas con un alto contenido en G/C.
- Zona de control de género (GC) que documenta la presencia de un miembro del género *Mycobacterium*.

Zonas de control para el kit GenoType Mycobacterium MTBC

- Zona de control de conjugado (CC). Documenta la eficacia del conjugado unido a la reacción de sustrato.
- Zona de control universal (UC) que detecta todas las micobacterias y miembros del grupo de bacterias Gram-positivas con alto contenido de G/C. Si esta zona y el control de conjugado se tiñe como positivas, pero el restante perfil de bandas no puede ser asignado

a una micobacteria específica, se deben aplicar métodos adicionales para identificar la especie bacteriana correspondiente.

- Zona MTBC. Esta zona hibrida con amplicones generados de todos los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Zonas de control para el kit GenoType Mycobacterium MTBDRplus

- Zona de control de conjugado (CC) documenta la eficacia del conjugado unido a la reacción del sustrato
- Zona de control de amplificación (AC). Cuando el ensayo se realiza correctamente, un amplicón control se unirá a la zona de control de amplificación. Si esta banda se desarrolla, se pueden excluir inhibidores en la amplificación y errores durante la preparación y desarrollo de la reacción de amplificación. En caso de un resultado positivo del ensayo, la señal del AC puede ser débil e incluso puede llegar a desaparecer completamente. Esto puede ser debido a las reacciones de competencia durante la amplificación. Sin embargo, en este caso, la reacción de amplificación se realizó correctamente y el ensayo no ha de ser repetido. Cuando solamente se desarrollan las bandas CC y AC, esto representa un resultado negativo válido. La ausencia de señal, en la banda AC en caso de un ensayo negativo, indica errores durante la amplificación o muestra con inhibidores de amplificación. En este caso, el ensayo no es válido y la muestra respectiva ha de ser repetida.
- Zona *M. tuberculosis* complex (TUB). Esta zona hibrida con amplicones generados de todos los miembros conocidos de *Mycobacterium tuberculosis* complex. Si la zona TUB es negativa y además no se desarrolla ninguna banda de resistencia, la bacteria no pertenece al complejo *M. tuberculosis* y no puede ser evaluada mediante este sistema. En raras ocasiones, la banda TUB puede ser negativa y a la vez se puede desarrollar un patrón de resistencia. Si esto sucede, debe sospecharse la presencia de una cepa perteneciente al complejo *M. Tuberculosis* y debe repetirse el ensayo.
- Zonas Locus control (*rpoB*, *katG* y *inhA*). Las zonas del Locus control detectan una región del gen específico para cada respectivo locus. En caso de dar un resultado positivo (patrón de bandas evaluable para wildtype y mutaciones) del ensayo, la señal del Locus control puede ser débil e incluso puede llegar a desaparecer completamente. En raras ocasiones el locus *katG* puede desaparecer por completo (incluyendo la banda del locus control). Esto indica que la cepa analizada es resistente a isoniacida. Sin embargo, si las bandas *rpoB* y/o *inhA* no se desarrollan, el ensayo no es evaluable.
- Zona de sondas wild type. Las sondas wild type comprenden las áreas de resistencia más importantes de los genes respectivos. Cuando todas las sondas wild type de un gen son positivas, no se detectan mutaciones en las regiones examinadas. Esto indica que la cepa testada es sensible para el respectivo antibiótico. En caso de una mutación, el respectivo amplicón no puede unirse a la correspondiente sonda wild type. La ausencia de señal en al menos una de las sondas wild type indica, por tanto, resistencia de la cepa testada al respectivo antibiótico. Solamente serán consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor a la banda de control de amplificación (este criterio es aplicable para los tres kits: GenoType Mycobacterium CM, MTBC y MTBDRplus). Cada patrón que se desvíe del patrón wild type indica resistencia de la cepa testada. El patrón

de bandas obtenido con las sonda *rpoB* permite dibujar una conclusión sobre resistencia a rifampicina de las cepas testadas, el patrón de banda obtenido con las sondas *katG* e *inhA* permiten dibujar una conclusión sobre las resistencias a isoniacida de las cepas testadas.

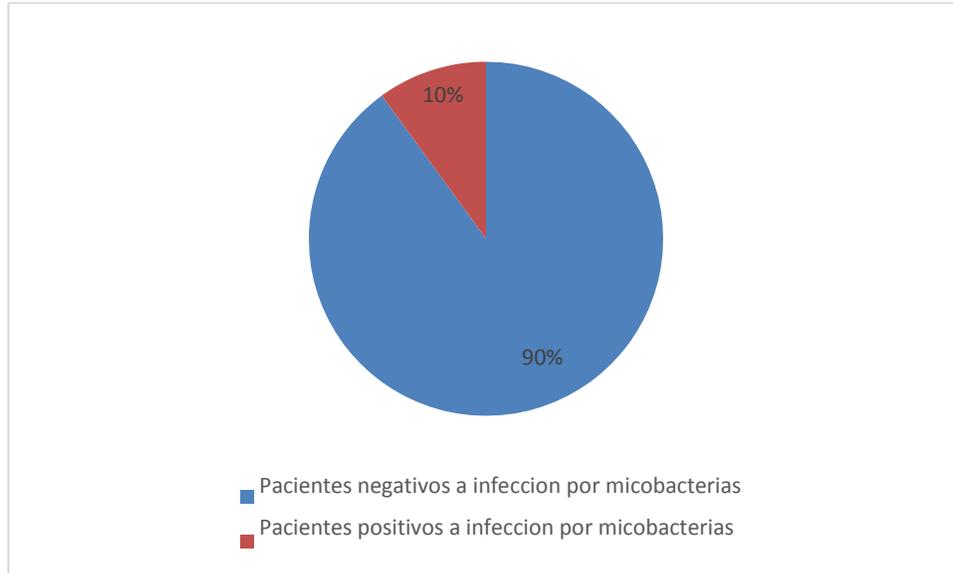
- Zona de sondas de mutación. Las sondas de mutación detectan algunas de las resistencias más comunes mediadas por mutaciones. Comparadas con otras muestras las señales positivas de las sondas de mutación *rpoB* MUT2A y MUT2B pueden mostrar una señal más débil. Solamente deben considerarse aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que las del control de amplificación. Cada patrón que se desvíe del patrón wild type indica resistencia de la cepa testada. El patrón de bandas obtenido con la sonda *rpoB* permite dibujar una conclusión sobre la resistencia a rifampicina de la cepa testada, el patrón de bandas de las sondas *katG* e *inhA* sobre la resistencia a isoniacida.



Diagrama 4. Hibridación de DNA

Resultados

Se recolectaron 6470 muestras provenientes de la misma cantidad de pacientes con sospecha clínica de infección por micobacterias, de los cuales 623 fueron positivas a micobacterias dando una positividad del 10%.

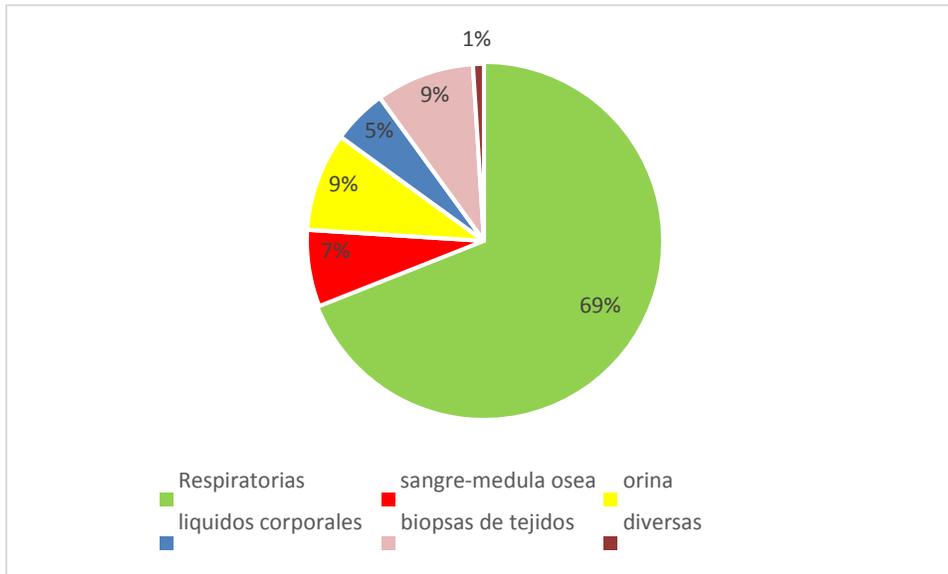


Gráfica 1. Distribución de pacientes positivos a infección por micobacterias de los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza.

	Número de pacientes	Porcentaje de pacientes
Pacientes positivos	623	10%
Pacientes negativos	5847	90%
Total	6470	100%

Tabla 3. Número total de pacientes positivos y negativos a infección por micobacterias de los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza

De las 623 muestras positivas 427 fueron de origen respiratorio (pulmonar), 45 de sangre y medula ósea, 59 de orina, 30 eran líquidos corporales, 56 biopsias de tejido y 6 diversas.

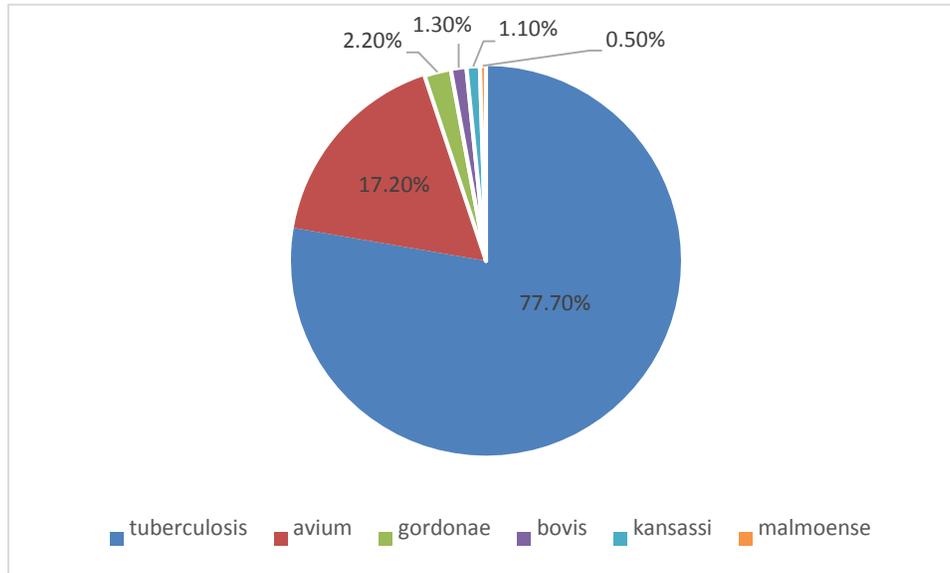


Gráfica 2. Distribución del origen de muestras positivas por micobacterias de los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza.

	Número de muestras	Porcentaje de muestras
Respiratorias	427	69%
Sangre y medula ósea	45	7%
Orina	59	9%
Líquidos corporales	30	5%
Biopsias de tejido	56	9%
Diversas	6	1%
Total	623	100%

Tabla 4. Número total del origen de muestras positivas por micobacterias de los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza.

De todas las muestras positivas a micobacterias e identificadas hasta su especie se encontró lo siguiente:

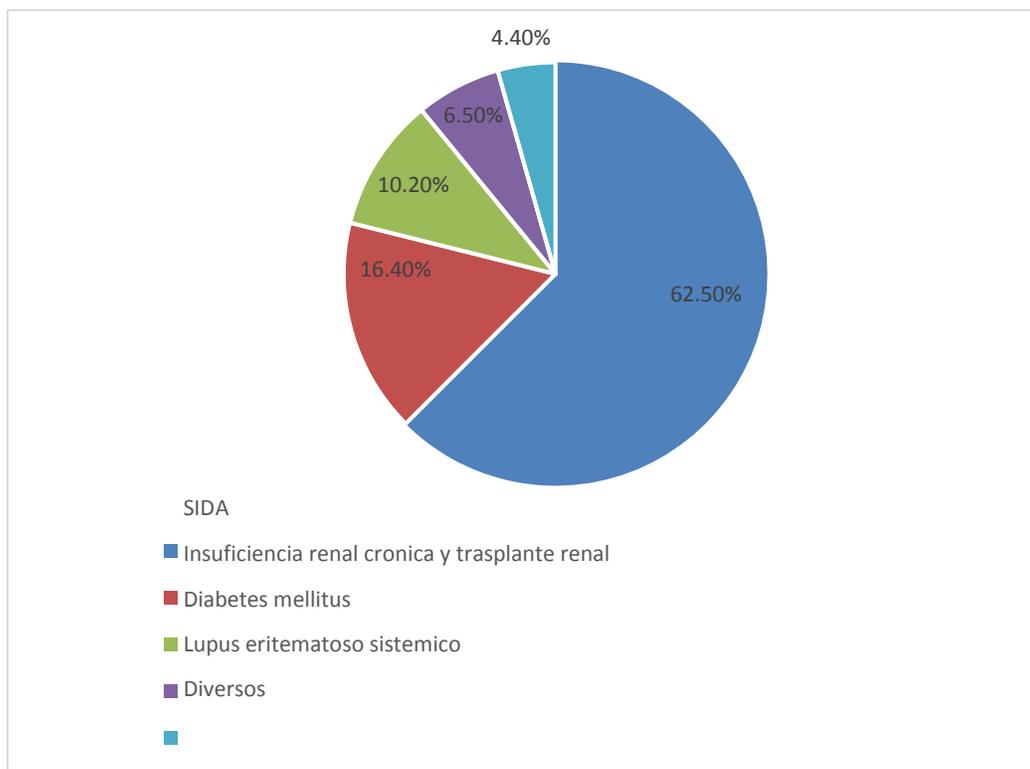


Gráfica 3. Distribución de las diferentes especies de micobacterias encontradas en pacientes de los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza.

	Numero de muestras	Porcentaje de muestras
Tuberculosis	484	77.7%
Avium	107	17.2%
Gordonae	14	2.2%
Bovis	8	1.3%
Kansassi	7	1.1%
Malmoense	3	0.5%
Total	623	100%

Tabla 5. Número total de las diferentes especies de micobacterias encontradas en pacientes de los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza.

Se determinó los factores de riesgo en solo el 70% de las muestras, ya que se obtuvo de la solicitud que el medico enviaba junto a la muestra y en el 30% restante no se especificó padecimiento alguno del paciente.



Grafica 4. Distribución de los diferentes factores de riesgo encontrados en pacientes positivos a infección por micobacterias en los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza.

	Número de pacientes	Porcentaje de pacientes
SIDA	270	62.5%
Insuficiencia renal crónica y Trasplante renal	71	16.4%
Diabetes mellitus	44	10.2%
Lupus eritematoso sistémico	28	6.5%
Diversos	19	4.4%
Total	432	100%

Tabla 6. Número total de los diferentes factores de riesgo encontrados en pacientes positivos a infección por micobacterias en los 4 hospitales del Centro Médico Nacional La Raza.

Se realizó sensibilidad antimicrobiana a 53 cepas de *mycobacterium tuberculosis* las cuales provenían de pacientes con un aparente fracaso terapéutico y se encontró que cinco eran resistentes a rifampicina y cuatro a isoniazida y rifampicina simultáneamente. El origen de estas cepas fue respiratoria a excepción de una que correspondió a una biopsia ganglionar.

Discusión de resultados

La detección y tratamiento oportuno y correcto de pacientes infectados por micobacterias son de suma importancia para el control epidemiológico de la enfermedad. Los métodos actuales de biología molecular son esenciales para una correcta identificación de especie, así como la detección de cepas multirresistentes. Como mencionaron Richter en 2006 y A. Sarkola en 2004, los ensayos GenoType Mycobacterium CM, GenoType MTBC y GenoType MTBDR*plus* resultan una herramienta rápida y precisa para la diferenciación de especies de micobacterias en un laboratorio clínico. Russo en 2006 determinó que el kit GenoType Mycobacterium CM tiene una sensibilidad del 97.9% y especificidad del 92.4%. Esto da la seguridad de haber utilizado con un alto grado de confianza estos kits en este trabajo.

Se reportó la frecuencia de micobacterias de muestras provenientes de pacientes de los 4 hospitales del CMR La raza, que son: Hospital de Especialidades, Hospital General, Hospital de Ginecología y Hospital de Infectología. Donde se encontró que la micobacteria más comúnmente encontrada fue *M tuberculosis* (n=848), seguida de *M avium* (n=107), *M gordonae* (n=14), *M bovis* (n=8), *M kansasii* (n=7) y *M malmoense* (n=3). Esta diferenciación de especie es importante ya que el tratamiento para cada una de ellas es diferente. Como mencionaron Canueto-Quintero en 2003 y Swaminathan en 2010 las infecciones por micobacterias no tuberculosas son muy comunes en pacientes con VIH. Sin embargo, las infecciones por micobacterias tuberculosas son altamente virulentas y representan un alto riesgo para la transmisión a otros hospederos, siendo este más urgente que el de las infecciones por micobacterias no tuberculosas, además se ha demostrado que este tratamiento también funciona con algunas, como *M kansasii*. Dicho tratamiento debe incluir una combinación inicial de cuatro antibióticos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol). Si se sospecha de una resistencia a rifampicina se debe expandir el régimen inicial añadiendo moxifloxacino o levofloxacino y un aminoglucósido o capreomicina. La fase inicial o intensiva dura dos meses con los cuatro antibióticos. Se recomienda extender el tratamiento a 9 meses si el paciente presentó 2 meses continuos un esputo positivo y a 12 meses si la infección llegó a sistema nervioso central. En general la duración del tratamiento se basa en el número de dosis recibidas, Castruita en 2016 mencionó que se deben cumplir un total de 105 dosis dividido en dos fases: fase intensiva de 60 dosis (diario de lunes a sábado) y la fase de sostén de 45 dosis intermitentes (3 veces por semana).

Desafortunadamente, el tratamiento para TBMDR es largo (más de 20 meses), caro, pobremente tolerado y menos efectivo que el de primera línea, de hecho solo el 48% de los pacientes que utilizan este tratamiento lo terminan. Este consta de 6 meses con kanamicina, amikacina o capreomicina y 18 meses con levofloxacino, protionamida, cicloserina, pirazinamida o etambutol.

Cuando se trata de *M bovis*, mencionó Prat Aymerich, se utiliza isoniazida, rifampicina, estreptomina y etambutol. La Piracinamida se excluye.

En caso de infecciones por MAC, mencionaron Griffith en 2007 y Gardner en 2005, se utilizan dos antimicobacterianos. Primero la claritromicina o la azitromicina, y en segundo al etambutol. Algunos médicos utilizan a la rifabutina como tercer antimicobacteriano, de igual manera, como cuarta droga también se puede administrar por vía intramuscular la amikacina o la estreptomina o también una fluoroquinolona como levofloxacino o moxifloxacino.

Por esta razón la identificación de especie es primordial para dar al paciente el tratamiento correcto. Existen trabajos como el de Cortés-Torres en 2013, donde obtiene de un grupo de pacientes con algún tipo de inmunosupresión un 63% de micobacterias tuberculosas contra un 37% de MNT's. En este se obtuvo un 79% de micobacterias tuberculosas (77.7% de *M tuberculosis* + 1.3% de *M bovis*) contra un 21% de MNT's (17.2% de *M avium* + 2.2% de *M gordonae* + 1.1% de *M kansasii* + 0.5 de *M malmoense*) (Tabla 5), porcentaje mayor en las tuberculosas. La probable razón de que se obtuvo un porcentaje mayor en las no tuberculosas es porque no se discriminó a la población de solo los inmunosuprimidos.

Flores-Treviño et al en 2014 mencionó que una tercera parte de la población mundial está infectada con *M tuberculosis*. En México, 16.8 de cada 100 000 habitantes está infectado y mueren alrededor de 2000 personas al año. Razón por la cual, esta micobacteria es la mayormente identificada en este trabajo (Grafica 3). Y ya que la patogénesis de la micobacteria es principalmente pulmonar, se reportó que el origen de las muestras fue también pulmonar (Grafica 2). Los casos de muestras de otro origen (sangre y médula ósea, orina, líquidos corporales y biopsias) se deben al grado de infección que tiene el paciente y de una posible infección por alguna MNT.

Dentro del complejo tuberculoso se encuentra *M bovis*, que, como se reportó en este trabajo fue la segunda micobacteria tuberculosa encontrada (Grafica 3). Gallivan et al en 2015 mencionó que los pacientes infectados con *M bovis* tenían más posibilidad de fallecer que los que estaban infectados por *M tuberculosis*, en especial niños y adultos mayores de 65 años. Esto se debe a que, como menciona Laniado-Laborín et al en 2014, es clínicamente imposible diferenciar a *M bovis* de *M tuberculosis*, y *M bovis* tiende a ser polirresistente a pirazinamida, isoniacida, rifampicina y etambutol.

M bovis se considera una infección zoonótica causada por consumir alimentos infectados. Pereira-Suárez et al en 2014 encontró rastros de DNA micobacteriano en quesos de un mercado popular, demostrando que los alimentos de origen animal son una fuente de contagio para pacientes inmunosuprimidos. Ridaura-Sanz et al en 2012 mencionó que se puede erradicar o disminuir su porcentaje tan solo teniendo las medidas adecuadas de pasteurización y limpieza de los productos alimenticios. Esto demuestra la facilidad que se tiene en este país tanto para infectarse de *M bovis* como de poder prevenir su contagio, primordialmente en paciente con algún tipo de inmunosupresión.

Las micobacterias no tuberculosas son patógenos oportunistas que están en el medio ambiente y que mayormente afecta a personas inmunocomprometidas. El trabajo de Murcia et al en 2007 mencionó que de un grupo de 92 pacientes con VIH solo el 8.2% se les detectó MNT's, siendo la

más común *M avium*. En este trabajo, el 21.1% obtenido sigue siendo elevado. Esta diferencia podría deberse a que en este país exista una mayor exposición a este tipo de micobacterias, como lo mencionaron Pérez-Martínez et al en 2013 y Castillo-Rodal et al en 2012, donde demostraron que el agua de la llave, que muchos mexicanos utilizan como potable, es una fuente de contagio de MNT's, como *M avium*, *M gordonae* entre otras, demostrando así la facilidad de contagio que tiene este tipo de micobacterias en pacientes inmunosuprimidos (Grafica 3).

Además de demostrar que *M avium* es la MNT más comúnmente encontrada, Brereton et al en 2012, Fujita et al en 2014 y Gommans et al en 2015 mencionaron que se pueden encontrar otras como *M kansassi*, *M malmoense* y *M xenopi* afectando el pulmón de personas con algún tipo de inmunosupresión. En este trabajo igualmente se detectaron y reportaron esas MNT's: *M Avium* 17.2%, *M Gordonae* 2.2%, *M kansassi* 1.1% y *M malmoense* 0.5% (Grafica 3).

El factor de riesgo que más intervino en este trabajo fue la infección por VIH/SIDA (62.5%) (Grafica 4). Esta alta incidencia se debe a que las muestras mayormente provenían del hospital de Infectología, en el cual se trata a la mayoría de pacientes con esta inmunosupresión y como menciona Montufar et al en 2014, el riesgo de desarrollar tuberculosis activa en un paciente con infección por VIH que tenga tuberculosis latente (PPD positiva) se incrementa 100 veces. Igualmente la coinfección con VIH facilita la presentación de formas extrapulmonares y diseminadas (ganglionar, osteo-articular, pleural, genitourinario, peritoneal, meníngeo y diseminado). En este trabajo se localizaron muestras extrapulmonares como sangre y médula ósea, orina, líquidos corporales, biopsias de tejido y otros.

Como menciona Suraprasit et al en 2014, la insuficiencia renal crónica es otro factor de riesgo que causa un deterioro del sistema inmune haciendo al paciente más susceptible a contraer tuberculosis. Así mismo, Eyüboğlu et al en 2013 menciona que el trasplante renal aumenta el riesgo de desarrollar tuberculosis por el estado inmunocomprometido por el que pasa el paciente. Estos dos padecimientos son muy comunes en este centro hospitalario ya que los hospitales General y Especialidades cuentan una unidad de trastornos renales y de trasplantes, razón por la cual este factor de riesgo se presenta en dichos pacientes (Grafica 4).

La diabetes en México es un problema de salud pública, y ha ido en aumento en los últimos años. El estudio realizado por Suwanpimolkul et al en 2014 demostró que los adultos mayores de 45 años y diabéticos son más propensos a desarrollar tuberculosis. Así mismo Durson Tatar et al en 2003 demostró que la diabetes aumenta de 3 a 7 veces el riesgo de padecer tuberculosis (Grafica 4).

Como menciona Peñuelas-Urquides en 2014, los casos de tuberculosis multirresistente van en aumento en los últimos años. En este trabajo se determinó de 53 muestras de *M tuberculosis* que 5 muestras fueron resistentes a rifampicina (9.4%) y 4 a rifampicina e isoniazida simultáneamente (7.5%). Flores-Treviño en 2014 determinó que el 48.6 % de sus cepas fueron resistentes a alguna droga. De las cuales 40% fue resistente a isoniazida, 20% a rifampicina y 19% a ambas. La cantidad de casos de multirresistencia depende, como menciona Lopez-Rocha en 2013 y Gunther et al en

2015, del país de origen, las condiciones de pobreza, el difícil acceso a los servicios de salud, la marginación, el fracaso terapéutico, etc.

México, al ser un país en desarrollo, la diversidad genética de las cepas es aún desconocida. Para conocerla es necesario realizar ensayos de “spoligotyping” para poder determinar los riesgos de contagio, la fuente, el monitoreo de cepas existente entre los pacientes, etc. Este trabajo, abre la puerta para poder iniciar estos estudios de tipificación genética y poder entender el comportamiento de las cepas circulantes en esta parte de la ciudad.

Conclusiones

- Se determinó en 623 muestras positivas a micobacterias la especie infectantes en pacientes tratados en el centro Médico Nacional la Raza para poder dar así el tratamiento adecuando.
- Los kit Genotype Mycobacterium CM y Genotype MTBC son una herramienta muy útil para la identificación de especies de micobacterias.
- Se determinó que *Mycobacterium tuberculosis* es la micobacteria más frecuentemente encontrada, razón por la cual las muestras pulmonares fueron las mayormente enviadas al laboratorio.
- Se diferenciaron las micobacterias tuberculosas de las no tuberculosas, teniendo a *Mycobacterium avium* como la micobacteria no tuberculosa más frecuentemente encontrada.
- Los pacientes que presenten factores de riesgo como la infección del VIH/SIDA, la insuficiencia renal crónica/trasplante renal, diabetes y lupus eritematoso sistémico deben ser prioritarios para un inicio de tratamiento y así impedir la propagación de la enfermedad.
- El kit Genotype MTBDR*plus* es una herramienta muy útil para la identificación de cepas resistentes a isoniazida y rifampicina.

Glosario

Bacilo: Término que se utiliza para describir cualquier bacteria en forma alargada o de barra.

Baciloscopia: Prueba que se utiliza para detectar la presencia de bacilos en una muestra.

Coinfección: Infección concurrente con más de un patógeno.

Hospedero: Aquel organismo que aloja otro en su interior o que lo porta sobre sí.

Lowenstein Jensen: Medio de cultivo que se emplea en microbiología para hacer posible el crecimiento de micobacterias.

MGIT: Siglas del medio líquido utilizado para aislar micobacterias (Mycobacteria grow indicator tube)

Micobacterias: Son bacterias en forma de bacilo, aerobias y no móviles. Tienen como característica principal tener ácido-alcohol resistencia generada por su gran cantidad de ácidos micólicos presentes en su pared celular.

***Mycobacterium*:** Es el único género de la familia *Mycobacteriaceae*. Formada por bacilos aerobios inmóviles y no esporulados causantes de graves enfermedades en los mamíferos incluyendo tuberculosis y lepra.

***Mycobacterium avium*:** Micobacteria no tuberculosa comúnmente encontrada en el medio ambiente y causa infección cuando se inhala o se ingiere. La infección pulmonar es similar a la tuberculosis mientras que la diarrea y el dolor abdominal se asocia a la infección gastrointestinal.

***Mycobacterium bovis*:** Es una micobacteria de crecimiento lento y causante de la tuberculosis bovina. También puede infectar y causar tuberculosis en humanos.

***Mycobacterium gordonae*:** Micobacteria no tuberculosa habitualmente presente en la tierra y el agua, así como en el medio ambiente hospitalario. Es considerado como un agente no patógeno y solo en condiciones excepcionales de se comporta como agente oportunista.

***Mycobacterium kansasii*:** Micobacteria no tuberculosa fotocromógena. Esto debido a un pigmento formado por un β -caroteno. Su infección se asocia a defectos inmunológicos locales o sistémicos como las neumopatías crónicas, tuberculosis pulmonar previa, cardiopatías congénitas, hepatopatías crónicas, algunas hemopatías, tratamientos prologados con esteroides, trasplante de órganos, linfocitopenia y VIH.

***Mycobacterium malmoense*:** Micobacteria no tuberculosa (llamada así porque su primer aislamiento fue de un paciente de la ciudad de Malmo, Suecia) presente en el agua y el suelo. Infecta principalmente a niños pequeños con linfadenitis cervical o adultos con enfermedad pulmonar crónica. Rara vez causa infección extrapulmonar.

Mycobacterium tuberculosis: Es la bacteria responsable de la mayor cantidad de casos de tuberculosis en el mundo. Sus síntomas son fiebre, dolor muscular, pérdida de peso, etc.

PCR: Siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction) utilizada para amplificar fragmentos de ADN

SIDA: Siglas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Es un trastorno inmunológico causado por la infección del virus de inmunodeficiencia humana.

Tuberculosis: Enfermedad infecciosa causada por un bacilo y se caracteriza por la formación de tubérculos o nódulos en los tejidos infectados.

VIH: Siglas del virus de la inmunodeficiencia humana.

Bibliografía

1. Lansing M prescott 2004, Microbiología, 5ª edición, Mc Graw Hill, Interamericana de España, Madrid.
2. World Health Organization 2013. Global Tuberculosis control report.
3. Palomino Juan Carlos, Cardoso Leao Sylvia y Ritacco Viviana 2007. Tuberculosis, From basic science to patient care, first edition.
4. Forbes Betty y Sahm Daniel 2004, Diagnostico microbiológico, Bailey & Scott, 11ª edición, buenos aires, Medica panamericana
5. Murray 2007, Microbiologia medica. 5ª edición, elsevier España.
6. Brooks Geo, Carrol Karen, Butel Janet, Morse Stephen 2008. Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Adelberg, 19ª edición, traducida de la 24ª edición en inglés, Manual Moderno.
7. Guidelines for preventing the trasmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-Care Facilities 1994, Centers for disease control and prevention.
8. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. Thorax 2000; 55:210-218.
9. Holland SM. Nontuberculous mycobacteria. Am J Med Sci 2001; 321:49-55.
10. Holland SM. Immune deficiency presenting as mycobacterial infection. Clin Rev Immunol 2001; 20:121-137.
11. Marras TK, Daley Cl. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. In: Catanzaro A, Daley CL, eds. Luna Disease Due to Nontuberculous Mycobacterial Infection. Philadelphia: WB Saunders; 2003:553-568 Clinics in Chest Medicine, Vol 23.
12. Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. Semin Respir Crit Care Med 2004;25:283-295.
13. Lorenzo Velázquez *et al* 2008, Farmacología básica y clínica, editorial medica panamericana, 18ª edición, Madrid España.
14. Goodman & Gilman 2003, Las bases farmacológicas de la terapéutica, Mc Graw hill, 10ª edición, volumen II, México DF.
15. Parson LM., Somuskovi A., Gutierrez C., Lee E., Paramisauan CN., Abimiki A. et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource por countries: challenges and opportunities. Clin Microb Rev 2011; 2 (2).
16. Cortés-Torres et al 2013. Molecular analysis of mycobacteria isolated in Mexican patients with different immunodeficiencies in a tertiary care hospital. Archives of Medical Research. 44(7):562-569.
17. Flores-Treviño et al. 2014. Drug resistance and molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Mexico: A systematic review. Salud publica de Mexico. 56:63-77.
18. Gallivan et al, 2015. Epidemiology of human Mycobacterium bovis disease, California, USA, 2003-2011. Emerging infectious diseases. 21(3):435-443.

19. Laniado-Laborín et al, 2014. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. 27:1-5
20. Pereira-Suárez et al, 2014. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR in fresh cheese from local markets in Hidalgo, Mexico. *Journal of Food Protection*. 77(5):849-852.
21. Ridaura-Sanz et al, 2012. Intestinal/peritoneal tuberculosis in children: an analysis of autopsy cases. *Tuberculosis Research and Treatment*.
22. Murcia MI, et al, 2007. Mycobacteria-HIV/AIDS association in patients attending a teaching-hospital in Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*. 9(1):97-105.
23. Perez-Martinez et al, 2013. Occurrence of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria in Mexican household potable water: a pilot study. *Biomedical Central Research Notes* 6:531.
24. Castillo-Rodal et al 2012. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatics systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. 31(5):683-694.
25. Brereton y Terafi, 2012. *Mycobacterium malmoense*: dissemination causes a popliteal aneurysm in a 74-year-old man. *BMJ Case Reports*.
26. Fujita et al 2014. Prevalence and risk factors for chronic co-infection in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *BMJ Open Respiratory Research*. 28:1(1).
27. Gommans et al. 2015. Risk factors for mortality in patients with pulmonary infections with non-tuberculous mycobacteria: a retrospective cohort study. *Respir Med*. 109(1):137-145
28. Montufar et al, 2014. Caracterización de pacientes hospitalizados con infecciones causadas por micobacterias no tuberculosis, en un hospital de alta complejidad en Colombia. *Journal of Infectology*. 18(4):135-142.
29. Suraprasit et al, 2014. Cutaneous miliar tuberculosis in a chronic kidney disease patient. *Case Reports in Dermatology*. 6(3):253-257.
30. Eyüboğlu et al, 2013. Evaluation of pulmonary infections in solid organ transplant patients: 12 years of experience. *Transplantation Proceedings*. 45(10).
31. Suwanpimolkul et al, 2014. Association between Diabetes Mellitus and tuberculosis in United States-born and foreign-born population in San Francisco. *PLoS ONE* 9(12): e11442. doi:10.1371/journal.pone.0114442
32. Durson Tatar et al, 2009. Tuberculosis in diabetics features in the endemic area. 62:423-427.
33. Peñuelas-Urquides, et al, 2014. Correlations between major risk factors and closely related *Mycobacterium tuberculosis* isolates grouped by their current genotyping procedures: a population-based study in northeast Mexico. 109(6):814-819. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*.
34. Lopez-Rocha et al. 2013. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, Mexico. *Research Notes*. 6:172.
35. Gunther et al, 2015. Multidrug-Resistant tuberculosis in Europe, 2010-2011. *Emerging Infectious Diseases*. 21(3):409-416.

36. Pérez de Castro Ana María, Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia.
37. Richter et al. 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacterium assay for identification of Mycobacterial species from cultures. *Journal of clinical microbiology*. p 1769-1775.
38. Russo et al, 2006. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *Journal of clinical microbiology*. p 334-339.
39. Sarkola et al, 2004. Prospective evaluation of the GenoType assay for the routine identification of mycobacteria. *European journal of clinical mycrobiology & infectious diseases*. 23:642-645.
40. Canueto-quintero et al, 2003. Epidemiological, clinical, and prognostic differences between the diseases caused by Mycobacterium kansasii and Mycobacterium tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus. A multicenter study. *Clinical infection diseases*. 34(4):584-590.
41. Waminathan et al, 2010. Efficacy of a 6-month versus 9-month intermittent treatment régimen in HIV-infected patients with tuberculosis: a randomized clinical trial. *Am J respir Crit Care Med*. 181(7):743-751.
42. Castruita Garcia Miguel, 2016. Frecuencia de resistencia a fármacos antituberculosos en pacientes mono infectados por Mycobacterium tuberculosis y en coinfección con VIH en un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. Universidad Nacional Autonoma de México. P 11-13.
43. Prat Aymerich Cristina, Dominguez Benitez Josep y Ausina Ruiz Vicenc. Mycobacterium Bovis. Servei de microbiología. Hospital universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona.
44. Griffith Et al, 2007. An oficial ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial dieases. *Am J Respir Crit Care Med*. 175(4): 367-416.
45. Gardner et al, 2005. Conventional and molecular epidemiology of macrolide resistance among new Mycobacterium avium complex isolates recovered from HIV-infected patients. *Clin Infect Dis*. 41(7):1041-1044.