



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

“IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS POR PCR-RFLP
(RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM)
DE *hsp65* EN CASOS DE TUBERCULOSIS GANGLIONAR
EN EL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN NEUMOLOGÍA

P R E S E N T A :

Dra. Elvia Sierra Romero

TUTOR DE TESIS:
Dr. Alejandro Hernández Solís
Servicio de Neumología HGM



México, DF.

Julio de 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS POR PCR-RFLP (RESTRICTION
FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM) DE *hsp65* EN CASOS DE
TUBERCULOSIS GANGLIONAR EN EL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres y hermanos por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

Al Maestro Cicero Sabido Raúl, por sus invaluable enseñanzas durante toda la residencia y por ser guía en este trabajo.

Al Dr. Pérez Romo Alfredo, por permitirme la formación como neumólogo en el Servicio de Neumología del HGM, brindarme su apoyo, y así poder realizar una de mis metas en la vida.

Al Dr. Hernández Solís Alejandro, por ser mi tutor de tesis, por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo, así como permitirme formar parte en otros más de sus trabajos enriqueciendo mi formación como residente.

Al Dr. Cueto Robledo Guillermo, por exhortarnos a ser mejores médicos, por todas sus enseñanzas, por su dedicación a la formación de los residentes, por su enorme apoyo en todo momento como profesor y en el ámbito personal.

A la Dra. Novelo, por su apoyo incondicional al residente, por sus valiosas enseñanzas, por compartir con el residente su conocimiento y enseñanza.

A todos los médicos adscritos al Servicio de Neumología del HGM, ya que de cada uno de ellos he recibido valiosas enseñanzas.

TUTOR DE TESIS

DR. ALEJANDRO HERNÁNDEZ SOLIS

Investigador en Ciencias Médicas B
Hospital General de México, O.D.

COTUTOR DE TESIS

DR. RAÚL CICERO SABIDO

Prof. Titular TC def.
Facultad de Medicina UNAM
Sistema Nacional de Investigadores II
Servicio de Neumología
Hospital General de México, O.D.

ASESOR

DR. ALFREDO PÉREZ ROMO

Prof. Titular del Curso de Neumología
Facultad de Medicina UNAM
Hospital General de México, O.D.

MTRO. ARTURO REDING BERNAL

Investigador tipo A del Departamento de Bioestadística
Dirección de Investigación
Hospital General de México, O.D.

MTRA. ILIANA ALEJANDRA CORTÉS ORTÍZ

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
Departamento de Biología Molecular

CONTENIDO

Resumen Estructurado.....	1
Antecedentes.....	3
Planteamiento del Problema	19
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	21
Metodología	22
Resultados	33
Discusión	38
Conclusiones	43
Referencias	44
Fotos y Algoritmos	47

R E S U M E N E S T R U C T U R A D O

Antecedentes: La tuberculosis (TB) es considerada por la OMS una enfermedad infecciosa emergente. No se cuenta con reportes epidemiológicos a nivel mundial ni en nuestro país acerca del número específico de los casos de tuberculosis ganglionar ya que se engloban en casos de tuberculosis extrapulmonar (TB extrapulmonar). La TB extrapulmonar, supone el 10-20% del total de TB que padecen los enfermos inmunocompetentes, incrementándose en las personas que son portadores de algún grado de inmunodeficiencia. La localización más frecuente de TB extrapulmonar es la ganglionar según lo reportado a nivel mundial. En el Hospital General de México de 2000 a 2006 dentro de los casos de TB extrapulmonar la ganglionar obtuvo un porcentaje de 27%. Las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas (MTB) se han incrementando en los últimos años presentándose lo que podemos llamar una transición epidemiológica. Sin embargo no se cuenta con los datos necesarios acerca de la distribución de los casos a nivel mundial. Por lo que surge la inquietud de trabajos como éste para conocer acerca de la epidemiología de estas infecciones.

Objetivo: Conocer los agentes de los casos de tuberculosis ganglionar mediante la identificación de especie con la utilización de la técnica de PCR-RFLP de *hsp65* realizado en cepas de micobacterias en medio de Löwestein-Jensen en el Hospital General de México (HGM), en el período comprendido de enero del 2008 a enero del 2010.

Metodología: Estudio epidemiológico molecular, prospectivo, observacional de casos consecutivos de la identificación de especies con la técnica de PCR-FRL del de *hsp65* de los cepas de micobacterias en medio de Löwestein-Jensen, de los casos de tuberculosis ganglionar en el HGM de enero del 2008 a enero del 2010.

Resultados: Se aisló en 17 casos (80.9%) a *Complejo Mycobacterium Tuberculosis* (*CM. Tuberculosis*) y en 4 casos (19%) se aislaron micobacterias no tuberculosas (1 caso de *M. avium subsp. avium*, 2 casos de *M. gordonae* y 1 caso de *M. kumamotoense*).

Conclusión: *CM. tuberculosis* fue el agente etiológico más frecuente de los casos de tuberculosis ganglionar que se estudiaron en el HGM de enero del 2008 a enero del 2010. Las técnicas constituyen una valiosa herramienta epidemiológica a nivel molecular en las distintas formas de tuberculosis extrapulmonar.

ANTECEDENTES

Hoy en día la tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa emergente con 8 millones de casos nuevos y que causa alrededor de 2 millones de muertes al año en todo el mundo. ¹

La tuberculosis ganglionar o escrófula, afectó a los seres humanos desde hace cientos de años, se han encontrado reportes en escritos de Hipócrates (460-377 a.C.) y Herodoto (484?-425?). Esta enfermedad fue conocida como la “Maldición de los Reyes” durante la Edad Media, en Europa, por la aparente curación de muchos casos después que el rey los tocaba. ²

No se cuenta con reportes epidemiológicos a nivel mundial ni en nuestro país acerca del número específico de los casos de tuberculosis ganglionar ya que se engloban en casos de Tuberculosis extrapulmonar (TB extrapulmonar).

La OMS reportó los siguientes datos acerca de los casos de tuberculosis en nuestro país hasta el año 2009, total de casos 18, 127, de los cuales 3, 193 (18%) son casos de TB extrapulmonar. ³

En nuestro país los casos de tuberculosis se reportan como casos de tuberculosis pulmonar, meníngea y otros incluyendo en este último a los casos de tuberculosis pleural, ganglionar, urogenital, ósea y miliar. El CENAVECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades) reportó un total de 18,011 casos de tuberculosis en el 2009, correspondiendo

2,898 casos de otras formas, refiriéndose a las formas distintas a la tuberculosis pulmonar.⁴

La TB extrapulmonar, en su conjunto, supone el 10-20% del total de TB que padecen los enfermos inmunocompetentes, aunque esta frecuencia de presentación se incrementa notablemente en las personas que son portadores de algún grado de inmunodeficiencia.⁵

De acuerdo a lo escrito en el programa de acción específico 2007-2010 sobre Tuberculosis de la Secretaría de Salud, en nuestro país las localizaciones extrapulmonares más frecuentes son la ganglionar, pleural, urogenital, osteoarticular, meníngea y miliar.⁵

El Hospital General de México reportó los siguientes datos acerca de la distribución de los casos de TB extrapulmonar del año 2002 a 2006: ganglionar 27%, SNC (Sistema Nervioso Central) 19%, diseminada 16%, cutánea 12%, peritoneal 10%, renal 9%, ósea 5%, pleural 1%, ocular 1%. Siendo este un hospital de concentración de tercer nivel destaca la importancia que tiene la tuberculosis ganglionar como principal forma de presentación de la TB extrapulmonar.

Las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas (MTB) se han incrementando en los últimos años presentándose lo que se conoce como una transición epidemiológica.⁶ En los últimos 15 años ha crecido el interés en estas enfermedades debido a su asociación con el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) y el creciente número de infecciones pulmonares

por estas micobacterias en pacientes VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) negativos.⁷

Existe una gran variabilidad geográfica tanto en la prevalencia de micobacteriosis como de las especies responsables de ella. La más frecuentemente aisladas en el mundo son, por orden importancia, *M. avium complex*, *M. Kansasii* y *M. abscessus*, pero otras como *M. xenopi*, *M malmoense*, *M. simiae* y *M. zulgai* son frecuentes en determinadas regiones geográficas.⁸

Su incidencia anual varía según los países, oscilando entre 0.7-1.8 por 100,000 habitantes. La tasa de infecciones por MNT en países industrializados se reporta en 1.0 a 1.8 por 100,000 habitantes.^{7,8}

Se estima que constituyen desde menos del 1% del total de enfermedades causadas por micobacterias en algunas provincias de Japón, hasta 30% y más en ciertas regiones de los E.U.⁸

En Estados Unidos las infecciones por micobacterias no tuberculosas son causadas más frecuentemente por el *Complejo Micobacterium Avium (CMA)*.⁷

Las cifras correspondientes a América Latina son poco fidedignas.⁸ Es difícil conocer los datos exactos del número de infecciones causadas por MNT, ya que éstas no son enfermedades que se reporten de forma obligatoria por no conocerse transmisión humano-humano.⁶

En el Hospital General de México se han realizado estudios con la utilización de pruebas de biología molecular, que muestran a *M. tuberculosis* como

microorganismo causal de linfadenopatías cervicales y a *M. bovis* como agente etiológico en las formas de TB extrapulmonar en pacientes VIH negativos y VIH positivos.^{9,10}

AGENTES ETIOLÓGICOS

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* lo conforman: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. Africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* y *M. caprae*.⁸

M. tuberculosis es un bacilo delgado, ligeramente curvado, de 1 a 4 micrones de longitud, que se tiñe en forma irregular, dando un aspecto en cuentas de rosario, su pared celular es la más compleja de entre todas las bacterias conocidas, posee una membrana gruesa, difícil de traspasar compuesta por ácidos-micólicos, a estos se debe su peculiar tinción ácido-alcohol resistente obtenida con técnicas como la de Ziehl-Neelsen o Kinyoun, las cuales son rápidas y sencillas, siendo posible también la utilización de técnicas con fluoroscopía para su detección. Su estructura química esta dada por proteínas, carbohidratos, vitaminas del complejo B y minerales como fósforo, magnesio y calcio. No produce toxinas, sin embargo tiene un componente antigénico complejo que determina diferentes grados de virulencia y patogenicidad. Otra de sus características es su muy lenta capacidad de división (sesenta veces inferior a la de un estafilococo), su crecimiento esta subordinado a la presencia de oxígeno y pH circundante, siendo las condiciones ideales para su multiplicación un pH de 7.30 a 7.40 y una presión de oxígeno de entre 100 y 140 mmHg.^{8, 11}

La transmisión es persona a persona, siendo la principal la vía aerógena, por partículas con un tamaño de 1 a 5 μm llamadas partículas de Wells que son capaces de alcanzar y depositarse en los alvéolos y que se derivan de las gotitas de Pflüger las cuales tienen un tamaño de 5 a 10 μm y se depositan en vías aéreas más proximales.^{8, 11}

Otros mecanismos de transmisión es la digestiva para *M. bovis*, urogenital a través de la orina o por transmisión sexual y la cutáneo-mucosa, por inoculación directa, especialmente durante las autopsias y por vía transplacentaria, sobre todo en casos de tuberculosis miliar de la madre.⁸

Las micobacterias no tuberculosas son las micobacterias diferentes de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, durante muchos años denominadas micobacterias atípicas, o con otras denominaciones como micobacterias diferentes de *M. tuberculosis* (MOOT), micobacterias oportunistas, micobacterias no clasificadas, micobacterias anónimas y más recientemente y al parecer el más adecuado micobacterias ambientales (MA).⁸

Las MNT se encuentran en el agua natural y potable, suelo, polvo, plantas, alimentos y excretas de aves y animales domésticos. Se benefician de la cloración del agua, que mata otros gérmenes que crecen más rápidamente.^{8, 11}

Actualmente existen identificadas 151 especies de micobacterias no tuberculosas gracias al desarrollo de las nuevas técnicas de biología molecular y la aceptación de la secuenciación de 16S rRNA como estándar para la identificación de especies.^{7, 12}

La primera clasificación de MNT patógenas para el hombre por Runyon en 1959, conserva aún utilidad clínica, sobre todo en países que no cuentan con recursos. Esta distinguió cuatro formas según su velocidad de crecimiento en medios de cultivo sólidos, su propiedad de producir o no pigmentos cuando eran expuestas a la luz (fotocromógenas o acromógenas) y en las oscuridad (escotocromógenas).⁸

I.	Fotocromógenas (a La exposición a La luz): M. kansasii
II.	Escotocromógenas (coloreadas sin exposición a la luz): M. scrofulaceum
III.	Acromógenas: complejo M. avium complex
IV.	De crecimiento rápido (< 7 días: M. abscessus, M. fortuitum)

Una segunda clasificación distingue las especies del género *Mycobacterium* según su velocidad de crecimiento, su reservorio principal y su capacidad de producir enfermedad en el hombre o en los animales.⁸

Micobacterias de crecimiento lento	Micobacterias de crecimiento rápido
Especies cuyo reservorio es un mamífero infectado	Especies cuyo reservorio es el ambiente
Patógenas para el hombre	Asociadas a enfermedades humanas
<i>M. africanum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. mucogenicum</i>
Patógenas para otros animales	<i>M. novocastrense</i>
<i>M. lepraemorium</i>	<i>M. peregrinum</i>
<i>M. microti</i>	Asociadas a enfermedades em animales
<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. porcinum</i>
Espécies cuyo reservorio principal ES El ambiente	Nunca o raramente asociadas a enfermedades humanas
Asociadas a enfermedades humanas	<i>M. agri</i>
<i>M. asisticum</i>	<i>M. aichiense</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. alvei</i>
<i>M. cranderi</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. austroafricanum</i>
<i>M. conspicuum</i>	<i>M. brunae</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. chitae</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. chlorophenolicum</i>
<i>M. interjectum</i>	<i>M. chubuense</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. confluentis</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. diernholen</i>
<i>M. malmoense</i>	<i>M. duvalii</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. falax</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. flavencens</i>
<i>M. chimoidei</i>	<i>M. gadium</i>
	<i>M. gilvum</i>

<i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. triplex</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i> Asociadas a enfermedades animales <i>M. farcinogenes</i> Nunca o raramente asociadas a enfermedades humanas <i>M. cooki</i> <i>M. gastris</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i>	<i>M. hassiacum</i> <i>M. holderi</i> <i>M. komossense</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. moriokaense</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. obuense</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. proriferae</i> <i>M. pulveris</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. sphagni</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. tokiense</i>
---	---

La tercera clasificación, más actual, se basa en los órganos a los que afectan y en las enfermedades que producen. ⁸

Enfermedad	Especie común	Geografía	Morfología	Inusuales
Pulmonar	<i>M. avium complex</i>	Todo el mundo	Lento crecimiento, no pigmentada	<i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i>
	<i>M. kansasii</i>	EE.U.U., Europa	Pigmentada	<i>M. fortuitum</i> <i>M. celatum</i>
	<i>M. abscessus</i>	Todo el mundo, pero mayoría EE.UU.	Crecimiento rápido No pigmentada	<i>M. asiaticum</i> <i>M. shimodiei</i>
	<i>M. xenopi</i>	Europa, Canadá	Lento crecimiento, pigmentada	<i>M. haemophilum</i>
	<i>M. malmoense</i>	Norte de Europa, Inglaterra	Lento crecimiento, no pigmentada	<i>M. smegmatis</i>
Linfadenitis	<i>M. avium complex</i>	Todo el mundo	Por lo general no pigmentada	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>
	<i>M. scrofulaceum</i>	Todo el mundo	Pigmentada	<i>M. abscessus</i> <i>M. kansasii</i>
	<i>M. mamoense</i>	Norte de Europa, Inglaterra	Lento crecimiento	<i>M. haemophilum</i>
Cutánea	<i>M. marinum</i>	Todo el mundo	Fotocromógena, bajas temperaturas	<i>M. avium complex</i> <i>M. kansasii</i>
	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>	Todo el mundo, aunque mayoría EE. UU.	Rápido crecimiento, no pigmentada	<i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. smegmatis</i>
	<i>M. abscessus</i>	Australia, trópicos	Crecimiento lento, pigmentada	<i>M. haemophilum</i>

	<i>M. ulcerans</i>	África, Asia		
Diseminada	<i>M. avium complex</i>	Todo el mundo	Cultivos de VIH, pigmentada Fotocromógena	<i>M. abscessus</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. malmoense</i>
	<i>M. kansasii</i>	EE. UU.	No pigmentada	<i>M. genavense</i>
	<i>M. chelonae</i>	EE. UU.	No pigmentada,	<i>M. simiae</i>
	<i>M. haemphilum</i>	EE. UU., Australia	requiere hemina, bajas temperaturas y CO2	<i>M. conspicuum</i> <i>M. marium</i> <i>M. fortuitum</i>

Los mecanismo de transmisión más aceptados son, en la afección respiratoria, la aerosolización de microorganismos en el ambiente; en las linfadenitis de los niños, la ingestión por vía digestiva, y en las formas diseminadas del SIDA, la colonización del tracto digestivo. En pacientes con infecciones de partes blandas se ha descrito la inoculación directa de microorganismos desde el agua y otros elementos ambientales.⁸

FISIOPATOGENIA

La linfadenitis por micobacterias, en los adultos el 90% de los casos de afección periférica es causada por *M. tuberculosis*, en niños menores de 5 años de edad en el 70-80% de los casos se aísla *M. avium complex* y solo en 10% *M. tuberculosis* y el resto de los agentes son *M. scrofulaceum* y otras MNT.⁸

A partir del foco primario existe diseminación hacia los ganglios linfáticos regionales, aquí los microorganismos continúan diseminándose por medio del sistema linfático hacia otros ganglios y de allí hacia otros una vez que acceden al torrente sanguíneo en pequeña cantidad, desde donde se pueden rediseminar a cualquier órgano del cuerpo, esta forma de diseminación linfohematógena por lo general es autolimitada y más del 90% de las

infecciones primarias cura. La reactivación puede ocurrir como la recrudescencia tardía de microorganismos latentes, que se hallan presentes en los ganglios linfáticos que fueron invadidos durante la infección primaria.^{2, 13}

Hasta que punto resultan afectados los ganglios linfáticos y durante cuánto tiempo hay manifestaciones de infección primaria a nivel de ganglios linfáticos depende de la edad, estado inmunitario, raza y sexo.²

Actualmente, la mayoría de las linfadenitis tuberculosas son una manifestación postprimaria de la infección por *M. tuberculosis*, ya sea por extensión retrógrada desde ganglios intratorácicos o por diseminación linfohematógena y predomina en mujeres y asiáticos e indios americanos, es menos frecuente en la raza blanca.⁸

La linfadenitis debida a MTN se transmite del medio ambiente por digestión, inhalación, inoculación etc. La puerta de entrada para MNT pueden ser la mucosa oral o gingival. Esto es particularmente importante en niños donde la decidua de los dientes es el puerto de entrada para que las MNT puedan alcanzar el cuello y sitios alrededor de la mandíbula.¹³

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Dentro de la TB linfática, se describen dos grandes entidades, la que afecta a cadenas ganglionares periféricas (escrófula) y la que afecta fundamentalmente a adenopatía internas.⁸

La tuberculosis ganglionar periférica se puede desarrollar en cualquier parte del organismo, incluyendo regiones axilares, inguinales, etc., pero en más del 90%

de los casos se localiza en el cuello, con mayor afección de las cadenas ganglionares cervicales posteriores y menos frecuente en la región supraclavicular.^{8,13}

En el caso muy poco frecuente de invasión a los ganglios axilares, inguinales u otros periféricos distintos a los cervicales, se debe tratar de identificar la presencia de algún foco de infección primaria en alguna extremidad.²

El cuadro clínico puede ser bastante anodino. Consiste en la aparición de uno o más ganglios indoloros, de consistencia firme o renitente, aunque cuando presentan caseosis central y se reblandecen, son más bien fluctuantes, pudiendo llegar a constituir verdaderas masas ganglionares, con escasos o nulos síntomas generales o locales. Lo habitual es que más temprano que tarde aparezcan manifestaciones de inflamación cutánea y, menos frecuentemente, fiebre o síntomas sistémicos. Pero, el cuadro puede permanecer indolente durante semanas, meses y aún años. El compromiso puede ser uni o bilateral, afectando grupos contiguos o alejados.⁸

Cuando no hay tratamiento, la inflamación continúa produciendo síntomas inflamatorios locales como calor, dolor y rubor, frecuentemente dando un color azulado o violáceo a la piel adyacente. Si en ese momento no se procede con rapidez, puede producirse una fistulización ganglionar crónica, de muy lenta e indolora cicatrización. Este proceso, dejado a su evolución espontánea tiende a seguir un curso crónico, unas veces tórpido y otras tormentoso, con el vaciamiento intermitente de pus caseoso, cicatrizaciones incompletas, nuevas fistulizaciones y finalmente la instalación de las clásicas y antiestéticas

cicatrices de la escrofulosis, como una marca indeleble de la curación de la enfermedad.⁸

La linfadenitis por MNT se presenta típicamente como ganglios cervicales o faciales inflamados, no dolorosos, seguido de decoloración púrpura de la piel y no síntomas sistémicos. Los ganglios más afectados son los submandibulares, cervicales o preauriculares (usualmente uno o más ganglios del mismo lado, y la edad de presentación más frecuente son niños de 1 a 5 años, con edad media de 3 años y es raro que se presente después de los 12 años.¹⁴

En cuanto a las cadenas ganglionares internas, actualmente es frecuente encontrarla en adultos con SIDA y que tienen un marcado déficit inmunitario. También en estos enfermos se describe TB ganglionar de otros territorios, como abdominal, etc.⁸ La sintomatología estará relacionada sobretodo por obstrucción de estructuras vecinas.¹⁴

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial de la tuberculosis ganglionar más importante hay que hacerlo con la linfadenitis producida por micobacterias ambientales que como ya se mencionó son los agentes causales en 80% aprox. de los casos en niños y 10% aprox. en adultos.²

Otros diagnósticos diferenciales son padecimientos infecciosos (virus, clamidia, bacterias, hongos y toxoplasma), neoplasias (linfoma, sarcoma, enfermedad de Hodgkin, carcinoma metastático), reacciones medicamentosas (hidantoína), saroidosis, hiperplasia reactiva inespecífica e inflamación de otras estructuras

del cuello de origen no linfóide (glándulas parótidas, submandibulares, quistes del arco branquial, higroma quístico o tumor del cuerpo carotídeo).^{2,13}

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Para llegar al diagnóstico de certeza se debe intentar obtener muestras de biopsia de las zonas afectadas, ya sea por punción aspirativa con aguja fina (PAAF) que en caso de adenopatías mediastínicas es posible mediante el uso del broncoscopio, realizar baciloscopia, cultivo y análisis histopatológico. Sólo cuando la PAAF no es diagnóstica y siguen existiendo dudas etiológicas razonables, está indicada la biopsia ganglionar, intentando extraer ganglios enteros, ya que secciones de ellos pueden favorecer fistulizaciones postoperatorias.^{8,15}

Debe enviarse una parte del material a un patólogo experimentado, quien puede encontrar citología representativa de los clásicos granulomas tuberculoideos caseosos y otro trozo, sin fijar, en un frasco con suero o agua bidestilada, al bacteriólogo para que practique una baciloscopia, que raramente muestra los bacilos al examen directo y un cultivo que es positivo hasta en el 70% de los casos. Solo es confirmatorio si se logra el aislamiento de la cepa de *M. tuberculosis* en cultivos sólidos y líquidos.⁸

Es importante reconocer que, en general las formas extrapulmonares de tuberculosis tienen menos carga bacilar por lo que estas pruebas tienen baja sensibilidad, siendo la sensibilidad de la baciloscopia para las muestras no pulmonares es de 30.2%. El cultivo es positivo en 8.4% para las muestras extrapulmonares.¹⁵

Dentro de las nuevas técnicas de diagnóstico se han empleado la determinación de anticuerpos (Acs) dirigidos contra antígenos (Ags) específicos de las micobacterias con la técnica de ELISA, que en el estudio realizado en el Hospital General de México en casos de tuberculosis ganglionar tuvo una sensibilidad de 50% y especificidad de 90%.⁹

Un diagnóstico diferencial de la especie de las cepas que forman el complejo *Mycobacterium tuberculosis* es importante, pues implica la administración de una adecuada pauta de tratamiento.¹⁶

Así como la detección rápida y eficaz de las micobacterias no tuberculosas que actualmente se conocen son 151, resulta crucial para la adopción de una correcta terapia específica, ya que estas especies poseen diferentes patrones de susceptibilidad frente a los fármacos antituberculosos permitiendo su pronta recuperación y evitando una posible diseminación de la enfermedad.^{13, 17}

Los métodos de laboratorio que se han utilizado para la identificación de la especie se basan en el crecimiento, características microscópicas, propiedades fenotípicas y bioquímicas. Sin embargo estas tienen las siguientes como principales desventajas la lentitud, que son laboriosas y no reproducibles.^{18,19}

Los métodos de biología molecular son otra de las alternativas que se han empleado con buenos resultados para el diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas.¹⁸

Una de las más utilizadas en los laboratorios es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la síntesis in Vitro de un fragmento de DNA de forma que en cada ciclo del proceso se duplica el número de moléculas.¹⁹

Para la identificación de la especie de micobacteria existen métodos de hibridación con sondas y otros que se basan en la amplificación de una región específica del genoma, sin embargo los resultados de estas son limitados a una sola especie.²⁰

Los métodos que utilizan el principio del análisis de los productos de digestión de enzimas de restricción de genes específicos como el 17SrRNA o el dnaJ pueden distinguir diferentes tipos de especies con un solo experimento.²⁰

La identificación de la especie de micobacteria por PCR-FRLP de *hsp65*, basado en el análisis de los productos obtenidos por enzimas de restricción (BstEII y HaeIII) de la PCR obtenida del gen *hsp65* (perteneciente a una proteína de choque térmico presente en todas las micobacterias) que, obtenido por iniciadores (Tb11 5'-ACCAACGATGGTGTGTCAT y Tb12 5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT) comunes a todas las micobacterias, se propuso en 1993 por Telenti y col. quienes propusieron un algoritmo para la identificación de 33 especies. Esta técnica ofrece la ventaja de identificar varias especies con un solo experimento y la utilización de solo dos enzimas de restricción a diferencia de los otros métodos que utilizan un mayor número de enzimas de restricción.²¹

En el estudio de Devallois en 1997 se realizó la identificación de 34 diferentes especies de micobacterias por medio de la utilización de PCR-RFLP de *hsp65*

en 108 cepas de las que correspondían a 43 cepas de referencia y 65 aislamientos clínicos, obteniéndose 49 patrones distintos, caracterización de 25 especies con un solo patrón y 9 especies con más de un patrón. En base a los resultados se propuso un algoritmo para la diferenciación de 34 especies.²⁰

Bruello y col., en 2001 identificaron 54 especies por medio del método de PCR-RFLP de *hsp65* con la modificación al mismo con respecto a los estudios previos del cambio del gel de agarosa al 3% a gel de poliacrilamida al 10% para la realización de la electroforesis, con lo que la longitud de los fragmentos fueron más cercanas a lo real. El algoritmo que se propuso incluyó 32 especies ya descritas y 22 especies adicionales.²²

Chimara y col. en 2008 realizaron con la técnica de PCR-FRLP de *hsp65* la identificación de micobacterias, en 5010 cultivos que se recabaron de enero de 2000 a enero de 2001 en el Instituto Adolph Lutz en San Paulo Brasil, se obtuvieron 434 aislamientos. Se utilizaron pruebas fenotípicas convencionales y PCR-FRLP de *hsp65* para todos los aislamientos y cuando los resultados eran discordantes por estos métodos se realizó la secuenciación de 441 pares de bases de un fragmento de *hsp65*. La evaluación fenotípica y por PCR coincidió en 321 (74%) aislamientos. Se encontraron 13 patrones no descritos previamente. Se concluyó que la prueba de PCR-FRLP de *hsp65* fue más precisa que las pruebas fenotípicas (92(90.3%) frente a 338 (77.9%) respectivamente; $p < 0.0001$).²³

Se realiza el presente estudio con el objetivo de identificar los casos de tuberculosis ganglionar causados por micobacterias no tuberculosas, así como

la identificación de la especie, por métodos de biología molecular en muestras de cultivos obtenidas en el laboratorio de Micobacteriología de la Unidad de Neumología del Hospital General de México.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál será la frecuencia de las Micobacterias No Tuberculosas como agente etiológico en los casos de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México?

¿Cuál será la frecuencia del *Complejo Mycobacterium tuberculosis* como agente causal de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México?

¿Cuáles serán las especies de Micobacterias No Tuberculosas identificadas en cepas aisladas de tuberculosis ganglionar ?

JUSTIFICACIÓN

La linfadenitis por micobacterias es un padecimiento que puede estar causado bien por *Mycobacterium tuberculosis* o por micobacterias no tuberculosas por lo que la identificación rápida es crucial para una correcta terapia específica, además de que conocer la especie es una herramienta básica en la vigilancia de la salud pública. Los métodos de identificación de especies que se basan en la velocidad de crecimiento, características microscópicas, propiedades fenotípicas y bioquímicas tienen como desventajas ser poco accesibles, lentos y no reproducibles sin embargo tienen como ventaja ser más sencillos. A nivel mundial existen reportes que indican un cambio en la epidemiología de las enfermedades producidas por micobacterias no tuberculosas, en donde se encuentra incremento en las infecciones pulmonares y extrapulmonares, en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Por tal motivo se realiza este trabajo ya que el método de PCR-FRLP de *hsp65* es una prueba que permite la fenotipificación del *CM Tuberculosis* y MNT en cepas obtenidas de cultivos Löwestein-Jensen. Este trabajo se realizó en el laboratorio de micobacterias de la Unidad de Neumología del HGM que es un hospital de tercer nivel que atiende a pacientes con esta patología sería de gran utilidad. .

HIPÓTESIS

La frecuencia de Micobacterias No Tuberculosas es alta como agente etiológico de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México .

El CM. tuberculosis será el agente causal más frecuente en los casos de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México.

No se encontrará diferencia en lo reportado en la literatura internacional con respecto a la fenotipificación de las especies de Micobacterias No Tuberculosas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer la epidemiología de los agentes causales de casos de tuberculosis ganglionar mediante la identificación de especie con la utilización de la técnica de PCR-RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORFISM) de *hsp65* realizado en cultivos de micobacterias en medio de Löwestein-Jensen de muestras de ganglios de casos de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México, en el período comprendido de enero del 2008 a enero del 2010.

Objetivos específicos

- Describir la frecuencia de los casos de tuberculosis ganglionar causados por Micobacterias No Tuberculosas
- Describir la frecuencia de los casos de tuberculosis ganglionar causados por *CM. tuberculosis*.
- Describir la fenotipificación de las cepas aisladas de pacientes de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México

M E T O D O L O G Í A

Tipo de Estudio:

Estudio epidemiológico molecular, prospectivo, observacional de casos consecutivos con el propósito de identificar las especie de los cepas de micobacterias en medio de Löwestein-Jensen con la técnica de biología molecular conocida como PCR-RFLP de hsp65 de obtenidos de casos de tuberculosis ganglionar que se realizaron en el Laboratorio de Micobacteriología de la Unidad de Neumología y Cirugía de Tórax “Dr Alejandro Celis” del Hospital General de México de enero de 2008 a enero de 2010.

Población y Tamaño de la Muestra

Se incluyeron todas las cepas aisladas en cultivo de Löwestein-Jensen de biopsias de tuberculosis ganglionar en el período comprendido de enero del 2008 a enero del 2010 que se realizaron en el Laboratorio de Micobacteriología de la Unidad de Neumología y Cirugía de Tórax del Hospital General de México. La muestra que se obtuvo fue de 21 cepas aisladas.

Criterios de selección

Inclusión

- Casos de tuberculosis ganglionar con cultivo positivo en medio de Löwestein-Jensen que se aislaron en el laboratorio de Micobacteriología del Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax del Hospital General de México de enero de 2007 a enero de 2010.

No inclusión

- Casos de tuberculosis ganglionar con cultivo negativo para micobacterias.

Descripción de Variables Utilizadas

VARIABLES	TIPO Y FORMA DE MEDICIÓN
Edad	Cuantitativa discreta
Antecedente de haber recibido fármacos antituberculosos	Cualitativa Nominal Dicotómica
Cultivo de Löwestein-Jensen	Cualitativa Nominal Dicotómica
Resultado de análisis de PCR-FRLP hps65	Cualitativa Ordinal

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron todos los pacientes que acudieron con lesiones ganglionares clínicamente sospechosas de probable tuberculosis, en el periodo comprendido de enero del 2008 a enero del 2010. Se incluyeron pacientes mayores de 15 años con sospecha clínica de tuberculosis ganglionar sin antecedentes de haber recibido terapia con drogas anti-tuberculosas y VIH negativos.

De cada uno de los paciente se integró un expediente clínico junto con exámenes complementarios de laboratorio y el resultado de la prueba cutánea con el derivado purificado de la proteína (PPD-RT23, 5TU, Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca), a todos se les practicó radiografía de tórax. Se realizó biopsia del sitio de la lesión afectada para el análisis histopatológico, microbiológico y de biología molecular.

La conservación de las biopsias se hizo a 4°C, en condiciones asépticas, se dividieron en tres porciones: para el estudio histopatológico, diagnóstico

bacteriológico y análisis de biología molecular con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El procedimiento para el estudio histopatológico incluyó la fijación de los fragmentos en formol al 10%, extensión en parafina, sección y tinción con eosina-hematoxilina, se examinaron al microscópico para determinar sus características, se consideraron como tuberculosas cuando se observaron formación típica de granulomas con focos de necrosis caseosa con una cápsula hialina, presencia de células epiteloideas y fibrosis.

El estudio de laboratorio los fragmentos de biopsias inició con la descontaminación y concentración por el método de Petroff. Se realizaron cultivos de 0.1 mL de los homogenizados que se inocularon en el medio líquido de BACTEC MGIT960 (Tubo del indicador del Crecimiento de Mycobacterium. Becton Dickinson, San José, CA.) conservándose a 37°C. En el medio de Löwenstein-Jensen, se incubaron las siembras a 37°C por ocho semanas. Los cultivo se inspeccionaban semanalmente para valorar el crecimiento. La presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), se determinó con tinción de Ziehl-Neelsen.

Se realizó diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* por amplificación en punto final, el cual es un método "in vitro" basado en la amplificación de un segmento específico del genoma de la micobacteria. Es una reacción altamente sensible y específica que se utiliza un par de iniciadores para un fragmento de la secuencia de inserción llamado IS6110 Esta secuencia es específica para el *CM. tuberculosis*. El complejo tiene de dos a veinte copias de esta secuencia en su genoma. En esta reacción se llevan a cabo tres pasos (amplificación, desnaturalización y extensión) de las

cadenas de DNA que aunado a las temperaturas de cada uno de esos pasos, amplifica las cadenas de DNA encontrando sus homólogas dando como resultado los productos de amplificación que se visualizan en un gel de electroforesis.

Sistema de muestra primaria: Muestras clínicas provenientes del paciente donde se tenga sospecha de la presencia del microorganismo.

Equipos: Gabinete de Bioseguridad tipo II, Termociclador de punto final, Micropipetas de 2 a 20 ul en el área blanca, en el área de disposición, en el área de testigo positivo, Vortex.

Materiales: Tubos para PCR de 200 ul, Puntas con filtro y talle largo de 10 ul.

Reactivos y materiales biológicos: Iniciadores específicos: IS2L (CAC GCT AAT TAC CCG GTT CG), IS3LR (ATC GCG CAG CTC GCG GCG G), DNA extraído de las diferentes muestras clínicas, Desoxinucleotidos trifosfatados (Deosynucleoside triphosphate Set, PCT grade, Roche, Germany), Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase, Roche Diagnostics, Germany; Invitrogen, Life Technologies, USA), Amortiguador de la polimerasa, Cloruro de Magnesio, Agua grado Biología Molecular (Roche, Germany)

La Metodología que se siguió fue la siguiente:

Área blanca: 1) Llenar el protocolo de PCR punto final (anexo), considerando dos volúmenes en cada muestra (1.5 y 8 ul de DNA), incluir el tubo para el testigo positivo y el blanco de reactivos 2) Realizar la limpieza del área de trabajo 3) Descongelar los reactivos para su uso 4) Marcar el tubo de 1.5 ul o

500ul (dependiendo del volumen de cóctel total) para preparar el cóctel de PCR, y marcar también los tubos de PCR (200 ul) de acuerdo al orden del protocolo para las muestras 5) Colocar los tubos en bloques fríos para evitar que los reactivos se degraden 6) Para preparar el cóctel de amplificación seguir el orden y el volumen de los reactivos que viene impreso en el protocolo por el número de muestras a trabajar. 7) Dispensar 47 ul en cada tubo de PCR previamente marcado. Tapar el tubo después de agregar la mezcla. 8) Al terminar de dispensar, guardar inmediatamente los reactivos a -20°C y limpiar el área de trabajo 9) Mantener a 4°C hasta su uso.

Área de adición de moldes: 1) Recoger los tubos de PCR con la mezcla de amplificación del Área blanca y transferirlos al área de adición de moldes 2) Antes de colocar el DNA, resuspender mediante vortex 3) Adicionar el DNA problema conforme el orden dispuesto en el protocolo, cerrando cada tubo después de haberlo añadido.

Área de testigo positivo: 1) Transferir los tubos del área de adición de moldes al área de testigo positivo 2) Abrir el tubo destinado para testigo positivo y añadir 1.5 ul del DNA proveniente de la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37RV 3) Cerrar el tubo, y dirigirse al área de instrumentación.

Área de instrumentación: 1) Encender el equipo (este puede ser previamente encendido no más de 10 min 2) Elegir el programa de amplificación correspondiente que posea las siguientes condiciones de reacción, por 45 ciclos: 94°C por 1 min, 90°C por 15 seg, 70°C por 50 seg, 72°C por 7 min, 4°C infinito 3) Precalear el equipo a la temperatura de 94°C, pausar el equipo. 4)

Colorar los tubos dentro del termociclador 5) Cerrar el equipo y quitar la pausa 6) Verificar que el programa este corriendo perfectamente 7) Al término del programa de amplificación, retirar los tubos y apagar el equipo 8) Guardar las amplificaciones a -20°C o realizar la electroforesis en gel directamente.

Interpretación: Terminada la PCR se procede a visualizar lo amplificado a través de una electroforesis comparando los resultados con el control positivo

Control de calidad: En el tubo blanco no deberá haber amplificación del producto esperado, visualizado en el gel de electroforesis.

Interferencias: Contaminación de los reactivos con productos de PCR y del blanco de extracción. Utilizar cocteles de amplificación preparados por más de 24h.

Medidas de bioseguridad: Tipo II

IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE MICOBACTERIAS

Es principio del método es la identificación de especie de micobacterias que se basa en la amplificación de un fragmento del gene *hps65* de 439 pares base que codifica para una proteína de choque térmico presente en todas las micobacterias. Se utilizan los iniciadores Tb11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT), y Tb12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT) y la digestión con enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*. Posteriormente, la identificación se realiza por la determinación de los tamaños de los fragmentos de digestión según algoritmos de referencia.

Sistema de muestra cerrada: Extracción o liberación de ácidos nucleicos a partir de cultivos bacterianos.

Tipo de contenedor y aditivos: Suspensión líquida bacteriana desactivada en agua grado biología molecular, caldo de MGIT o chelex al 5%, en criotubos de 1.5 ml.

Equipos: Incubadora a 37 °C, Horno de hibridación, Termociclador, Vortex, Micropipetas de 10 µl, 100 µl, Congelador de -20 °C, Refrigerador 4 °C, Calentador de bloque Multi-blok, Cámara de electroforesis para geles submarinos, Fuente de poder, Fotodocumentador de imágenes Eagle-eye

Materiales: Tubos para PCR de 200 µl, Tubos para microcentrífuga de 500 µl, Puntas para micropipeta de 10 µl, Puntas para micropipeta de 200µl, Gradillas para tubos de microcentrífuga

Amplificación: Iniciadores Tb11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT), y Tb12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT), Enzima Taq DNA polimerasa, Amortiguador de reacción, Desoxinucleotidos, Cloruro de magnesio, Agua inyectable, Dimetil sulfóxido

Digestión: Enzima de restricción Bst EII (Roche, Germany), Amortiguador de digestión para la enzima Bst EII, Enzima de restricción Hae III (Roche, Germany), Amortiguador de digestión para la enzima HaeIII, Agua grado Biología Molecular (Roche, Germany).

La técnica sigue los siguientes pasos:

- Preparar de reactivos para su uso.
- Titulación de iniciadores nuevos.
- Ajustar a una concentración de 1 uM/ul a cada iniciador. A partir de esta suspensión se realizan diluciones 1:10, 1:20, 1:40 de cada iniciador, y se prueban contra la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* para encontrar la dilución adecuada de trabajo.

Amplificación del gene *hsp65*.

Llenar el formato F-DITI-04. Realizar los cálculos necesarios de acuerdo al número de muestras trabajadas. Seleccionar el programa hsp capturado en el termociclador que consiste en 1 ciclo de 94 °C por 1 min; 45 ciclos de 94°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; 1 ciclo de 72 °C por 7 min. Los productos de PCR resultantes se confirman por electroforesis en agarosa.

Digestión enzimática del producto amplificado

Llenar el formato F-DITI-05 para la digestión con enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII* tomando en cuenta el número de muestras a digerir. Preparar el cóctel como lo muestra el formato y repartir 15 ul del mismo en cada tubo. Adicionar 5 ul de la muestra (producto de PCR) e incubar a 60 °C para las reacciones con *BstEII* , y a 37 °C para *HaeIII*, por 1 hora.

Electroforesis de los productos de digestión

Los productos de digestión se analizan mediante electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 4% y se comparan con los algoritmos de referencia.

Intervalo reportable: Micobacterias que se encuentren dentro del algoritmo publicado por Devallois y cols. (1997), Brunello y cols (2001) y Chimara y cols (2008).

Valores de alerta críticos: Que la cepa testigo no concuerde con el RFLP esperado para su identificación.

La interpretación se realiza de acuerdo a los tamaños de los fragmentos de restricción según algoritmos propuestos por Telenti, Brunello, Devallois y Chimara. En caso de obtener un patrón de restricción que no concuerde con ningún de los algoritmos mencionados, se procederá a secuenciar el gene *hsp65* para la tipificación de especie de la micobacteria.

Medidas de bioseguridad: Las medidas que se requieren en todos los laboratorios de Biología Molecular para evitar contaminaciones con productos de PCR. Cuartos separados donde se procesan las muestras para la amplificación, y donde se lleva la electroforesis de los productos de PCR. El material y reactivos en el área donde se lleva a cabo la amplificación no deberá salir de dicha área. El personal que labora en electroforesis no podrá entrar en el área de PCR.

Fuentes de variabilidad: Que se utilicen reactivos que no sean grado biología molecular, ni se utilicen los algoritmos internacionales mencionadas para la identificación de micobacterias.

RESULTADOS

Distribución por órgano afectado de los 80 cultivos de Löwestein-Jensen que se aislaron en el HGM y a los que se les realizó identificación de especie por PCR-FRLP de hsp65, en el período de 2008-2009.

Tb renal	33 casos (41%)
Tb ganglionar	21 casos (26%)
Tb pleural	12 casos (15%)
Tb meníngea	8 casos (10%)
Tb miliar	5 casos (6%)
Fístula inguinal	1 caso (1%)

Grupo de estudio: 21 cepas aisladas en cultivo de Löwestein-Jensen, pertenecientes a los casos de tuberculosis ganglionar.

Especies identificadas

	N=21
<i>CM. tuberculosis</i>	17 (80.9%)
<i>M. avium subsp. avium</i>	1 (4.7%)
<i>M. gordonae</i>	2 (9.5%)
<i>M. kumamotonense</i>	1 (4.7%)

Características de los pacientes a quienes se aislaron las cepas

	N=21
Sexo	Hombres 18 (85.7%) Mujeres 3 (14.2%)
Edad	Promedio 45 años (15-75 años)
Linfadenopatía unilateral	Cadena ganglionar cervical der. 13 (61.9%) Cadena ganglionar cervical izq. 7 (33.3%)
Linfadenopatía bilateral	1 (4.7%)

El estudio diagnóstico se realizó en todos los casos en muestra de biopsia excisional.

El reporte histopatológico los clasifico como infecciosos si presentaban patrón linfoproliferativo y como crónico si presentaban había la presencia de granulomas.

El cuadro clínico que se presentó en 17 pacientes (80.9%) consistió en historia de fiebre, pérdida ponderal, astenia, adinamia.

En base al cuadro clínico y los hallazgos histopatológicos compatibles con infección por M. tuberculosis, se inició tratamiento con terapia específica.

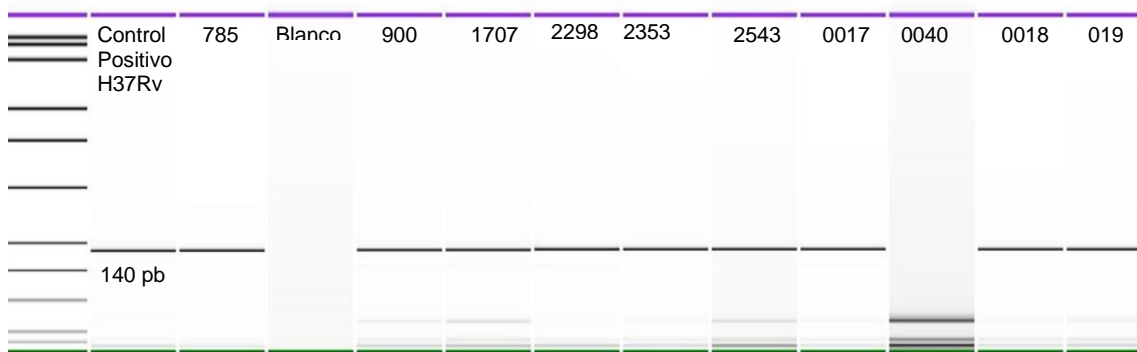
Tres pacientes presentaron tuberculosis ganglionar + tuberculosis pulmonar con lesiones típicas en la radiografía de tórax 1 caso caverna apical der., 1

cxon presencia de fibrotórax izq. y el caso restantes con lesiones sugestivas de diseminación broncógena. Presentando BAAR + en lavado bronquioalveolar.

Estudios complementarios

	N=21
Tinción de Zielh-Neelsen +	3 (14.2%)
Crecimiento en MGIT	5 (23.8%)
Tinción Auramina-Rodamina +	2 (9.5%)
PPD + (Halo de induración de >10 mm)	9 (42.8%)

Electroferograma que muestra los resultados para la detección de la secuencia IS61160 en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*



Cepa control : H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.
 Marcador de tamaño molecular: de 1000 pares de bases.
 La electroforesis se llevó a cabo empleando micro-chips de Agilent Technologies y empleando el Software 2100 Bioanalyzer.

Secuencias editadas, obtenidas por secuenciación mediante electroforesis capilar.

>cepa 007 *Micrococcus luteus*

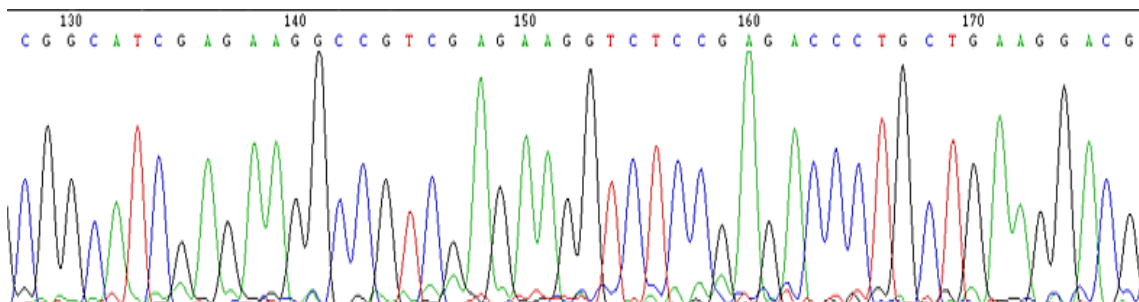
```
ACCAACGATGGTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCGTACGAGAAGATC
GGCGCGGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTGCGCCGGCGACGGCACC
ACCACCGCCACCGTGTGGCCAGGCGCTGGTCCGCGAGGGCCTGCGCAACGTGGCCGCG
GGCGCCGACCCGCTGTCCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTGGAGGCCGTACCTCC
GAGCTGCTCTCCGCTCCCGCAGATCGAGACCAAGGACCAGATcgCcGCCACCGCCTCG
ATCTCCGCGCGGACAAGCAGATCggCTCccTCaTCGCCGAGGCCCTGGACAAGGTCgGC
AAgGAGGGCGTCaTcCGTcgaggagtccaacaccttcggcctcgagctcgagctcacc
gagggcatcggttcgacaga
```

>cepa 009

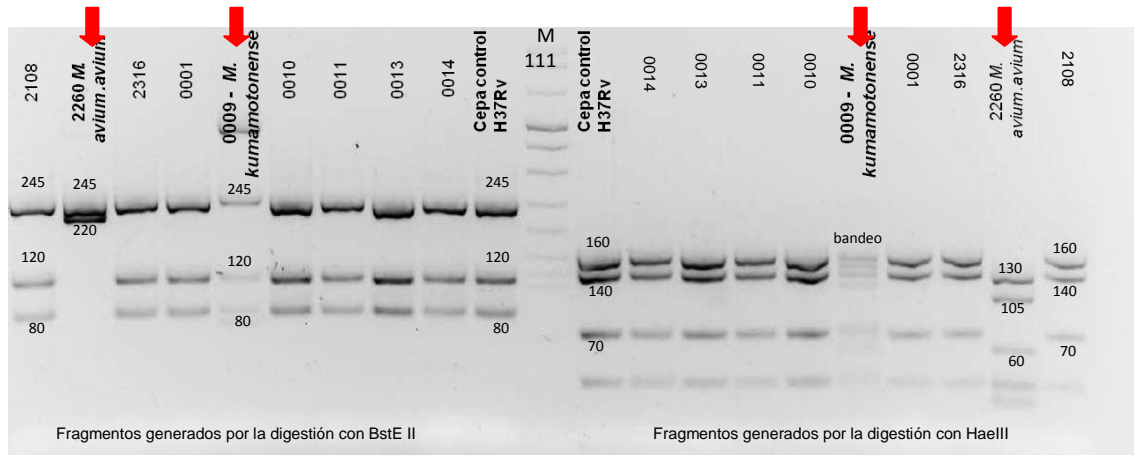
```
ACCAACGATGGTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCCTACGAGAAGATC
GGCGCGGAGCTGGTCAAGGAGGTTGCCAAGAAGACCGACGACGTGCGCCGGTGACGGCACC
ACCACCGCTACCGTGTGGCCAGGCACTGGTCAAGGAAGGGCTGCGCAACGTGGCCGCG
GGCGCCAACCCGCTGGCCCTCAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTGAGAAGGTCTCCGAG
ACCTGCTGAAGGACGCCAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCCACCGCCGGG
ATCTCCGCGGGCGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCTGGC
AACGAAGGTGTCATCACCGTCGAgGAGTCCAACACCTTCGGCCTGCAGCTGGAGCTCACC
GAGGGTATGCGGTTTCGACAAG
```

La cepa 009 fue la que se identificó como *M. kumamotonense*.

Electroferograma de la cepa identificada como *M. kumamotonense*



Electrofenograma del perfil de digestión de los productos de PCR obtenidos para el gen *hsp65*



Se observan los dos patrones de bandas que se obtienen con las enzimas de restricción Bst E II y Hae III. Cada una de las bandas es marcada con su peso molecular correspondiente.

La cepa control que se utilizó fue la H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. El patrón que da dicha cepa es para identificar cepas que pertenecen al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT).

Aquellas cepas con el mismo patrón de restricción igual al de la cepa H37Rv se reportan como CMT. La cepa 2260 fue identificada como *M. avium* de acuerdo a su perfil de digestión, mientras que la cepa 0009 no puede ser identificada por este método (RFLP) debido a que los fragmentos obtenidos con la endonucleasa de restricción HaeIII no corresponden a ningún perfil reportado, por ello fue necesario enviarla a secuenciar, tratándose de *M. kumamotoense*.

DISCUSIÓN

Para iniciar esta discusión es importante el mencionar que no se cuenta con estudios de este tipo en este hospital ni en nuestro país según lo consultado en las bases de datos.

El conocimiento de la epidemiología de las infecciones por MNT es realmente poco conocido o como lo han llamado una “caja negra”, ya que por ser enfermedades que no son reportadas en forma obligatoria no se cuentan con los datos necesarios. Los expertos indican el incremento en el número de casos si bien principalmente de infecciones respiratorias, la siguen en frecuencia e importancia la afección ganglionar, tema de este trabajo así como las infecciones de piel, tejidos blandos y diseminada.⁷

Los estudios de la incidencia de estas infecciones asociadas a VIH/SIDA son bastos, no así los de pacientes VIH-negativos como lo son los pacientes de este estudio.

La aparición de las nuevas técnicas de biología molecular ha contribuido a la identificación de las especies, por lo que se considera es uno de los factores para que sean actualmente reportado un mayor número de casos de estas infecciones.⁷

En el presente trabajo la incidencia de casos producidos por MNT fue baja a diferencia de lo reportado en la literatura consultada que hablan del incremento en la incidencia de estas enfermedades no solo en su asociación con VIH/SIDA

área de la cual encontramos basta literatura, sino también en pacientes VIH-negativos como se menciona en los artículos que mencionares posteriormente.

Los estudios publicados en años recientes hablan del incremento de las infecciones causadas por MNT, lo que nos hace pensar en una transición epidemiológica como lo refieren en el estudio realizado en Queensland Australia donde se incremento la incidencia de infecciones pulmonares causadas por MNT de 2.2/100,00 habitantes en 1999 a 3.2 en 2005. Este estudios resulta muy interesante ya que Queensland es un estado de Australia donde los casos de infecciones por MNT son de reporte obligatorio, y durante el tiempo del estudio en un inicio se identificaron especies en el laboratorio estatal y 2 principales privados abarcando así la mayoría de los casos del estado, además se realizó correlación clínica de los aislamientos de acuerdo a los criterios de la Sociedad Americana de Tórax y la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (SAT/SAEI) publicados en 2007. Los principales cambios fueron en las especies *M. intracellulare* y *M. abscessus*. Los casos de *M. avium* se incrementaron de 35 a 62, *M. intracellulare* de 77 a 212, CMA disminuyeron de 35 a 3, *M. abscessus* incrementaron de 23 a 40, *M. fortuitum* incrementó de 41 a 50. ⁶

En Taiwán se realizo un estudio para elucidar las tendencias de la epidemiología de los aislamientos y enfermedades por MNT durante un período de 9 años entre 2000 y 2008, en un hospital de concentración de casos de micobacteriosis, mediante la revisión de la base de datos de dicho hospital obteniéndose significancia estadística para las tendencias de incremento en los aislamientos de MNT y disminución de los de *M. tuberculosis* ($p < 0.05$). La

incidencia de infecciones por MNT pulmonares y extrapulmonares se incremento de 1.26 a 7.94/100,000 y el agente causal más frecuente en los casos de linfadenitis fue *M. abscessus*.²⁴

Como se mencionó antes el incremento en la prevalencia de infección por VIH ha contribuido al incremento en el número de infecciones por MNT, sin embargo se considera que posiblemente por este hecho el incremento en la vigilancia de estas enfermedades y la mejoría en los métodos diagnósticos entre otros factores es que se ha conocido el incremento en el número de infecciones por MNT también en pacientes VIH negativos, predominando las respiratorias en pacientes con alguna patología pulmonar subyacente, sin embargo también se ha incrementado el número de infecciones extrapulmonares como se observó en el estudio realizado en el Reino Unido que se realizó con el objetivo de conocer acerca de la epidemiología así como los regimenes de tratamiento y la evolución de pacientes VIH negativos con infecciones por MNT, en el período de 1995-1999, en una ciudad de ese país, con una muestra de 117 pacientes, de los cuales 22 fueron casos extrapulmonares, la incidencia en total de las infecciones se incrementó de 0.8 en 1995, un pico en 1997 de 3.07 a 1.95/100,000 en 1999. Con predominio de aislamientos de *M. avium*.²⁵

Otro estudio en Oregón comparte al interés actual en conocer la epidemiología de las infecciones causadas por las MNT es este estudio se tomaron en cuenta la distribución regional de las infecciones así como tipo de población, urbana o rural y el clima seco o húmedo, encontrando mayor número de casos en áreas urbanas y húmedas, aislándose con mayor frecuencia CMA, en los casos de

infección pulmonar, y en la mitad de los mismos con correlación clínica en base a los criterios de la SAT/SAEI, y de los 22 casos de linfadenitis ganglionar en 21 se asiló también a CMA. ²⁶

En Nijmegen-Arnhem, Holanda la linfadenitis fue el tipo más común de afección extrapulmonar identificándose a *M. avium* como principal agente causal, en un estudio que se realizó para conocer la frecuencia de las infecciones por MNT que se conocía había incrementado sin conocerse la correlación clínica, en base a los lineamientos de la SAT/SAEI, encontrándose que solo el 25% de los aislamientos pulmonares tuvo relevancia clínica. ²⁷

Autores consideran que los bajos reporte de infecciones producidas por MNT en países endémicos para TB puede deberse a que no se cuenta con reportes sistemáticos de estas infecciones y a que estas pueden sobreponerse con infección por TB, así como a falta de infraestructura necesaria para el diagnóstico. ²⁸

En Etiopía, país que ocupa el lugar número 7 de países afectados por Tuberculosis, se realizó un estudio para conocer la proporción de las linfadenitis causadas por *M. tuberculosis* y *M. bovis*, ya que en ese país se consume leche no pasteurizada y la linfadenitis tuberculosa (80%) la afección más frecuente de TB extrapulmonar (36.6%). No se encontraron casos de *M. bovis*, sin embargo se encontró presencia de granulomas en 24 de 49 casos con cultivo negativo, orientado a la posible infección por MNT no identificadas en el estudio. ²⁹

En nuestros resultados se aisló a la *M. kumamotonense*, una especie de la que solo encontramos dos citas a nivel mundial, una que nos habla de su identificación en 2006, como una micobacteria de crecimiento lento, no cromógena, parte de complejo *M. terrea*, que toma su nombre por la región de Japón donde se aisló por primera vez.³⁰ La segunda referencia trata acerca de un paciente masculino de 30 años de edad VIH-positivo, con linfadenitis diseminada, presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en la muestra por aspiración y aislamiento en medio MGIT, a quien en base a esos resultados se diagnóstico como linfadenitis por *M. tuberculosis* y recibió tratamiento con Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol y 5 meses posterior al inicio de tratamiento se identificó a *M. kumamotonense* por medio de la secuenciación del gen 16S rRNA, con susceptibilidad para Etambutol y resistencia a Isoniazida y Pirazinamida, no realizándose cambios al tratamiento debido a la evolución satisfactoria del paciente.³¹

Consideramos que la importancia es este estudio fue que logramos identificar un porcentaje de 19% de cepas de Micobacterias No Tuberculosas en cepas aisladas en el HGM, un número mayor de lo reportado en la literatura mundial. Nuestro estudio no se puede extrapolar a nivel nacional por lo que es necesario realizar más estudios multicéntricos y conocer la verdadera frecuencia de MNT en pacientes con TB extrapulmonar en nuestro país.

CONCLUSIONES

En el grupo de estudio de este trabajo se aisló en 17 casos (80.9%) a *CM. Tuberculosis* y en 4 casos (19%) se aislaron micobacterias no tuberculosas.

En la actualidad las técnicas de biología molecular tienen trascendental importancia en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, como lo es en este caso de las infecciones por micobacterias, que nos ofrecen la enorme ventaja de ser altamente específicas así como la rapidez con la que pueden ofrecernos un resultado, y en cuestión de horas poder identificar con precisión diferentes especies.

Estas técnicas constituyen una valiosa herramienta epidemiológica a nivel molecular en las distintas formas de tuberculosis extrapulmonar. Desafortunadamente esta tecnología no se encuentra disponible en los centros hospitalarios de nuestro país, limitando de manera importante la realización de estos estudios a nivel nacional.

REFERENCIAS

1. http://www.who.int/tb/publication/global_report/2007
2. Schlossberg MD, Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas 4^a Edición, México, Editorial McGraw-Hill Interamericana 2000:212-216.
3. <http://www.who.int/tb/data>
4. <http://cenavece.salud.gob.mx>
5. Programa de acción específico 2007-2012 Tuberculosis Primera edición 2008 D.R. Secretaria de Salud México D.F.
6. Thomson RM, Changing Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria Infections, *Emerging Infectious Diseases* 2010;16:1576-1583.
7. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Fordin F, Holland SM, Horsburgh RH, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Oliver K, Ross S, Fredham von Reyn C, Wallace RJ, Winthrop K, An Oficial ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases, *Am J Respir Crit Care* 2007;175:367-416.
8. Farga V, Caminero JA, Tuberculosis 3^a Edición, Editorial Mediterráneo, Santiago de Chile 2011:28-20,368-369,423-426,449-455.
9. Hernández SA, R. Cicero SR, Olivera H, Rivero V, Ramírez E, Escobar GA, Tuberculosis is still a major cause of cervical lymphadenopathies in adults from developing countries, *Epidemiol Infect* 2003;131:1071-1076.
10. Cicero SR, Hernández SA, Ramírez CE, Escobar GA, Frequency of Mycobacterium Bovis as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and – negative Mexican patients, *Eur J Clin Microbiol Infect* 2009;28:455-460.
11. Mason RJ, Broaddus VC, Martin TR, King TE, Schraufnagel DE, Murray JF, Nadel JA, *Textbook of Respiratory Medicine* 5^a Edition, USA, Saunders Elsevier 2010:754-770,777-778,793-802.
12. <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>
13. Mohapatra PR, Janmeja AK, Tuberculous Lymphadenitis, *JAPI* 2009;57:585-590.
14. Amir J, Non-Tuberculous Mycobacterial Lymphadenitis in Children: Diagnosis and Management, *IMAJ* 2010;12:49-52.
15. Estándares para la atención de la tuberculosis en México, Secretaria de Salud, Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud, Centro Nacional de vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, Dirección de Programas preventivos, Dirección de Micobacteriosis, 2009. México D.F.
16. Herrera LL, Pozuelo DR, Molina T, Valverde A, Saiz P, Jiménez MS, Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo Mycobacterium tuberculosis, *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:496-502
17. Yzquierdo SL, Mederos L, Díaz A, Echemendia M, Montoso E, Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas, *Rev Chil Infect* 2007;24:391-396.
18. Goncalves SE, Huard RC, Niemann S, Kremer K, Santos AR, Suffys PN, Ho JL, Distinct genotypic profiles of the two major clades of Mycobacterium africanum, *BMC Infectious Diseases* 2010;10:1-16.

19. Mondragón BM, Vázquez CCA, Barrón RC, Acosta BA, José KC, Balandrazo S, Oivera DH, Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública de México* 2000;46:484-489.
20. Devallois A, Seng K, Rastogi N, Rapid Identification of Mycobacteria to Species Level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hps65 Gene and Proposition of an Algorithm To Differentiate 34 Mycobacterial Species, *J Clin Microbiol* 1997;35:2969-2973.
21. Telenti A, Marchest F, Balz M, Bally F, Botger EC, Bodmeri T, Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis, *J Clin Microbiol* 1993;32:175-178.
22. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R, Identification of 54 Mycobacterial Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 Gene, *J Clin Microbiol* 2001;39:2799-2806.
23. Chimara E, Ferrazoli L, Yoko S, Canceicao M, Durham AM, Arbeit RD, Cardoso S, Reliable Identification of Mycobacterial Species by PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA) hsp65 in a Reference Laboratory and Elaboration of a Sequence Based Extended Algorithm of PRA-hsp65 Patterns, *BMC Microbiol* 2008;8:1-12
24. Lai C-C, Kim C, Chou C-H, Liao H-L, Huang Y-T, Yang P-C, Luh K-T, Hsueh P-R, Increasing Incidence of Nontuberculous Mycobacteria, Taiwan, 2000-2008, *Emerging Infectious Diseases* 2010;16:294-296
25. Henry MT, Inamadar L, O'Riordain D, Schweiger M, Watson JP, Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response, *Eur Respir J* 2004;23:741-746.
26. Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop KL, Nonrubeculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology, *CID* 2009;49:124-129.
27. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WCM, Hoefsloot W, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, van Soolingen D, Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem, The Netherlands, *Thorax* 2009;64:502-506.
28. Gopinath K, Singh S, Non-Tuberculous Mycobacteria in TB-Endemic Countries: Are we Neglecting the danger?, *Neglected Tropical Diseases*, 2010;615-618.
29. Beyene D, Bergval I, Hauli E, Ashenafi S, Yamauh L, Aseffa A, Wiker HG, Engers H, Klatser P, Sviland L, Identification and genotyping of the etiological agent of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia, *J Infect Dev Ctries* 2009;3:412-419.
30. Masaki T, Ohkusu K, Hata H, Fujimara N, Iihara H, Yamada-Noda M, Nhung PH, Hayashi M, Asano Y, Kawamura Y, Ezaki T, *Mycobacterium kumamotonense* Sp. Nov. recovered from clinical specimen and the first isolation report of *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel slowly growing, nonchomogenic clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex, *Microbiol Immunol* 2006;50:889-97.
31. Rodríguez AA, Jiménez MS, Yubero J, Chaves F, Rubio GR, Palenque E, García MJ, Menendez MC, Misdentification of *Mycobacterium kumamotonense* as *M. tuberculosis*, *Emerging Infectious Diseases* 2010;16:1178-1179.

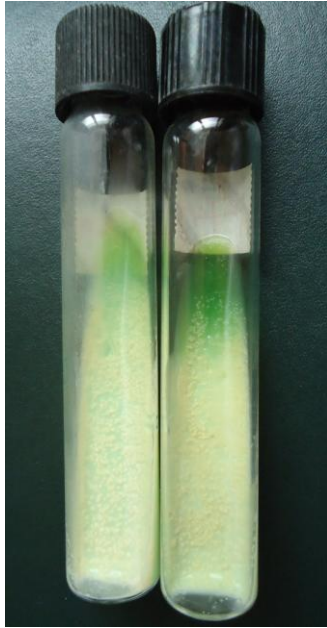
**FOTOGRAFÍAS
Y
ALGORITMOS**



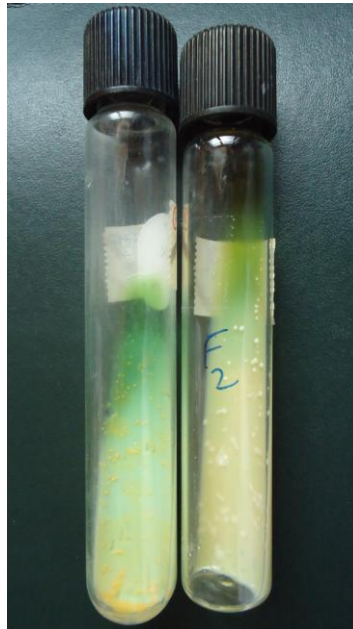
Paciente con Tuberculosis ganglionar en cadena cervical der.



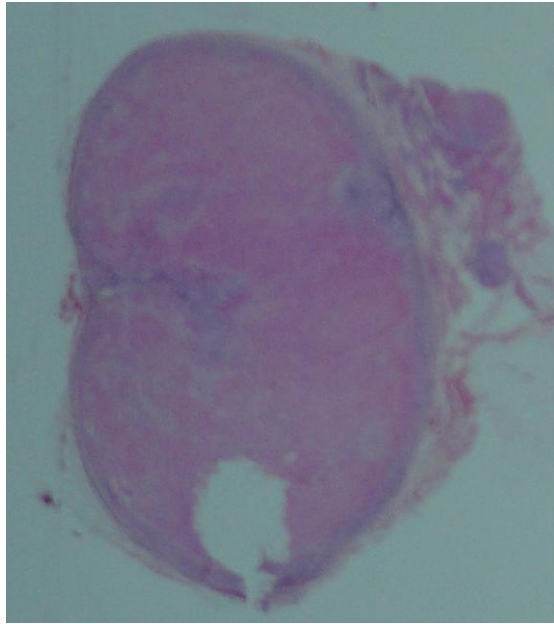
Paciente con Tuberculosis ganglionar, lesión en región supraclavicular izq.



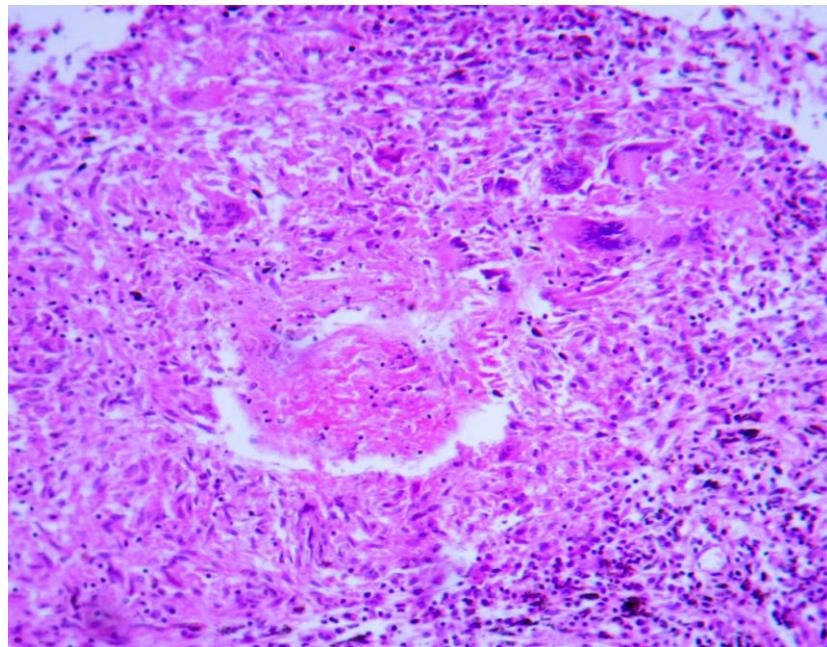
Crecimiento de *M. tuberculosis* en cultivo de Löwestein-Jensen



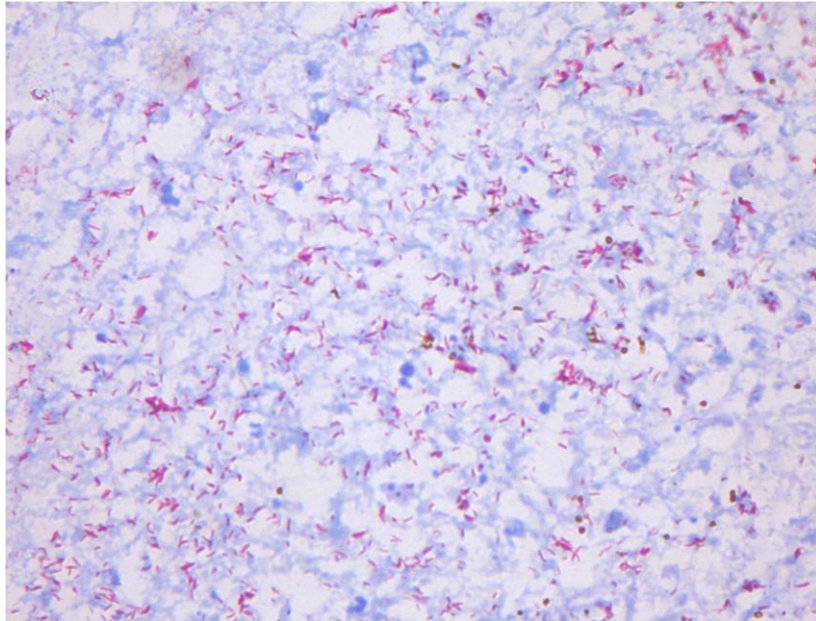
Crecimiento de Micobacterias No Tuberculosas en cultivo de Löwestein-Jensen



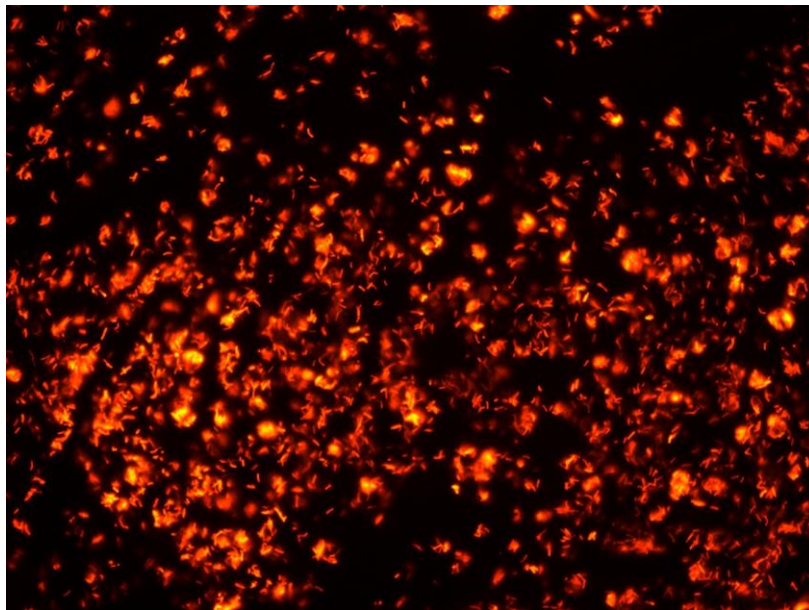
Microfotografía de ganglio linfático teñida con H-E (4x).



Linfadenitis granulomatosa secundaria a *M. tuberculosis*, necrosis caseosa central, macrófagos epitelioides, células gigantes multinucleadas tinción H-E (40x)

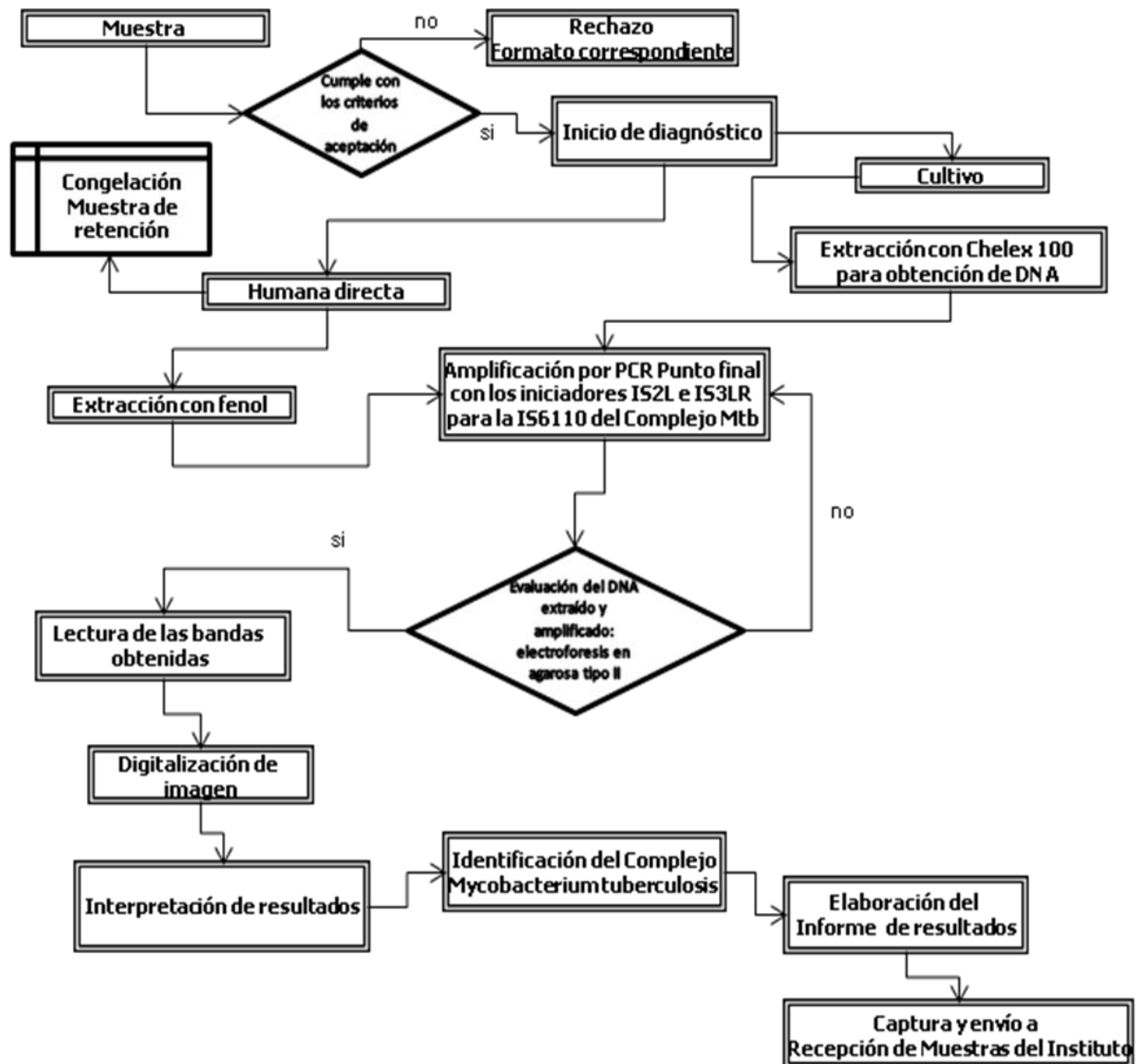


Bacilos de *M. tuberculosis*, tinción de Zielh-Neelsen (40x)



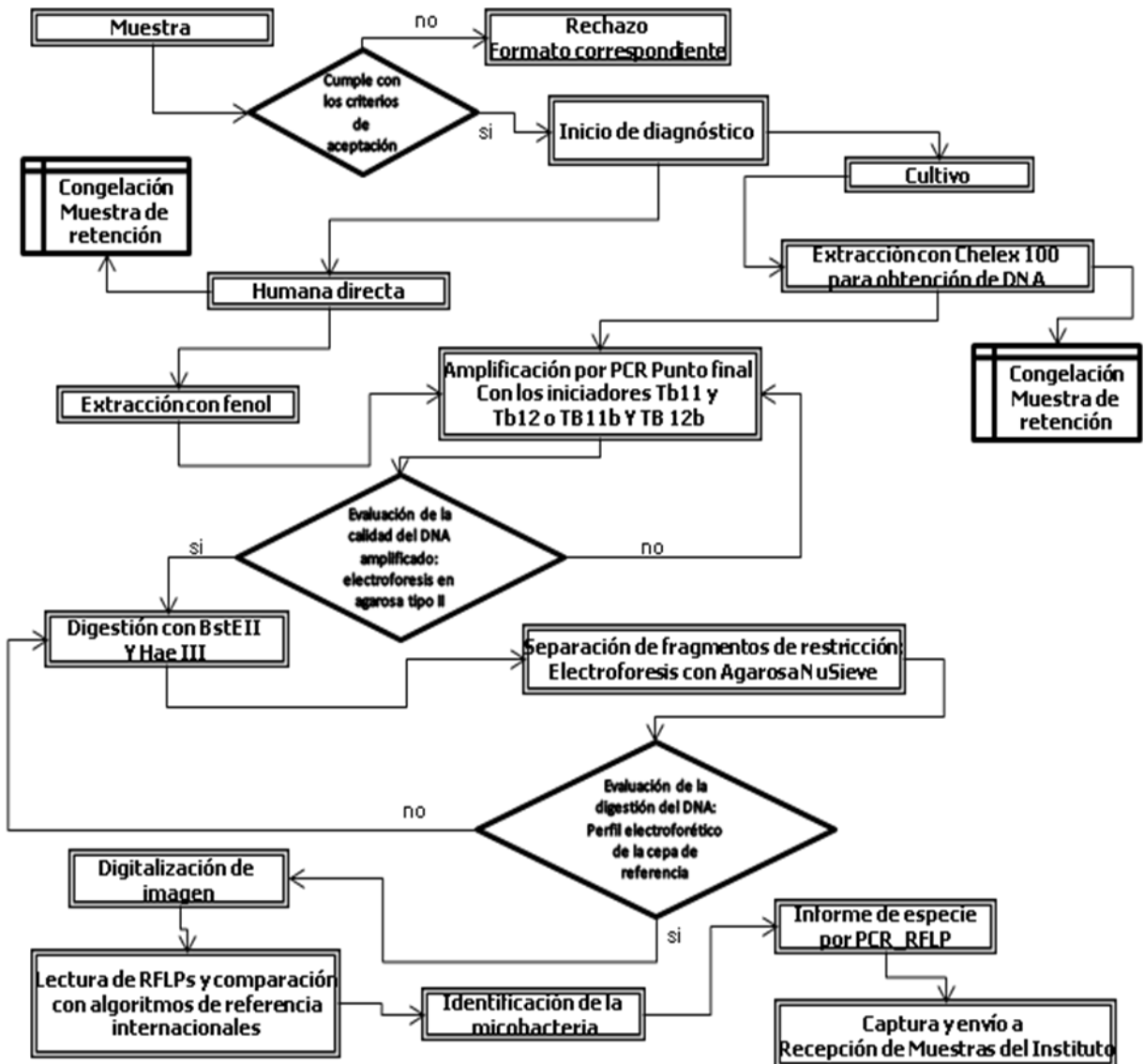
Bacilos de *M. tuberculosis* (Tinción fluorescente Auramina-Rodamina)

ALGORITMOS UTILIZADOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE REFERENCIA EPIDEMIOLÒGICA PARA EL DIAGNOSTICO MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* POR AMPLIFICACIÓN EN PUNTO FINAL



Ámbito de aplicación: Diagnóstico
 Tiempo estimado: A partir de cepa: 4 días hábiles, y en muestra clínica: 6 días hábiles
 Capacidad Instalada: 12 detecciones/ día.

IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE MICOBACTERIAS



Ámbito de aplicación: Referencia y Diagnóstico

Tiempo estimado: A partir de cepa: 4 días hábiles, y en muestra clínica: 6 días hábiles

Capacidad Instalada: 8 identificaciones de especie por proceso realizado/ día.