



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

“Identificación de Micobacterias no
tuberculosas en pacientes con adenopatía
cervical VIH seropositivos, y seronegativos
con tuberculosis ganglionar”

T E S I S D E P O S G R A D O

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN NEUMOLOGÍA

P R E S E N T A

DRA. IRERI ISADORA THIRIÓN ROMERO

MÉXICO, D.F. 2013



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.

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO OD

“Dr. Eduardo Liceaga”

TESIS

POSTGRADO DE NEUMOLOGIA

**Identificación de Micobacterias no tuberculosas en
pacientes con adenopatía cervical VIH
seropositivo, y seronegativos con tuberculosis
ganglionar.**

Alumna: Ileri Isadora Thiri3n Romero

Tutor: Dr. Alejandro Hern3ndez Sol3s

Co-tutor: Dr. Ra3l Cicero Sabido

Co-tutor: Arturo Reding Bernal

CONTENIDO

Antecedentes.....	8
Planteamiento del Problema.....	19
Justificación.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Metodología.....	23
Resultados.....	27
Discusión.....	30
Conclusiones.....	34
Referencias	35
Tablas y figuras	40

TÍTULO

Identificación de Micobacterias no tuberculosas en pacientes con adenopatía cervical VIH seropositivo, y seronegativos con tuberculosis ganglionar.

FIRMA DE AUTORIZACION

A mis padres, a los cuales les debo todo, su ejemplo ha sido lo que me ha impulsado a llegar a mis sueños.

A mis hermanos, a Fer que me motiva a poner mi corazón en cada instante; a Rai que me ha enseñado lo importante de la vida: la felicidad.

A ti Carlos, por ser siempre mi viento en calma, mi libertad.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Francisco Navarro, gracias por la oportunidad de escucharme, y de ser la puerta de entrada de lo que hoy culmina.

Dr. Guillermo Cueto, gracias por el apoyo, el aprendizaje, y la confianza desde el inicio de mi carrera.

Dra. Tania Sánchez y Dr. Rey David Pineda, gracias por estos tres hermosos años de compañeros y amigos de vida.

ANTECEDENTES

Epidemiología:

La Tuberculosis (TB) continua siendo un problema de salud mundial, con mayor prevalencia en Asia y África, se estima por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que infecta cerca de una tercera parte de la población mundial y genera enfermedad en alrededor de 9.2 millones de personas por año; con una mortalidad de 1.7 millones anuales.^{1,2}

Un incremento en la incidencia de las formas extrapulmonares se ha desarrollado desde mediados de 1980.² En Estados Unidos de América el 20% de todos los casos de tuberculosis eran extrapulmonares, comparado con el año de 1993 con solo el 16%.³ Los sitios más frecuentemente reportados para las formas extrapulmonares son la ganglionar, genitourinaria, ósea, sistema nervioso central, seguida de la abdominal en la cual se incluye la peritoneal.²

En México, 15,000 nuevos casos de tuberculosis y 2,000 muertes causadas por esta enfermedad son identificados cada año. La TB pulmonar (TBP) es la más frecuente a nivel mundial, y en México; sin embargo las lesiones extrapulmonares han aumentado considerablemente, representando el 17-20% de los casos.⁴ El CENAVECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades) encontró 18,011 casos nuevos de tuberculosis en el 2009, correspondiendo 2,898 casos a las formas de tuberculosis extrapulmonares.⁵

El Hospital General de México (HGM) reportó los siguientes datos acerca de la distribución de los casos de TB extrapulmonar del año 2002 al 2006: ganglionar 27%, SNC (Sistema Nervioso Central) 19%, diseminada 16%, cutánea 12%, peritoneal 10%, renal 9%, ósea 5%, pleural 1%, y ocular 1%.

En el HGM, durante un periodo de 4 años de seguimiento. Se reportaron 1,374 cultivos positivos para micobacterias, de los cuales 61% fueron de muestras pulmonares, y el resto 39% fueron muestras extrapulmonares. En este último grupo el 85% eran pacientes con infección por VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), y sin tratamiento antirretroviral.⁵

Para finales del año 2009, se estimaba que existían 33.3 millones de personas con infección por VIH, y 1.8 millones de muertes causadas por síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).⁶ Se calcula 1.3 millones de personas con co-infección VIH y tuberculosis.⁷

Se reconoce a la infección por VIH como el factor de riesgo de progresión más importante para el desarrollo de una tuberculosis activa, tanto en su forma pulmonar como extrapulmonar,⁸ comparado con población sin infección por VIH, los pacientes con VIH presentan un riesgo 20 veces mayor para desarrollar tuberculosis, y el riesgo se mantiene mientras la cuenta celular de CD4 se encuentre baja.⁶ En 2007 se registraron 456,00 muertes en pacientes con infección por VIH asociadas a tuberculosis.⁷

En los últimos 15 años el interés en las enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas (MNT), ha aumentado debido al creciente número de infecciones pulmonares que causan en pacientes con infección por VIH⁹, lo que se conoce como transición epidemiológica.^{10,11}

La tuberculosis ganglionar continua siendo la forma de presentación extrapulmonar más frecuente, reportándose hasta el 35% de los casos.²

La tuberculosis ganglionar sin la infección por VIH y por Diabetes mellitus es considerada una enfermedad poco patogénica y paubacilar, sin embargo se tienen pocos datos acerca de su evolución posterior al tratamiento estrictamente supervisado.¹² La presencia de linfadenopatía en pacientes con infección por VIH es un hallazgo común, recayendo el diagnóstico diferencial en tres grandes categorías, infeccioso, maligno y cambios

reactivos; para poder realizar la diferenciación es recomendado realizar aspiración con aguja fina, o biopsia; en las regiones con alta prevalencia de tuberculosis, el diagnóstico por este método llegó a ser entre el 20 y 60% en pacientes con VIH. A comparación en un estudio realizado en una región de baja prevalencia de tuberculosis el porcentaje encontrado por incidencia fue de 7.5%; en este estudio el complejo *M. avium* fue el agente causal más frecuentemente encontrado para tuberculosis ganglionar.¹³

En el HGM se determinó por PCR-RFLP (restriction fragment-length polymorphism), la frecuencia del tipo de micobacterias en muestras extrapulmonares, siendo *M. tuberculosis* la más frecuente en pacientes sin infección y con infección por VIH, 80.7% y 57.5% respectivamente. Las micobacterias no tuberculosas, como *M. avium*, *M. gordonae*, y *M. fortuitum* fueron detectadas en 10 pacientes sin infección por VIH, y en 23 con infección por VIH, correspondiendo al 12% y 28.75%, respectivamente.⁵

Micobacterias:

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* está conformado por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* y *M. caprae*.¹⁰ *M. tuberculosis* es la más importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que produce la mayor parte de los casos. Las MNT, pertenecen a la especie *Mycobacterias*, pero son diferentes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y al de *Mycobacterium leprae*, durante mucho tiempo se denominaron atípicas o diferentes a *M. tuberculosis*, oportunistas, o no clasificadas.¹⁴ Actúan generalmente como agentes oportunistas, en pacientes con algún grado de inmunocompromiso, o con enfermedades crónicas degenerativas.^{15,16} El género de micobacterias no tuberculosas incluye más de 100 especies de las cuales pueden generar afección ganglionar, las cuales se encuentran generalmente en el ambiente.

En el caso de la tuberculosis ganglionar la mayor parte de los casos son secundarios a la infección por el complejo *M. tuberculosis*, registrados hasta en el 90% de los cultivos para

pacientes adultos¹⁷, en especial *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, y *Mycobacterium africanum*. Anterior a la pasteurización de la leche y su adecuada manipulación, *M. bovis* era la principal causa de tuberculosis ganglionar. Sin embargo la tuberculosis ganglionar también puede presentarse secundario a micobacterias no tuberculosas, con un incremento significativo en su incidencia en los últimos años, sobre todo en países en desarrollo. La distribución de estas últimas no es uniforme, y parece depender de la zona geográfica, algunas de las micobacterias no tuberculosas identificadas con mayor frecuencia son *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium kansasii*, complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, siendo este último el más frecuente dentro de las micobacterias no tuberculosas, reportándose cultivos positivos en el 80% en ganglios linfáticos.^{2, 17}

La mayor parte de ellas se aíslan del medio ambiente, como agua, en el caso específico de *M. kansasii*, *M. xenopi*, y *M. simiae*, se han aislado de aguas municipales, sin existir evidencia hasta el momento de transmisión humano-humano.¹⁷ Se ha documentado a *M. abscessus* como unas de las micobacterias no tuberculosas más patógenas sobre todo en pacientes con alguna patología pulmonar crónica, como es el caso de fibrosis quística.¹⁷

La importancia de poder diferenciar entre micobacterias tuberculosas y no tuberculosas radica en que la piedra angular del tratamiento en este tipo de afección es quirúrgica, manejándose como una infección local, a comparación de micobacterias tuberculosas donde el tratamiento generalmente es sistémico a partir de drogas antituberculosas. Las infecciones por micobacterias no tuberculosas generalmente no responden al tratamiento convencional antituberculoso, y en ocasiones son mal clasificadas como drogo resistentes por la falta de respuesta a tratamiento.¹¹

Presentación clínica:

La presentación típica de la tuberculosis ganglionar por micobacterias tuberculosas, es más frecuente en el género femenino, con una relación de 1:1.27; y en grupos de pacientes jóvenes, con un pico de edad entre los 20 y 40 años, aunque puede ocurrir a cualquier edad.^{2, 12} Generalmente se presentan con crecimiento progresivo y lento de los nódulos linfáticos, sin presentar otra sintomatología, en otros pocos casos llegan a presentar fiebre, pérdida de peso, diaforesis, y sintomatología general en el 32% de los casos, generalmente en pacientes con infección por VIH.^{2, 12}

La presentación en el caso de las micobacterias no tuberculosas es más rápida, con mayor incremento de volumen, más localizadas, y con formación de fístulas con mayor frecuencia, y generalmente no presentan síntomas generales.²

Dentro de las características demográficas que están asociadas con la posibilidad de tuberculosis ganglionar son la edad, el género femenino, el mayor tamaño de las linfadenopatías, la presencia de fiebre y pérdida de peso, así como pacientes con infección por VIH, la presencia de carga viral indetectable o el inicio de tratamiento antirretroviral. En los pacientes con VIH, y diagnóstico de tuberculosis ganglionar no se ha podido determinar una asociación entre la cuenta celular de CD4 y la etiología de las linfadenopatías.¹³ La media de cuenta celular de CD4 encontrada en pacientes con infección por VIH y tuberculosis ganglionar es de 156 cells/mm³.¹⁸

La presentación cervical es la más frecuente (63.8%) con involucro en nódulos linfáticos yugulares, en el triángulo posterior o supraclavicular, causado en su mayor parte por *M. tuberculosis*; en cambio la infección por micobacterias no tuberculosas presenta mayor afección en nódulos linfáticos cervicales superiores, glándulas salivales; sin embargo cualquier otra región con nódulos linfáticos puede verse afectada como lo es la inguinal, axilar, mesentérica, mediastinal e intramamaria.²

El sitio predominante de linfadenopatías en pacientes con VIH fue cabeza y cuello con 18.7%, región axilar en 11.2%, inguinal con 15%, y la combinación de las tres en un 18.7%.¹³ Se ha encontrado una regresión de los ganglios en un 78% a los dos meses de iniciado el tratamiento, y 96% a los 6 meses de tratamiento; 22% de los pacientes reporta aun presentar ganglios palpables al término del tratamiento.¹²

De los resultados obtenidos en nuestro hospital en series previas, HGM, el género mayormente afectado fue el femenino, con una edad media de presentación de 45.6 años. El 88.5% de los casos tenía afección unilateral de predominio derecho. En más del 70% de los casos presentaban historia de síntomas inespecíficos como fiebre, astenia, pérdida de peso, tos y disnea y solo 17% de los casos presenta alguna lesión radiográfica pulmonar.¹⁴ De los casos con obtención de cultivo la mayor parte correspondió a *M. tuberculosis*, 55%.¹⁴

Patogénesis:

No se conoce con exactitud los mecanismos de patogenicidad, pero se establece que esta es una manifestación local de una enfermedad sistémica, en el caso de infección por micobacterias tuberculosas.²

Generalmente el bacilo penetra en el organismo a través de sistema respiratorio, y a partir de este presenta una diseminación linfohematógena. En este proceso se genera la infección primaria con la exposición del bacilo, con multiplicación en el alvéolo y formación del nodo de Ghon, el bacilo es fagocitado por los macrófagos a nivel de los ganglios mediastinales e hiliares, formando esto el complejo primario.²

Las micobacterias no tuberculosas se encuentran en un ambiente ubicuo, tanto en la tierra como en el agua, y animales; los humanos generalmente adquieren estos patógenos de fuentes del medio ambiente. Su vía de entrada al organismo es generalmente por vía oro faríngea, o por mucosas como la gingival o conjuntiva.²

El bacilo ya dentro de los nódulos linfáticos inicia la formación de tubérculos, a partir de la liberación de citocinas y linfocinas, con mayor acumulación de macrófagos y monocitos, en esta primera fase existe poca muerte celular, pero con incremento en el número de bacilos en macrófagos. Después de 2 a 4 semanas los macrófagos inician la destrucción de los bacilos fagocitados y de sus productos, con la formación de un centro caseoso en el centro del nódulo linfático, con formación de células epiteloideas, y acumulación de linfocitos. Posteriormente con mayor crecimiento de los mismos y formación de periadenitis, en algunos casos se presenta ruptura de estos centros o calcificación.²

La linfadenitis periférica puede presentarse al inicio de la infección, sobre todo en pacientes en edades extremas como niños, y en pacientes con inmunocompromiso; o en el caso por reactivación de la infección primaria. Se ha encontrado que hasta el 41.4% de los pacientes tienen evidencia de tuberculosis pulmonar.

Algunas vías alternas que explican su diseminación, puede ser a través de los ganglios linfáticos como los adenoides, o el anillo de Waldeyer, dientes, oído medio y mastoides.²

Diagnóstico:

La tuberculosis continúa siendo la gran simuladora, y en el caso de las formas extrapulmonares en particular la ganglionar no es su excepción, llegando a ser un reto diagnóstico por las múltiples etiologías; como diagnósticos diferenciales se encuentran adenitis por algún otro tipo de infección bacteriana, hongos, toxoplasmosis, sarcoidosis, enfermedad del arañazo del gato, higroma quístico, hiperplasia no específica, neoplásico, procesos linfoproliferativos, entre otros.² Sin embargo la infección por tuberculosis debe ser aun considerado dentro de los primeros diagnósticos diferenciales sobre todo en países en desarrollo, siendo la tuberculosis ganglionar la forma extrapulmonar más frecuente de presentación por tuberculosis, y en el caso de pacientes con infección por VIH, pacientes en edades pediátricas y adultos de países desarrollados la incidencia por

infección por otro tipo de micobacterias, como las no tuberculosas, puede llegar a verse con mayor frecuencia.¹⁴

El diagnóstico histopatológico, se establece por la identificación de granulomas caseosos, con presencia de células epiteloides con o sin células multinucleadas gigantes y con necrosis caseosa la cual llega a encontrarse hasta en el 70% de los casos, sin embargo existen casos donde la formación de granulomas no es tan evidente.¹⁹ En el caso de las micobacterias no tuberculosas la presencia de micro abscesos, granulomas poco definidos, o granulomas no caseificantes con menor número de células gigantes es frecuente.²

La aspiración con aguja fina es un procedimiento sencillo, rápido, y de bajos precios, con una buena sensibilidad y especificidad y se recomienda para realizar el diagnóstico de primera intención. Todo el material recuperado deberá ser analizado con la tinción de Ziehl-Neelsen, para determinar la presencia de bacilos ácido alcohol resistente, tiene una sensibilidad muy variable desde 46% hasta 78% pero con gran especificidad.² Para pacientes con infección por VIH, la aspiración con aguja fina a mostrado ser un método adecuado para obtención de muestras de ganglios, la proporción de casos diagnosticados por este método oscila entre el 17% hasta 87%.¹⁸

El cultivo de micobacterias continua siendo el estándar de oro, es un proceso lento que consume aproximadamente 4 semanas dependiendo del tipo de medio que se utilice y del tipo de micobacteria, llegando a ser hasta de 12 semanas para algunas como *M. ulcerans* o *M. genavense*.^{2, 17}

De los cultivos utilizados para identificación de micobacterias no tuberculosas se encuentran los líquidos como el MGIT (mycobacteria growth indicator tube), que contiene un sensor de identificación de oxígeno para el crecimiento micobacteriano; los cultivos sólidos como el Löwenstein-Jensen, que ayudaría para reconocimiento de colonias y susceptibilidad; existen algunas micobacterias no tuberculosas las cuales requieren

suplementos en los cultivos para su crecimiento como *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, y *M. ulcerans*.¹⁷

La sensibilidad para cultivo se ha reportada tan baja como el 19.1%, siendo la razón más importante para esta baja sensibilidad una muestra de poco volumen, asociado a la obtención de muestras por punción con aguja fina; así como a las características paubacilares que se presentan en las formas extrapulmonares; o la presencia de necrosis en la muestra obtenida; y por último también se ha asociado la baja sensibilidad debido a que de manera inmunológica los ganglios linfáticos se encuentran en un estado de inhibición metabólica por lo que el crecimiento no es siempre posible.¹⁹ El cultivo continua siendo el estándar de oro para el diagnóstico de *M. tuberculosis*.¹¹

En nuestro hospital, HGM, de los casos con obtención de cultivo la mayor parte correspondió a *M. tuberculosis*, 55%.¹⁴

La baciloscopia en pacientes con diagnóstico de tuberculosis ganglionar, llega a ser positiva en el 24% de los casos.¹⁸

Como se ha demostrado los métodos tradicionales como la microscopia directa y el cultivo en general son malos para el diagnóstico rápido y su sensibilidad es limitada. Estudios previos han mostrado que los métodos moleculares presentan mejor sensibilidad y tienen la gran ventaja de ser más rápidos para la obtención del diagnóstico, entre 24 y 48 horas, lo cual se traduce en un inicio rápido y eficaz de tratamiento², reportándose una sensibilidad y especificidad buena en el caso de la técnica de PCR (reacción de cadena de polimerasa), entre el 84 y 91% y 75 y 100% respectivamente, con un valor predictivo negativo de 86.95%²⁰, por lo cual la presencia de tuberculosis ganglionar no puede excluirse por completo si el PCR es negativo.^{15, 16} La realización del PCR a partir de una biopsia mejoro sensibilidad para el diagnóstico, probablemente secundario a la poca muestra que se puede llegar a obtener por aspiración con aguja fina.¹⁵

Aun cuando la técnica de PCR han mostrado mejores porcentajes en sensibilidad y especificidad, así como la ventaja del rápido resultado, no son un método de elección en países con bajos recursos para hacerse un estudio de rutina.¹⁶

PCR, es un proceso que multiplica por millones de veces un fragmento determinado de ADN, es aplicable a la identificación de especies por diferentes maneras; una de ellas es por análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), una técnica relativamente nueva para la identificación rápida de micobacterias²² el cual ha sido el más utilizado, por su poder discriminativo, el cual se realiza por amplificación de un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias, sometiéndose a lisis con enzimas de restricción y visualización de los fragmentos de restricción en gel de agarosa, tras teñir con bromuro de etidio; es de gran utilidad en la identificación rápida de las especies del género *Mycobacterium*.⁹

Desde 1993 Telenti desarrollaron la amplificación del fragmento hsp65 por medio de PCR-RFLP para MNT. Es posible inferir el patrón de evolución y describir las proteínas o la secuencia de ADN por el estudio filogenético, para diferenciar entre el género *Mycobacterium*, incluye secuencias de nucleótidos del gen que codifica la subunidad 16S ARNr, y secuencias de aminoácidos que codifican los fragmentos hsp65 y rpoB¹⁵. Todas las especies de bacterias tienen una copia de hsp60 o de hsp65 en su genoma, este es uno de los puntos clave en su estudio filogenético²².

El gen hsp65, codifica la proteína 65 kDa heat-shock, que se encuentra en la pared del género de micobacterias, y es uno de los antígenos inmunológicos más importantes. En estudios previos hsp65, ha servido para diferenciar y clasificar la especie de *Mycobacterium*, debido a la secuencia de conservación que tiene.^{15,22} Reportándose sensibilidad y especificidad hasta del 100% para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y para no tuberculosas del 74.5%²³.

La técnica de identificación de la especie de micobacteria por PCR-FRLP de hsp65, está basada en el análisis de los productos obtenidos por enzimas de restricción (BstEII y HaeIII) de la PCR obtenida del gen hsp65 (la proteína de choque térmico presente en todas las micobacterias) obtenida por iniciadores (Tb11 5'-ACCAACGATGGTGTGTCAT y Tb12 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT) y ofrece la ventaja de identificar varias especies con un solo experimento y la utilización de únicamente dos enzimas de restricción, a diferencia de los otros métodos que utilizan un mayor número de enzimas de restricción²⁴.

Se realiza el presente estudio con el objetivo de identificación de especie de los casos de tuberculosis ganglionar, para micobacterias no tuberculosas, en población de pacientes adultos con y sin infección por VIH, que son tratados en el Hospital General de México, a partir de la técnica de identificación por PCR-RFLP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las especies de micobacterias no tuberculosas identificadas por PCR-RFLP (restriction fragment-length polymorphism) como agentes etiológicos en los casos de tuberculosis ganglionar en adultos mexicanos con y sin infección por Virus de Inmunodeficiencia Adquirida, en el Hospital General de México?

JUSTIFICACIÓN

Las micobacteriosis extrapulmonares son padecimientos que pueden estar causados por *Mycobacterium tuberculosis* o por micobacterias no tuberculosas (MNT), por lo que su identificación rápida es crucial para una oportuna terapia específica, además de que conocer la especie es un dato importante en la vigilancia de salud pública. Los métodos de identificación de especies micobacterianas 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 la ventaja de ser más sencillos.

Existen reportes que indican un cambio en la epidemiología de las enfermedades producidas por MNT, en donde se registra un incremento en las infecciones pulmonares y extrapulmonares en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos y un incremento en la resistencia a fármacos de primera línea para el tratamiento. El método del PCR permite la fenotipificación del complejo Tuberculosis y MNT en cepas obtenidas por cultivos tanto sólidos como líquidos. Lo cual podrá identificar de manera más exacta y rápida el tipo de micobacteria involucrado en los casos de tuberculosis ganglionar registrados en nuestro hospital.

HIPÓTESIS

La identificación de *Micobacterias no Tuberculosas* por PCR-RFLP es más frecuente en los cultivos de tuberculosis ganglionar de los pacientes del Hospital General de México.

O B J E T I V O S

Objetivo general

Conocer la epidemiología de los agentes causales de casos de tuberculosis ganglionar mediante la identificación de especie con la utilización de las técnicas de PCR-RFLP realizado en cultivos en medio de MGIT 960, en casos de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México, en el período comprendido de 2010 a 2012.

Objetivos específicos

Describir:

- La frecuencia de los casos de tuberculosis ganglionar causados por micobacterias no tuberculosas
- La fenotipificación de las cepas aisladas de pacientes de tuberculosis ganglionar en el Hospital General de México

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal retrospectivo y prospectivo, de muestras de biopsia de pacientes con linfadenopatías cervicales con sospecha diagnóstica de tuberculosis en el periodo de enero del 2010 a enero del 2012, en un hospital de concentración de tercer nivel. Los criterios de selección fueron pacientes mayores de 15 años que tuvieran crecimiento de cadenas ganglionares cervicales, temperatura mayor a 37.5°C, pérdida de peso, mal estado general, sin tratamiento previo con drogas antituberculosas; el diagnóstico de tuberculosis fue sugerido por la presencia de la formación típica del granuloma con células epiteloides en la biopsia y confirmada por el cultivo positivo o de la respuesta a la terapia específica con 1 año de seguimiento. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y se obtuvieron cartas de consentimiento informado.

A cada uno de los pacientes se les hizo historia clínica completa, estudios hematológicos, VIH por ELISA y confirmación por Western-blot, y radiografía de tórax. Además prueba cutánea con el derivado purificado de la proteína (PPD-RT23, Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca).

En cada paciente se obtuvo una biopsia de un nodo linfático afectado para análisis histopatológico, microbiológico y de biología molecular. Las pruebas se estudiaron de forma independiente y a ciegas:

Para el estudio histopatológico, los fragmentos fueron fijados en formol al 10% extendidos en parafina, seccionados y teñidos con eosina-hematoxilina y examinados para determinar sus características. El resultado fue sugestivo de tuberculosis cuando presentaban la formación típica del granuloma con focos de necrosis caseosa y alrededor una capsula hialina con licuefacción y si las células epiteloides estaban presentes. Otros cambios histopatológicos de no tuberculosis fueron estudiados de la misma manera.

Los estudios bacteriológicos fueron realizados en los especímenes homogenizados en la solución salina isotónica, buffer-fosfato y descontaminada con la solución de hidróxido de sodio al 4%. Después de la neutralización y la centrifugación, cada homogenizado fue suspendido de nuevo en el agua destilada. Los bacilos acido-resistentes (AFB) fueron identificados por la tinción de Ziehl-Neelsen. Para los cultivos, 0.2mL partes alícuotas de los homogenizados de la biopsia fueron inoculadas en las botellas con el medio líquido fluorescente de MGIT 460 (Tubo del Indicador del Crecimiento de Mycobacterium, Becton Dickinson, San José, CA, los E.E.U.U.). Los medios fueron incubados a 37°C por ocho semanas e inspeccionados semanalmente para el crecimiento.

Con lo que respecta a las pruebas de biología molecular el ADN genómico fue extraído mediante choque térmico, colocando los criotubos que contenían 1 mL de una suspensión de las cepas, en un termobloque a 95 °C durante 1h. Posteriormente los criotubos se almacenaron a -20 °C durante 10 minutos o bien hasta su uso.

Amplificación de la secuencia de inserción IS6110 por PCR punto final

Se preparó una mezcla de reacción a un volumen final de 47 µL, conteniendo 29.8 µL de agua grado biología molecular, 5 µL de regulador (10X), 10 µL de una mezcla de dNTP 10 mM, 1 µL de cada uno de los iniciadores diseñados en este estudio IS6110F (5'-ggATCCgCCAgCCCAggATCCTgCg-3') e IS6110R (5'-AggTgCggACCACCAgCACCTAACC-3'), 0.2 µL de Taq polimerasa recombinante 5 U/µL (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y 3 µL de ADN previamente extraído. Las condiciones de reacción consistieron en una pre-incubación a 94 °C durante 1 min, seguido de 45 ciclos de 15 seg a 94 °C, 50 seg a 70°C y 7 min a 72 °C; siendo el producto de amplificación esperado de 140 pb. Los productos de PCR fueron observados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5% empleando GelStar™ (Lonza Group

Ltd, EE.UU) como intercalante de bases y utilizando un fotodocumentador (BioRad Laboratories, California, EE.UU). La cepa H37Rv fue empleada como control positivo.

Amplificación del gen hsp65 por PCR punto final

Se emplearon los iniciadores Tb11 (5'-ACC AAC gAT ggT gTg TCC AT-3') y Tb12 (5'-CTT gTC gAA CCg CAT ACC CT-3') propuestos por Telenti ²², y empleando las siguientes condiciones de reacción: el volumen total de la mezcla de reacción fue de 45 μ L la cual contenía 26.8 μ L de agua grado biología molecular, 5 μ l de regulador 10X, 10 μ l de una mezcla de dNTP 10 mM, 1 μ L de cada uno de los iniciadores, 0.2 μ L de Taq polimerasa recombinante 5 U/ μ L (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 3 μ L de DMSO y 5 μ L del ADN previamente extraído. Las condiciones de reacción consistieron en una pre-incubación a 94 °C durante 1min, seguido de 35 ciclos de 20 seg a 94 °C, 30 seg a 58 °C y 20 seg a 72 °C, con una extensión final de 7 minutos a 72 °C; siendo el producto de amplificación esperado de 441 pb. Los productos de PCR fueron visualizados como se mencionó anteriormente.

Análisis del patrón de restricción de hsp65

Los productos de amplificación de 441pb del gen *hsp65* fueron digeridos empleando la enzimas de restricción BstEII y HaeIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La mezcla de digestión se preparó por separado para cada enzima conteniendo: 12 μ L de agua grado biología molecular, 2 μ L de regulador específico para cada enzima, 1 μ L de enzima (U/ μ L) y 5 μ L del producto de amplificación obtenido, incubando a 60°C y 37°C durante 1 h, respectivamente. El análisis de los fragmentos obtenidos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa Nusieve™ 3:1 (Lonza Group Ltd, EE.UU) al 3%. La

digitalización de la imagen obtenida del corrimiento electroforético se realizó mediante un fotodocumentador (BioRad Laboratories, California, EE.UU).

Los tamaños de los fragmentos obtenidos fueron determinados con el marcador de tamaño molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y el patrón correspondiente a la cepa control. La interpretación de los resultados se basó en los algoritmos descritos por Devallois (1999), Brunello (2001) y Chimara (2008).

El tratamiento específico estrictamente supervisado con las drogas isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol fue iniciado en los casos en los cuales la tuberculosis fue comprobada por cualquier método. En los pacientes VIH-positivos se indicó además la combinación de zidovudine y lamivudina con efavirenz o niverapina, respuesta clínica fue evaluada en el primer año o hasta observar la completa resolución del proceso.

RESULTADOS

De un total de 150 biopsias ganglionares de pacientes que se ingresaron por sospecha de tuberculosis ganglionar, de ellas seis casos con biopsias ganglionares coexistieron con tuberculosis pulmonar y una con tuberculosis meníngea. En el periodo comprendido de enero del 2010 a enero del 2012 solo 45 biopsias ganglionares (26%) fueron confirmados por cultivo (MGIT) positivo para *M. tuberculosis*; hubo 20 pacientes con infección por VIH positivo, de este grupo 17 del género masculino y tres del femenino con una edad media de 32.8 ± 12 años. El valor medio del conteo de CD4 fue 108 cels/mm^3 , con una desviación estándar de 53.4 cels/mm^3 . De los pacientes con VIH positivo, 15 (75%) presentaron linfadenopatía unilateral, 10 de la cadena linfática cervical derecha y cinco de la izquierda, y cinco (25%) pacientes tenían afectación bilateral. La sintomatología más frecuente fue fiebre (75%) y mal estado general (90%), tres pacientes tenían tuberculosis pulmonar y uno tuberculosis meníngea.

Un grupo control se conformo por 25 pacientes VIH negativos, 20 del género masculino y cinco del femenino con una edad media de 49.6 ± 13.5 años, se observo una diferencia significativa entre los grupos en estudio, por prueba de T-Student para muestras independientes ($p\text{-value} \leq 0.001$). 18 pacientes (90%) presentaron linfadenopatía unilateral, 12 de la cadena linfática cervical derecha y seis de la izquierda y dos (10%) tenían afectación bilateral. La sintomatología más frecuente fue fiebre (90%) y mal estado general (40%). Tres pacientes coexistieron con tuberculosis pulmonar.

La prueba de χ^2 de Pearson entre sexo y status de VIH, no tuvo diferencia estadística significativa al 95% de confianza, observándose que el 80 y el 85% de la población en estudio son del género masculino para aquellos con VIH positivo y VIH negativo respectivamente. (tabla 1, tabla 2)

Estudios Bacteriológicos

La mayoría de los cultivos se identificaron como parte del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (91.1%). En las biopsias de nodo linfático de pacientes VIH positivo la tinción de Zhiel-Neelsen fue positiva en siete casos (35%), el crecimiento de *Mycobacterim* por el medio BACTEC (MGIT-360) fue positiva en todos los 20 casos con un promedio de crecimiento de 32 días, el estudio histopatológico demostró la caseificación granulomatosa compatible con la infección tuberculosa en 17 casos y en tres se reportó hiperplasia linfo reticular no específica. En las biopsias de nodo linfático de pacientes VIH negativos la tinción de Zhiel-Neelsen fue positiva en 10 casos (50%), el crecimiento de *Mycobacterim tuberculosis* fue positivo con promedio de crecimiento de 25 días, el estudio histopatológico demostró caseificación granulomatosa compatible con la infección tuberculosa en el 100% de los casos. (tabla1, tabla 2)

La quimioterapia estándar con cuatro drogas (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) fue iniciada en todos los pacientes en el momento del diagnóstico.

Identificación de micobacterias no tuberculosas resultados por PCR-RFLP de hsp65

A partir de las 40 de cepas aisladas del material de biopsia de nodos linfáticos, en el grupo VIH positivo, 17 (85%) fueron identificadas como pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* al obtenerse un ampliación de aproximadamente 140 pb (figura 1), correspondiente a la secuencia de inserción IS6110. Tres (15%) cepas no presentaron un producto de amplificación para IS6110, por lo cual la identificación de la especie se realizó mediante PCR-RFLP. Los patrones de restricción obtenidos para la ampliación de 441 pb de *hsp65* de las cepas de estudio (figura 2), fueron comparados con los reportados en la literatura consultada detectándose a las especies:

Dos (10%) *M. avium intracellulare* y una cepa (5%) a *M. gordonae*, del grupo VIH positivo.

Del grupo VIH negativos 24 (95%) cepas correspondieron al complejo *Micobacterium tuberculosis* y una cepa (5%) se identificó como *M. fortuitum*.

La reactividad cutánea con PPD (un halo de induración >10mm) fue positiva en cinco (25%) pacientes VIH positivo y 12 (60%) casos positivos en los pacientes VIH negativos. Para determinar diferencias entre la detección del PPD y el status de VIH se realizó una prueba χ^2 de Pearson, que no tuvo datos estadísticamente significativos al 95% de confianza (p-value=0.11).

En el grupo de pacientes VIH positivos, 16 fallecieron antes de un año, de los cuatro restantes a un año de seguimiento de iniciar tratamiento específico tuvieron curación de la adenopatía. En el grupo de pacientes VIH negativos 17 casos tuvieron curación, dos mejoría discreta y uno abandono el tratamiento.

DISCUSION

En años recientes las infecciones por micobacterias no tuberculosas han cobrado importancia debido a su asociación con la infección por VIH y el reconocimiento de afección pulmonar con mayor frecuencia aun en pacientes sin inmunocompromiso. De igual forma otro factor importante en el diagnóstico se debe a la mejoría en la metodología para el aislamiento e identificación de estas especies, lo cual ha detectado un incremento en el número de micobacterias no tuberculosas.¹⁷

La infección por micobacterias no tuberculosas, se describía como exclusiva en tres grupos especiales, el primero pacientes con infección por VIH con cuentas celulares por debajo de $50/\mu\text{l}$, y con presentación de tuberculosis diseminada; en segundo lugar pacientes con síndromes genéticos como mutaciones de Interferon gamma, interleucina 12, también con presentación diseminada; y el último grupo asociado con bronquiectasias, y afección pulmonar.¹⁷

En esta última revisión del total de pacientes con diagnóstico de tuberculosis ganglionar tanto el grupo de pacientes con infección por VIH, como aquellos seronegativos, la identificación del complejo *M. tuberculosis* fue más frecuente, más del 80% para ambos, lo cual coincide con las publicaciones internacionales. Del total de pacientes con resultados positivos en el grupo de infección por VIH la cuenta celular de CD4 se encontraba por debajo de $100 \text{ cells}/\text{mm}^3$, una cuenta celular por debajo de $100 \text{ cells}/\text{mm}^3$, se asocio hasta en 60.9% con cultivos positivos para tuberculosis ganglionar, lo que aparentemente corresponde con una sensibilidad mayor mientras menor sea la cuenta celular de CD4 en estos pacientes.¹⁸

De los casos positivos al PPD se encontró mayor número de casos positivos en pacientes sin infección por VIH, que en el grupo de VIH 60% y 25% respectivamente. La respuesta

positiva al PPD puede ocurrir en pacientes con infección por *M. tuberculosis*, hasta en el 75% de los casos, o presentarse como una reacción intermedia en casos con antecedente de vacunación con BCG o infecciones por micobacterias no tuberculosas.² En el Hospital General de México (HGM) en una serie previa, el PPD fue positivo en 50% de los casos diagnosticados como tuberculosis ganglionar.¹⁴

Los hallazgos histopatológicos de hiperplasia linfocitaria no específica, y no la presencia de granulomas típicos y material caseoso, es más frecuente en pacientes con infección por VIH, debido al déficit de linfocitos T para la formación de células epiteloideas, que están presentes en el granuloma; en estos pacientes es más frecuente encontrar formaciones atípicas de granulomas necrotizados.²

El uso de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, en especial la reacción de cadena de polimerasa (PCR), se usan más frecuentemente, sin embargo en el caso específico del diagnóstico e identificación para tuberculosis ganglionar, se desconocen de manera adecuada su eficacia y efectividad, y su sensibilidad en población con algún grado de inmunocompromiso, como lo es la infección por VIH; población mayormente afectada no solo por el complejo de *M. tuberculosis* sino también por micobacterias no tuberculosas, lo cual dificulta aún más su diagnóstico y por lo tanto el inicio temprano y eficaz de tratamiento.²¹ La mayor parte de los casos registrados, son secundarios a la infección por el complejo de *M. tuberculosis*, entre ellos *M. bovis*², el cual ha disminuido su incidencia en los últimos años; sin embargo el incremento en la identificación de otras micobacterias como las no tuberculosas se ha documentado, sobre todo en países en desarrollo; de las micobacterias no tuberculosas identificadas con mayor frecuencia son *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, y el complejo *M. avium-intracellulare*.²

En el caso específico de la técnica PCR-RFLP, registrada desde 1993, desarrollada por la amplificación del fragmento hsp65, es posible identificar entre el género *Mycobacterium*, con sensibilidades y especificidad de hasta del 100% y 74% para *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosis respectivamente.²¹

En el estudio de Devallois²⁵ 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.²⁵ Bruello y col., en 2001 identificaron 54 especies por medio del método de PCR-RFLP de hsp65.²⁶ El algoritmo propuesto incluyó 32 especies ya descritas y 22 especies adicionales.²⁶ Chimara y col. en 2008²⁷ realizaron con la técnica de PCR-RFLP de hsp65 la identificación de micobacterias, en 5010 cultivos de donde obtuvieron 434 aislamientos. Se concluyó que la prueba de PCR-RFLP de hsp65 fue más precisa que las pruebas fenotípicas (92 -90.3%- frente a 338 -77.9%- respectivamente; $p < 0.0001$).²⁷ En un estudio realizado en Etiopia de 964 cultivos de pacientes con diagnóstico de tuberculosis ganglionar, se determinaron por secuencias de polimorfismo PCR-RFLP en tuberculosis ganglionar, 10 casos de micobacterias no tuberculosas, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, y *M. simiae*. El resto se identificó como causante al complejo *M. tuberculosis* (71%).²⁸

El tratamiento para las formas extrapulmonares por micobacterias no tuberculosas se basa frecuentemente en la administración de macrólidos, y manejo quirúrgico por debridación del nodo afectado, el caso específico de linfadenitis por micobacterias no tuberculosas, por el complejo *Mycobacterium avium*, la respuesta a tratamiento quirúrgico presenta hasta del 90% de curación, en los casos en los que no tienen mejoría, se puede agregar al tratamiento un macrólido.¹⁷

Se requiere continuar estudiando la infección por micobacterias no tuberculosas, uno de los problemas más severos en la falta de información, es que esta infección se considera una enfermedad que ocurría de manera esporádica y por lo tanto no era un problema de salud pública. Actualmente se clasifican como una enfermedad emergente. Se requieren nuevos métodos de detección, y mayor información sobre la efectividad del tratamiento. Aunque probablemente el costo beneficio no es tan claro como en el caso de las micobacterias tuberculosas para población en general, las micobacterias no tuberculosas puede ser tratadas de modo más específico valorando los resultados del tratamiento a largo plazo.

CONCLUSIONES

La linfadenopatía cervical constituye un reto diagnóstico, por la multiplicidad de micobacterias que la pueden generar, procesos infecciosos que se confunden con neoplasias, sin embargo la tuberculosis continua siendo una lo de los primeros diagnósticos diferenciales, y el principal sitio de manifestación extrapulmonar de la tuberculosis, sobre todo en pacientes con algún grado de inmunocompromiso. El método PCR-RFLP, tiene buena sensibilidad, y la ventaja de ser más rápido en el tiempo de identificación de las micobacterias causantes de formas extrapulmonares sospechosas de tuberculosis, lo cual facilita el diagnóstico y el inicio del tratamiento de manera adecuada.

REFERENCIAS

1. Udwadia Z, Sen T; "Pleural tuberculosis: an update"; Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2010, 16:399-406
2. Handa U, Mundi I, Mohan S; "Nodal tuberculosis revisited: a review"; J Infect Dev Ctries 2012; 6:6-12.
3. Torgensen J, Dorman S, Baruch N, Hooper N, Cronin W; "molecular epidemiology of pleural and other extrapulmonary tuberculosis: a mariland state review"; Clinical Infectious Diseases, 2006; 42:1375-82.
4. Steingart K, Henry M, Laal S, Hopewell P, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M; "a systematic review of commercial serological antibody detection test for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis"; Thorax 2007;62:911-918.
5. R. Cicero, A. Hernández-Solís, E. Ramírez-Casanova, A. Escobar-Gutiérrez. Frecuency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and HIV-negative Mexican patients. Eur J Clin Microbiol Infect 2009;28:455-460.
6. Padmapriyadarsini C; Narendran G, Swaminathan S; "Diagnosis and treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients"; Indian J Med Res, 2011,134: 850-865.
7. Khan F, Minion J, Pai M, Royce S, Burman W, Harries A, Menzies D; "Treatment of active tuberculosis in HIV-coinfected patients: a systematic review and meta-analysis"; Clinical Infectious Disease, 2010; 50: 1288-1299.
8. S Jayne, Garba D, FombahA, Mendy A, Mendy F, Antonio M, Townend J, Ideh R, Corrah T, Ota M; "highly accurate diagnosis of pleural tuberculosis by immunological analysis of the pleural effusion"; PLoS ONE, 2012, 7, e30324.

9. Caminero J; "Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas"; Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, París Francia, 2010.
10. 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.
11. Verma J, Dhavan I, Nair D, Manzoor N, Kasana D; "Rapid culture diagnosis of tuberculous lymphadenitis from a tertiary care centre in an endemic nation: potential and pitfalls"; 2012, 30, 342-345.
12. Kandala V, Kalagani Y, Rao N, Kandala M; "Directly observed treatment short course in immunocompetent patients of tuberculous cervical lymphadenopathy treated in revised national tuberculosis control programme"; Lung India, May, 29, p109-113, 2013.
13. Bogoch I, Andrews JR, Nagami EH, Rivera AM, Gandhi RT, Stone D; "Clinical predictors for the aetiology of peripheral lymphadenopathy in HIV-infected adults", HIV Medicine, 2013, 14, 182-186.
14. Hernández A, Cicero R, Olivera H, Rivero V, Ramírez E, Escobar A; "Tuberculosis is still a major cause of cervical lymphadenopathies in adults from developing countries", Epidemiol. Infect. (2003), 131, 1071-1076
15. Escobar-Escamilla N, Ramírez-González J, González-Villa M, Torres-Mazadiego P, Mandujano-Martínez A, Barrón-Rivera C, Bäcker Claudia, et all; "hsp65 phylogenetic assay for molecular diagnosis of non-tuberulous mycobacteria isolated in Mexico"; Archives of Medical Research, junio 2013.
16. L. Herrera-León, R. Pozuelo-Díaz, T. Molina, A. Valverde, P Saiz, M:S: Jiménez. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo Mycobacterium tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin 2009;27:496-502

17. Griffith D, Aksamit T, Brown B, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland S, Horsburgh R, et al; “ An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases”; *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175: 367-416.
18. Van A, Page L, Mellet K, Scott L, Mkhmnazi M, Jong E, Omar T, Beylis N, Steven W, Sanne I, Menezes C; “Diagnostic accuracy and effectiveness of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of HIV-associated lymph node tuberculosis”; *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, published online may 2013, DOI 10.1007/s10096-013-1890-0.
19. Sharma K, Gupta N, Sharma A, Sing G, Gupta P, Rajwanshi A, Varma S, Sharma M; “Multiplex polymerase chain reaction using insertion sequence 6110 (IS6110) and mycobacterial protein fraction from BCG of Rm 0.64 in electrophoresis target genes for diagnosis of tuberculous lymphadenitis”; 2013, 31, 24-28
20. Kumar P; Manas S et al; “assessment of the N-PCR assay in diagnosis of pleural tuberculosis: detection of *m. tuberculosis* in pleural fluid and sputum collected in tandem”; *PLoS ONE*; Abril 2010, Volume 5, Issue 4; e 10220.
21. Martin A, Uwizeye C, Fissette K, Rijik P, Palimino J, Leao Sylvia, Portaels F; “ Application of the hsp65 PARA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium”; *Journal of Microbiological Methods* 71 (2007) 39-43.
22. Kim H, Kim S, Shim T, Kim M, Bai G, Park Y, Lee S, Chae G, Cha C, Kook Y, Kim B; “Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65)”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55, 1649-1656.
23. Martin A, Uwizeye C, Fissette K, Rijik P, Palimino J, Leao Sylvia, Portaels F; “ Application of the hsp65 PARA method for the rapid identification of mycobacteria

- isolated from clinical samples in Belgium”; *Journal of Microbiological Methods*, 71, 2007 39-43.
24. K. Gopinath, S. Singh. Non-Tuberculous Mycobacteria in TB-Endemic Countries: Are we Neglecting the danger? *Neglected Tropical Diseases*. 2010;615-618.
25. J van Ingen, S.A. Bendien, W.C.M. de Lange, W. Hoefsloot, P.N.R. Dekhuijzen, M.J. Boeree, D van Soolingen. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem, The Netherlands. *Thorax* 2009;64:502-506.
26. 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, nonhomogeneous clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiol Immunol* 2006;50:889-97.
27. A. Rodríguez-Aranda, M.S. Jiménez, J. Yubero, F. Chaves, R. Rubio-García, E. Palenque, M.J. García, M.C. Menéndez. Misidentification of *Mycobacterium kumamotonense* as *M. tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases* 2010;16:1178-1179.
28. Firdessa R, Berg S, Hailu E, Schelling E, Gumi B, Erenso G, Gadisa E, Kiros T, Habtamu M, Hussein J, Zinsstag J, Robertson B, Ameni G, Lohan A, Loftus B, Comas I, Gagneux S, Tschopp, Yahuah L, Hewinson G, Gordon S, Young D, Aseffa A; “Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia”; *Emerg Infect Dis* 2013.
29. Linasmita P, Srisangkaew S, Wongsuk T, Bhongmakapat T, Watcharananan S; “Evaluation of real-time polymerase chain reaction for detection of the 16s ribosomal RNA gene of *Mycobacterium tuberculosis* and the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis in a country with a high tuberculosis incidence”; *Clinical Infectious Diseases*, 2012; 56; 313-21.

30. Caws M, Quang D, Minh P, Thi N, Viet D, Estee M, Thi T, Van N, Tran N, Farrar J; “PCR-restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*”; *J Clinical Microbiology*, 2007, 5:1789-1793.
31. Henry M, Inamdar L, O’Riordain D, Schweiger M, Watson J; “Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response”, *Eur Respi J*, 2004; 23:741-746.
32. Ho C, Hoon S, Sik B, Hoon Choi S, Sung H, Oh C, Soo M, et all; “Diagnosis and species identification of mycobacterial infections by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of sterile body fluids; *Korean J Intern Med*, 2009; 24:135-138.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.

VIH positivo	Genero	Edad	Elisa VIH	W-b	Cd4 cels/mm3	Cultivo MGIT	PCR RFLP	Tinción Z-N	PPD
1	Masculino	18	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Positiva	Positiva
2	Masculino	24	Positivo	Positivo	200	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
3	Masculino	54	Positivo	Positivo	50	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
4	Masculino	32	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
5	Masculino	48	Positivo	Positivo	75	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
6	Femenino	23	Positivo	Positivo	200	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
7	Masculino	19	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
8	Masculino	32	Positivo	Positivo	50	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
9	Masculino	38	Positivo	Positivo	50	Positivo	<i>M. Intracellulare</i>	Negativa	Negativo
10	Masculino	41	Positivo	Positivo	200	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
11	Masculino	35	Positivo	Positivo	150	Positivo	<i>M. Gordonae</i>	Negativa	Negativo
12	Masculino	29	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
13	Masculino	23	Positivo	Positivo	50	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
14	Femenino	65	Positivo	Positivo	50	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
15	Masculino	34	Positivo	Positivo	200	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
16	Masculino	28	Positivo	Positivo	100	Positivo	<i>M. Intracellulare</i>	Negativa	Positiva
17	Masculino	20	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
18	Femenino	27	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
19	Masculino	34	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
20	Masculino	32	Positivo	Positivo	100	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo

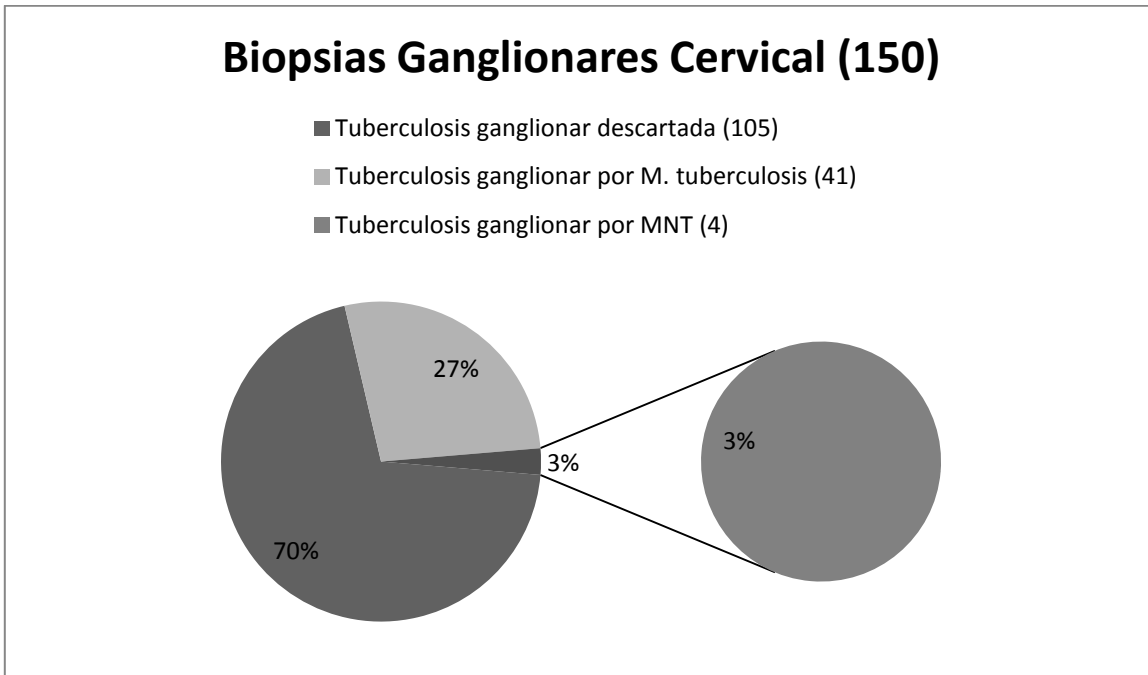
Tabla 1. Características de los pacientes del grupo VIH positivos. W-b Western Blood; CD4 conteo celular; MGIT mycobacteria growth indicator tuve; PCR RFLP restriction fragment-length polymorphism Cmyt Complejo *Mycobacterium tuberculosis*; Tinción Z/N Ziehl Neelsen; PPD pruebas cutáneas con el derivado purificado de la proteína.

Tabla 2.

VIH negativo	Género	Edad	Comorbilidad	Cultivo MGIT	PCR RFLP	Tinción Z-N	PPD
1	Masculino	34	Dm tipo 11	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
2	Masculino	56	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
3	Femenino	23	Negativo	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
4	Masculino	76	Negativo	Positivo	Cmyt	Positiva	Positiva
5	Masculino	65	Negativo	Positivo	<i>M. Fortuitum</i>	Negativa	Positiva
6	Masculino	45	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
7	Femenino	56	Alcoholismo	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
8	Masculino	56	Negativo	Positivo	Cmyt	Positiva	Positiva
9	Masculino	45	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
10	Masculino	56	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
11	Femenino	53	Lupus	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
12	Masculino	75	Dm tipo 11	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
13	Masculino	45	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
14	Femenino	65	Negativo	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
15	Masculino	34	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
16	Masculino	56	Alcoholismo	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
17	Masculino	23	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
18	Femenino	45	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
19	Masculino	47	Negativo	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
20	Masculino	47	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
21	Masculino	43	Alcoholismo	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
22	Masculino	34	Negativo	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo
23	Masculino	51	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Positiva
24	Masculino	54	Negativo	Positivo	Cmyt	Negativa	Negativo
25	Masculino	57	Dm tipo 11	Positivo	Cmyt	Positiva	Negativo

Tabla 2. Características de los pacientes del grupo VIH negativo, grupo control; MGIT mycobacteria growth indicator tuve; PCR RFLP restriction fragment-length polymorphism Cmyt Complejo *Mycobacterium tuberculosis*; Tinción Z/N Ziehl Neelsen; PPD pruebas cutáneas con el derivado purificado de la proteína.

Gráfica 1.



Gráfica 1. Del un total de 150 biopsias de ganglios cervicales, se confirmaron para tuberculosis ganglionar por cultivo MGIT un total de 40 muestras. De estas muestras 36 ganglios fueron identificados al complejo *M. tuberculosis*, y 4 a micobacterias no tuberculosas (MNT).

Tabla 3.

Grupos	<i>Micobacterium tuberculosis</i>	Micobacterias no tuberculosas
Grupo VIH +	17	3
Grupo VIH -	24	1

Tabla 3. Del grupo VIH positivo, 17 ganglios fueron positivos para el complejo *M. tuberculosis*, y tres ganglios se identificaron micobacterias no tuberculosas, en el grupo control, VIH negativo, 24 ganglios fueron positivos para el complejo *M. tuberculosis*, y un ganglio para micobacteria no tuberculosa.

Tabla 4.

Grupos	PPD(-)	PPD (+)
Grupo VIH +	15	5
Grupo VIH -	13	12

Tabla 4. A todos los casos positivos para tuberculosis ganglionar, se realizo la prueba cutánea PPD, del grupo VIH positivo, 15 pacientes presentaron una respuesta negativa, y solamente cinco positivo. Del grupo control, VIH negativo, ocho pacientes se reportaron como respuesta negativa y 12 como positiva, de estos pacientes

FIGURAS

Figura 1.

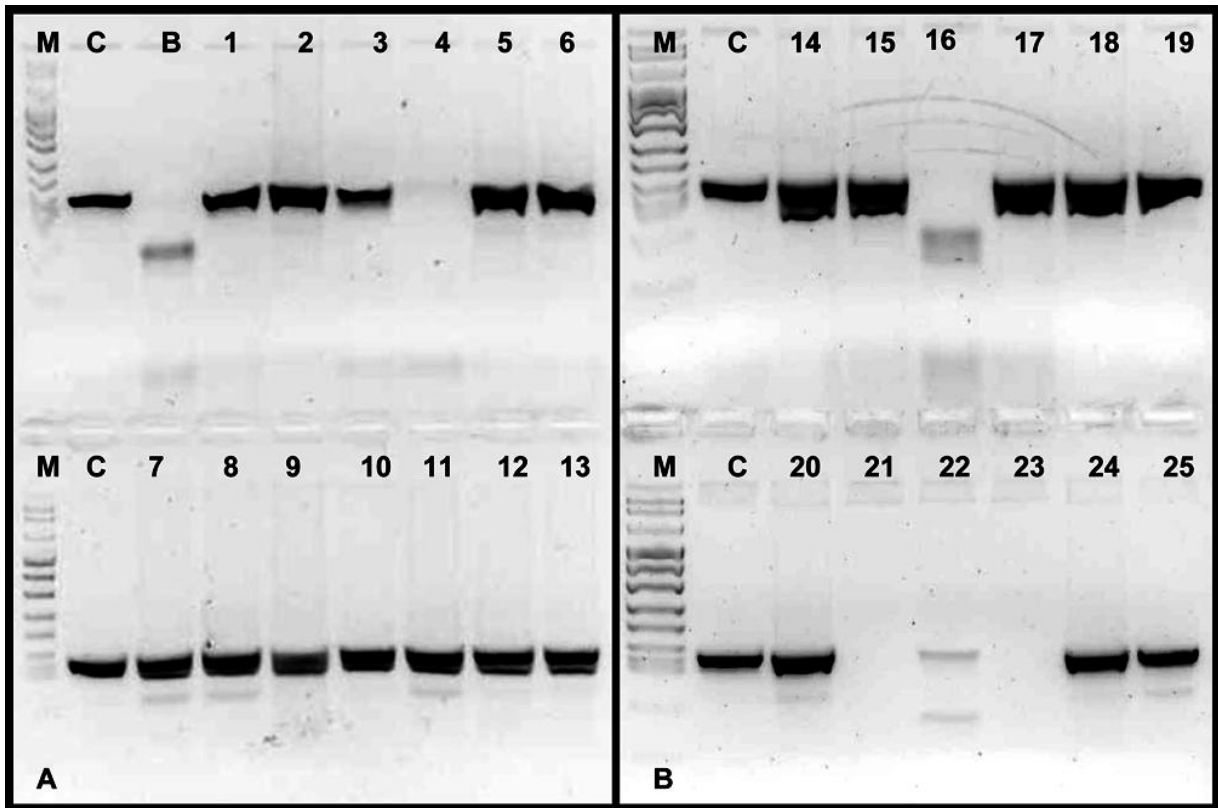


Fig 1. Amplificación de la secuencia de inserción IS6110 de cepas identificadas como Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. A y B) Electroferogramas de los amplicones obtenidos para IS6110 en las cepas de estudio; M) marcador de tamaño molecular (Marker VIII) de 1140-25 pb; C) cepa control H37Rv *M. tuberculosis*; cepas identificadas como CMT 1) cepa 142, 2) cepa 150, 3) cepa 163, 5) cepa 015, 6) cepa 016, 7) cepa 017, 8) cepa 018, 9) cepa 019, 10) cepa 020, 11) cepa 021, 12) cepa 022, 13) cepa 023), 14) cepa 024, 15) cepa 025, 17) cepa 027, 18) cepa 028, 19) cepa 030, 20) cepa 031, 22) cepa 033, 24) cepa 035, 25) cepa 036. Las cepas negativas a CMT fueron 4) 006, 16) 026, 21) cepa 032 y 23) cepa 034.

Figura 2.

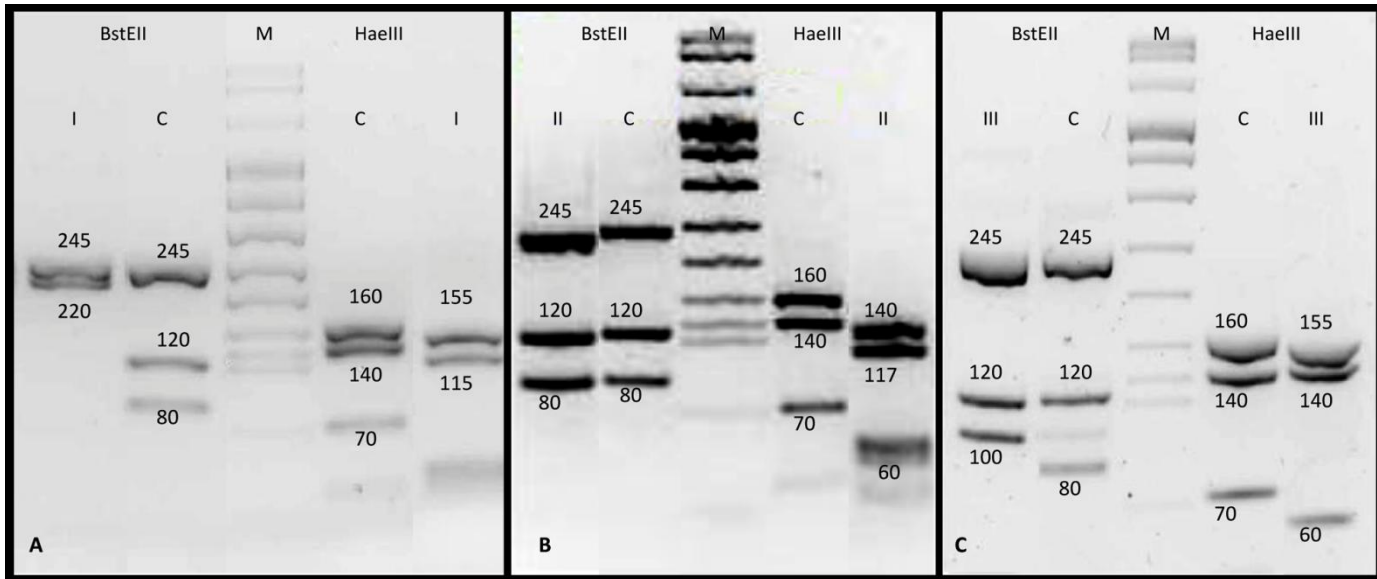


Fig 2. PCR-RFLP. Patrón de restricción del producto de amplificación del gen *hsp65* de 441 pb de las cepas de estudio. Se emplearon las enzimas de restricción BstEII y HaeIII para digerir el control y las muestras. En el electroferograma se muestran el tamaño de los fragmentos obtenidos. M) marcador de tamaño molecular (Marker VIII) de 1140-25 pb. C) Patrón de restricción para la cepa H37Rv, empleada como control. I) patrón de la cepa correspondiente a *Mycobacterium gordonae*; II) patrón de la cepa *M. fortuitum*; III) la cepa presenta el patrón que la identifica como *M. avium intracellulare*.