

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema:

Las micobacterias atípicas son un grupo heterogéneo de microorganismos (saprofitas, patógenas u oportunistas) distribuidos ampliamente en la naturaleza. Este grupo comprende a todas las micobacterias a excepción del complejo *M. tuberculosis*, patógeno estricto. En la actualidad se conocen más de 96 especies atípicas, de las cuales casi la mitad se han aislado en procesos infecciosos humanos, generalmente en infecciones post-quirúrgicas de procedimientos estéticos, infecciones asociadas con catéteres, enfermedades cutáneas diseminadas, enfermedades pulmonares y afección del sistema nervioso central (Castro et al.,2007).

La tasa de micobacteriosis¹ pulmonar y extra pulmonar se ha incrementado en los últimos años debido al advenimiento de las micobacterias atípicas a nivel mundial, evidenciando su campo de acción en pacientes deficientes en su inmunidad celular, fundamentalmente en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y en pacientes con micobacteriosis post operatoria (Caminero, 2001).

La identificación microbiológica clásica de micobacterias(morfología de colonias, cultivo, velocidad de crecimiento, características de pigmentación y pruebas bioquímicas) conlleva varios y arduos procesos que pueden demorar varias semanas después de la recepción de las muestras, específicamente 3 a 6 semanas; y aún así, en algunos casos no se logra identificar correctamente los microorganismos, debido a que los protocolos disponibles no cuentan con la especificidad para determinar las más de 96 especies de micobacterias existentes. Por tales desventajas en la rapidez diagnóstica y la dudosa especificidad, se optó en implementar la técnica molecular PCR Restriction Enzyme Analysis (PRA) para la identificación de micobacterias atípicas, como alternativa diagnóstica eficaz y precisa que reduce el tiempo de la emisión de resultados a apenas 48 horas (Chimara, 2008).

¹ **Micobacteriosis:** La Organización Mundial de la Salud define la micobacteriosis, como la infección bacteriana producida por micobacterias no tuberculosas.

Cabe destacar que, siendo la demora en el diagnóstico una de las mayores causas de mortalidad en pacientes inmunodeprimidos, es primordial para el médico tratante adoptar por un tratamiento específico y rápido que prolongue la expectativa de vida para el paciente. Por tal razón las técnicas de biología molecular han constituido siempre la herramienta de elección, y en fechas recientes, dichas estrategias moleculares han comenzado a aplicarse para identificar micobacterias directamente en los fluidos biológicos de pacientes con fines diagnósticos.

Además, los métodos tradicionales empleados para diagnosticar micobacterias atípicas, no dan información alguna sobre las nuevas especies de micobacterias ambientales con diverso grado de patogenicidad que se han descubierto en la última década. Por tanto, para propósitos de vigilancia epidemiológica, las técnicas moleculares como la genotipificación de aislamientos clínicos, son de vital importancia (Hong, 2005).

Por el momento, es difícil contar con información confiable, veraz y actual sobre la frecuencia de enfermedades producidas por micobacterias atípicas debido a la escasa notificación por la no obligatoriedad del reporte de casos de micobacteriosis; por la inadecuada distinción de aislamientos en laboratorios y reportes de casos irreales de la enfermedad (García, 2005). Sin embargo en el Ecuador DOTS² ha identificado 55 casos de infecciones por micobacterias atípicas desde el 2001 al 2005, considerándolas epidemiológicamente no importantes.

En el Hospital Vozandes Quito Ecuador se ha identificado 27 casos de micobacteriosis desde el año 2003 hasta Junio del 2008, esta cifra es relativamente elevada con respecto a la tasa que describe DOTS, entidad pública que en comparación con las entidades privadas, tiene acceso a la investigación científica del campo micobacteriano, debido a que el estado Ecuatoriano centraliza todos los casos reales o irreales, a través del Ministerio de Salud y el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, que en conjunto; impulsan la estrategia DOTS.

² DOTS: Tratamiento Acortado Directamente Observado.

1.2. Justificación:

Las micobacterias atípicas son de gran importancia en la patología clínica e infecciosa de pacientes inmunodeprimidos, especialmente en pacientes portadores del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y de pacientes transplantados (Hale & Pfyffer, 2001).

Esta investigación es importante porque identifica y caracteriza con métodos moleculares las cepas atípicas obtenidas de pacientes ecuatorianos, diferenciándolas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

El presente estudio es novel en la investigación de micobacterias atípicas en nuestro país, y reviste de gran importancia para el diagnóstico molecular de micobacterias atípicas, debido a que en el Ecuador se han realizado estudios moleculares en base a la técnica de inserción IS 6110, secuencia característica del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*; más no se ha experimentado en el ámbito molecular de las micobacterias atípicas. En las revisiones bibliográficas de micobacterias atípicas en el Ecuador, se habla de manera general sobre el término que las engloba, pero no existe ninguna publicación acreditada sobre estudios moleculares dirigidos a la caracterización de los patrones enzimáticos de restricción para micobacterias atípicas.

Existen métodos alternativos como la cromatografía en capa fina, cromatografía gas- líquido, cromatografía líquida de alta resolución y secuenciamiento del gen 16S ARNr, los cuales han sido utilizados para en la identificación de las micobacterias. Sin embargo su uso está limitado a laboratorios de alta tecnología por el excesivo costo de los equipos, por ende el costo del examen para el diagnóstico es muy costoso, por esta razón es importante el desarrollo del método PRA, debido a que proporciona resultados confiables, atendiendo un valor económico, asequible a todos los pacientes de diferente estrato social (Devallois et al., 2002).

Los métodos modernos de biología molecular, en particular los basados en la PCR, como es el caso de PRA, técnica objeto de estudio en la presente investigación; ofrece la posibilidad de identificar de manera precisa a una gran diversidad de microorganismos atípicos, ya que, su esencia radica en el uso de iniciadores “primers”,

dirigidos contra secuencias genómicas específicas de género y especie; más una digestión con enzimas específicas, tipificando las micobacterias atípicas (Prisco, 2007).

La identificación clásica de micobacterias realizada a nivel clínico se basa en un conjunto de métodos que pueden demorar varias semanas después de la recepción de las muestras y aún así, en algunos casos no se logra identificar que tipo de micobacteriosis presenta, por lo tanto en ausencia de medios de diagnóstico rápidos, sencillos y precisos para la identificación de micobacterias atípicas se optó en implementar la técnica molecular PRA como alternativa diagnóstica eficaz y moderna que presenta resultados en tan solo 2 días (Araya, 2006).

La técnica molecular (PRA) es en una técnica de apoyo diagnóstico crucial para la adopción de una terapia específica en los pacientes, que permita su pronta recuperación, evite una posible diseminación de la enfermedad y disminuya la generación de resistencia a los antibióticos antituberculosos. Esta técnica se implementó por primera instancia en el Hospital Vozandes de Quito y en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la PUCE, con la finalidad de ofrecer el servicio a la ciudadanía a bajo costo abordando la problemática de la micobacteriosis desde una perspectiva poblacional.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General:

- Implementar la técnica de diagnóstico molecular PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis) como método de identificación de micobacterias atípicas (MNT) de importancia clínica en el Ecuador.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Optimizar el método de diagnóstico molecular PRA en pacientes con diagnóstico atípico y en cepas atípicas ATCC.
- Identificar especies y subtipos de micobacterias atípicas, utilizando el método de diagnóstico molecular, PRA.

- Diferenciar a través de análisis molecular cepas de *M. tuberculosis complex* de micobacterias atípicas.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Género *Mycobacterium*.

1.4.1.1. Características

El orden de los Actinomycetales incluye la familia Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, Nocardiaceae y Streptomycetaceae. La familia Mycobacteriaceae contiene un solo género, el género *Mycobacterium* (Dorronsoro, 2007).

Mycobacterium significa hongo-bacteria, y esta denominación se debe al aspecto de los cultivos, que en ciertos aspectos recuerdan al de los hongos (Dorronsoro, 2007).

El género *Mycobacterium* está formado por microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variables (bacilar o cocoide), no esporulados con un tamaño de 0.2 a 0.6 x 1 a 10µm; no poseen flagelos ni cápsula (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2005).

En su estructura básica consta de pared celular, característica de las bacterias grampositivas, una membrana citoplasmática interna cubierta con una gruesa capa de peptidoglucano y carente de membrana externa. No obstante, la pared celular de las micobacterias es notablemente más compleja que la de cualquier otra bacteria grampositiva, debido a los componentes lipídicos, los cuales representan el 60% de la pared celular (Murray P., Rosenthal K., Pfaller M., 2005).

La alta concentración de lípidos, las hace fuertemente hidrofóbicas, muy resistentes a agentes químicos y con una reducida permeabilidad a los diferentes colorantes (Murria, 2005).



Figura 1.1. Género *Mycobacterium*

Fuente: The *Mycobacterium* Genome Program, 2007

Esta pared consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina o glicina en el caso de *M. leprae*. Esta capa da rigidez y forma a la bacteria. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Se trata de ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el *cord factor* (trehalosa 6,6'-dimicolato) y por mucósidos. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica de resistencia a la decoloración en las tinciones BAAR³, y manteniendo el primer colorante como carbolfucsina (tinción de Ziehl-Neelsen y Kinyoun) o fluorocromos (auramina-rodamina), para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (SEIMC, 2005).

³ BAAR: Bacilo Ácido Alcohol Resistente.

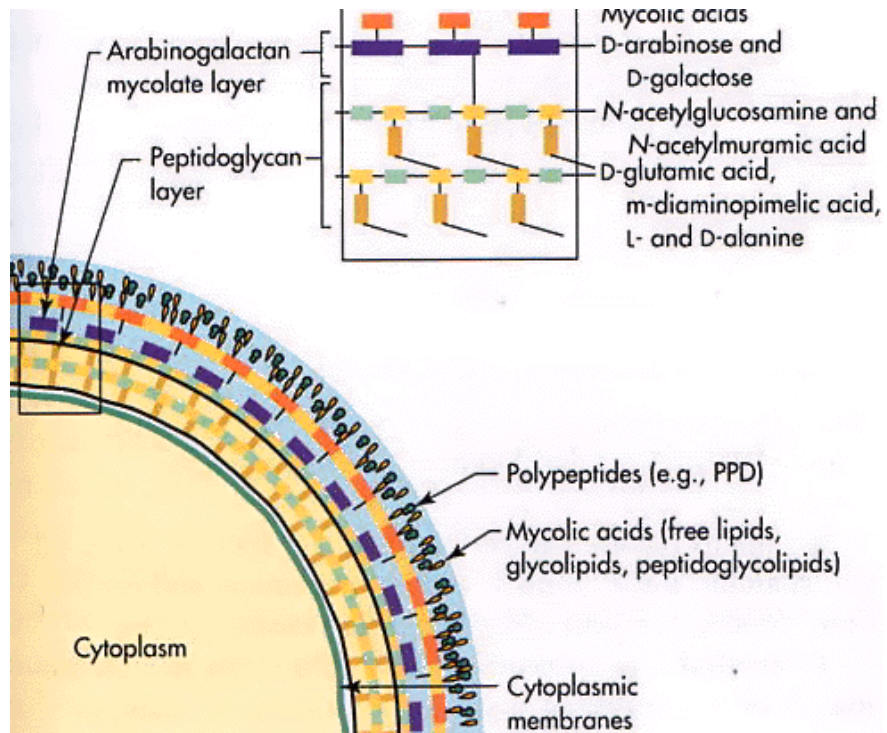


Figura 1.2. Representación esquemática de la pared celular de Micobacterias

Fuente: Gorocica, 2005.

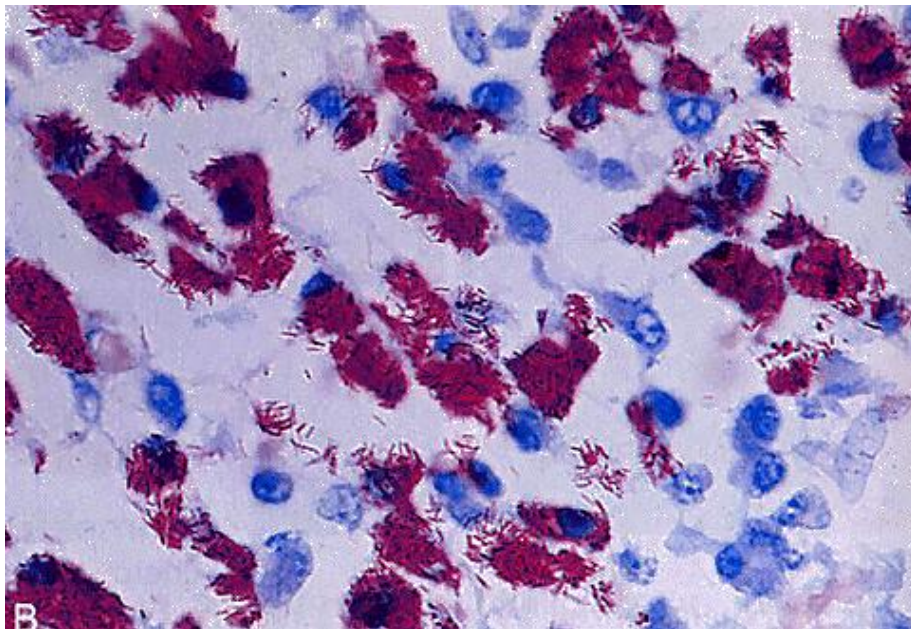


Figura 1.3. Tinción Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium tuberculosis*

Fuente: Saini, 2001.

Las micobacterias, son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, siempre que estén protegidos de la luz solar, y son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Resisten la desecación y la congelación, pero la luz ultravioleta y el calor (>65° C durante 30 minutos) las inactiva. También son inactivadas por el calor de pasteurización y determinados productos como el óxido de etileno, formaldehído, etanol (70%), glutaraldehído (2%), ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado (Pfyffer et al., 2003).

En general, las necesidades nutritivas de las micobacterias son sencillas, requiriendo una fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (amonio o aminoácidos) así como determinadas sales minerales. Tan sólo algunas especies (*Mycobacterium genavense* o *Mycobacterium haemophilum*) precisan de suplementos especiales como son micobactina, hemina u otros componentes férricos. Por otro lado, el crecimiento de las micobacterias se ve estimulado por la presencia de CO₂ y ácidos grasos. Un caso aparte es *M. leprae* que sólo es capaz de crecer en cultivos celulares. Aunque la temperatura óptima de crecimiento general suele ser de 35-37°C, existen determinadas especies que precisan temperaturas de 30°C (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *M. haemophilum*), a 42°C tenemos un óptimo crecimiento de *Mycobacterium xenopi* y a 52°C obtenemos una mejor tasa de crecimiento de *Mycobacterium thermoresistibile* (Pfyffer et al., 2003).

Las bacterias se clasifican en el género *Mycobacterium* en función de: 1.) su capacidad de ácidosresistencia; 2.) presencia de ácidos micólicos de 60-90 átomos de carbono que se escinden por pirólisis en ésteres metilos de ácidos grasos de C₂₂ y C₂₆ y 3.) tienen una alta proporción de guanina y citosina (61% - 71%) en su ADN, a excepción de *M. leprae* que contiene (54% - 57%) lo cual incrementa su estabilidad y puede contribuir a su supervivencia, sin embargo, el contenido de ácidos micólicos es similar al de otras bacterias como: *Nocardia* (60-69 %), *Rhodococcus* (59-69 %) y *Corynebacterium* (51-59 %) (Leão et al., 2004).

Mycobacterium es reconocido por sus formas típicas o clásicas, responsables de la tuberculosis y la lepra, gérmenes patógenos humanos obligados, que han sido ligadas a la historia del hombre; así como por sus formas atípicas, que son aquellas

micobacterias que no pertenecen al grupo de *M. tuberculosis* ni *M. leprae*, gérmenes patógenos facultativos y gérmenes no patógenos (Navarrete, 2005).

1.4.2. Mycobacterium tuberculosis complex

1.4.2.1. Características:

Engloba a un grupo de micobacterias que presentan el 95% de homología en su ADN y que se designan como “Complejo *M. tuberculosis*” (MTC). *Mycobacterium tuberculosis complex* contiene 8 especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* tipo I y II (principal causante de la Tb en África tropical), *M. microti* (causante de la Tb en roedores, llamas y otros mamíferos). Además, también se incluye *M. bovis* BCG. Recientemente se propuso incluir subespecies como: *M. canneti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*, el bacilo de mar (Leão et al., 2004).

Mycobacterium tuberculosis es el agente patógeno intracelular causante de la tuberculosis. Este patógeno fue descrito por primera vez en el año 1882 por Robert Koch y actualmente sigue siendo objeto de estudio por ser un bacilo emergente a nivel mundial que infecta a humanos y primates y es capaz de producir infección de por vida. El apelativo tuberculosis se debe a la descripción que en 1680 hizo Silvius en relación a los tubérculos que existían en dicha enfermedad. Las colonias de *M. tuberculosis* en medios sólidos, tienen un aspecto rugosa, semejantes a las cabezas de la coliflor. Los bacilos presentan dimensiones de 2-4 x 0.3-0.5 μm , los mismos que se pueden apreciarse microscópicamente, formando cordones. Su crecimiento está restringido a temperaturas entre 34°C y 38°C. Esta especie es aerobia, nitrato positiva y susceptible a pirazinamida y cicloserina. Es usualmente resistente al ácido 2-tiofenil- carboxílico hidratado (TCH) y sensible al ácido ρ -nitrobenzoico. Según pruebas bioquímicas es positivo a la niacina y catalasa (Murray et al., 2003).

1.4.2.2. Epidemiología

Mycobacterium tuberculosis es el microorganismo que por sí solo ha ocasionado el mayor número de muertes a escala mundial. La OMS en 1991 planteó para el año 2000 por medio de la introducción de un programa efectivo de control, la detección del 70% del total de casos de Tuberculosis la posibilidad del tratamiento satisfactorio del 85% de ellos. A partir de esta iniciativa, en 1995 se comenzó a

implementar el programa DOTS que consiste básicamente en un control y seguimiento directo del tratamiento de la tuberculosis por parte del personal médico sanitario local, en un total de 212 países alrededor del mundo (OMS, 2000). La epidemia global de la tuberculosis continúa creciendo a pesar de las actuales medidas de control. Los últimos datos provistos por la OMS, en el 2006, calcularon que 1,6 millones de personas murieron por tuberculosis en 2005. La tuberculosis infecta aproximadamente a la tercera parte de la población mundial manteniendo una prevalencia de 245/100.000 habitantes (OMS, 2006).

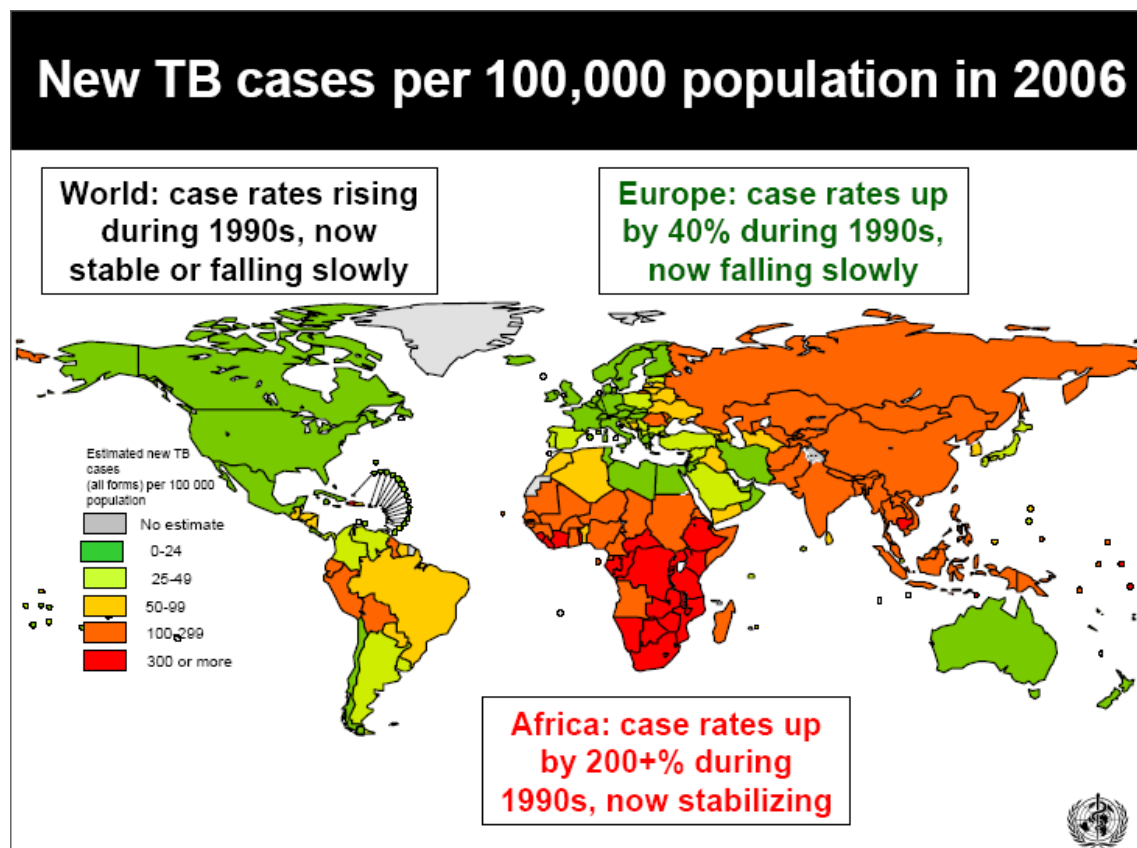


Figura 1.4. Estimada incidencia mundial de TB en el 2006.

Fuente. World Health Organization 2006.

De esta forma, las previsiones son desoladoras, ya que se estima que entre el 2002 y 2020, cerca de 150 millones de personas enfermarán y 36 millones fallecerán por esta enfermedad. No obstante, hay que considerar que existe una gran variabilidad geográfica; el mayor número de casos ocurren en el Sudeste Asiático y África, seguidos por América Latina y el Este de Europa. Este hecho está directamente relacionado con

las condiciones socioeconómicas y el impacto de la epidemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en dichas zonas. A ello se une la aparición, en los últimos años, de cepas resistentes y multirresistentes a los agentes antimicrobianos (SEIMC, 2005, p.2).

1.4.2.3. Patogenia e Inmunidad:

Según su patogenia e inmunidad, las bacterias pueden permanecer latentes en los macrófagos o se pueden reactivar unos años más tarde especialmente cuando disminuye la respuesta inmunitaria del paciente como consecuencia de la edad o por una enfermedad o un tratamiento inmunosupresor. En su patogénesis intervienen factores tanto del medio ambiente, como sociales y genéticos (Murray et al., 2003).

Aunque *M. tuberculosis* puede afectar a cualquier órgano, hay lugares donde la permanencia de *M. tuberculosis* es mucho mayor, dependiendo de las condiciones locales como: vascularización y la presión de oxígeno elevada, este es el caso de los pulmones. Alrededor del 5% de los pacientes expuestos a *M. tuberculosis* evoluciona hasta desarrollar una enfermedad activa a lo largo de los 2 años siguientes y entre un 5% y un 10% desarrolla la enfermedad en una fase posterior (Murray et al., 2003). Las personas pueden tener síntomas comunes a otras enfermedades como son la fiebre, el cansancio, la falta de apetito, pérdida de peso, sudor nocturno y disnea en casos avanzados; síntomas agudos como aflicciones de tos y expectoración por más de quince días. Cabe destacar que la enfermedad se transmite por contacto estrecho de una persona a otra mediante la inhalación de aerosoles infecciosos (Koneman et al., 1997).

1.4.3. Micobacterias Atípicas.

1.4.3.1. Historia de las Micobacteria Atípicas

Se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años, pero no fue hasta 1896 donde se conoció netamente la taxonomía de las micobacterias empezando con la descripción del género *Mycobacterium* por Lehmann y Neumann. Posteriormente, el campo de la micobacteriología dio lugar a la creación del Internacional Working Group on Micobacterial Taxonomy (IWGMT) en 1967 por L.G Wayne, quien basaba sus estudios en pruebas fenotípicas, las misma que se establecieron como estudio base durante décadas (Leão, 2004).

Las micobacterias atípicas han tenido diferentes denominaciones a través de los tiempos. Así, en 1899 Moeller las llamó bacilos pseudotuberculosis, Borrel y Marmoreck en 1901 las llamó Bacilos patuberculosos, posteriormente Pinner y Timpe en 1932, y Runyon en 1954 acuñan el término “micobacterias *atípicas*” para identificarlas y diferenciarlas de *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Haudoroy en 1955 las denominó micobacterias anormales y en 1959 se las denominó micobacterias anónimas; Corpe Runyon y Lester en 1963 las denominó micobacterias inclasificadas. En el mismo año Matheus las llama MOTT (Micobacteria Other Than Tubercle Bacilli). En 1969 Marks y Selkon las englobó bajo el término de micobacterias oportunistas. Wolinsky en 1979 las llama Micobacterias No Tuberculosas, y finalmente Wayne y Sramek en 1992 las denominaron PPEM (Potentially Pathogenic Environmental Mycobacteria) (Casal Manuel y Casal María, 2000).

Cronológicamente, se dieron a conocer diversas denominaciones particulares de las especies, atendiendo su morfología o lugar de procedencia. Así, Friedmann aisla *M. chelonei* de la tortuga en 1903, que luego sería denominada *M. chelonae*. En 1905 Küster describe *M. ranae* como patógena del sapo, hoy reconocida como *M. fortuitum*. En 1953 Moore y Frerichs denominan *M. abscessus* al germen que obtienen de un absceso de rodilla, constituyendo estas tres el grupo IV de la clasificación de Runyon (Ramos y Silva, 2003).

En los años 1950 y 1960 se presentaron numerosos informes de micobacterias que diferían en sus características a la especie patrón que se consideraba a *M. tuberculosis*, dichas micobacterias habían sido cultivadas a partir de materiales patológicos, mediante circunstancias que llevaron a algunos a creer que estos organismos podrían ser clínicamente significativos (Covert et al., 1999). En 1959 se realiza la clasificación, en base a la rapidez de crecimiento de sus colonias y a su capacidad para producir pigmento, esta clasificación ha sido varias veces modificada y actualizada por la aparición de nuevas especies (Katoch, 2004.). A finales de la década de los 80, las micobacterias atípicas dieron lugar a un nuevo capítulo de la patología infecciosa, considerándose patógenos emergentes, enfocando su importancia en la manifestación del SIDA (Koneman et al., 1997).

Uno de los mayores problemas en cuanto a diferenciación de especie surgió porque anteriormente el Complejo *Mycobacterium fortuitum* agrupaba a *Mycobacterium*

fortuitum, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus*, sin embargo, en la actualidad, conocemos que cada especie tiene independencia propia y son consideradas especies diferentes tanto en su fenotipo como genotipo (Konig et al., 2005).

Antes de 1992, *Mycobacterium chelonae* constaba de dos subespecies, *Mycobacterium chelonae subsp. chelonae* y *Mycobacterium chelonae subsp. abscessus*, y ahora tienen sus propia denominación de especie. Estas distinciones realizadas gracias a investigaciones actuales (empleando técnicas moleculares), permiten facilitar el diagnóstico clínico para mejorar el tratamiento con antimicrobianos, evitando así, los problemas de resistencia a los antibióticos (Konig et al., 2005). Basándose en esta polémica y confusión terminológica, la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) creó un grupo de trabajo para consensuar una definición común y adecuada para todas ellas. En 1998 se publicaron recomendaciones para referirse a este grupo bacteriano en las que se acordó que el término que mejor se adecuaba era el de «micobacterias ambientales». Así, las especies *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, dado que no se aislan del ambiente, quedarían fuera de esta clasificación. En la actualidad, aún no hay un consenso en la denominación de micobacterias atípicas, por tal razón, la mayoría de investigadores concluye que, como no existe una forma incuestionable a la hora de denominar de forma conjunta a las micobacterias diferentes al bacilo de la tuberculosis, la denominación depende de cada autor o sociedad científica, sin embargo se recomienda de preferencia adoptar un nombre binomial como el resto de la bacteriología, designando género y especie; es así como se publican actualmente nuevas especies, publicaciones que radican en nuevas investigaciones de implementación de técnicas moleculares, para la identificación de micobacterias. (García, 2005).

En 1993, Telenti, propuso una herramienta molecular denominada PRA, basada en el análisis de patrones de restricción de productos de PCR, obtenidos por la amplificación del gen *hsp65*; para la diferenciación rápida de las micobacterias a nivel de especie. Para 1996 Wayne, realizó análisis genotípicos a partir de la hibridación de ADN, análisis de secuencias comparativas de 16S rRNA, ADN y proteínas; métodos que hasta nuestros días, juegan un rol muy importante para la identificación de cepas micobacterianas, especialmente para micobacterias atípicas (Chimara et al., 2008).

Las enfermedades producidas por micobacterias no tuberculosas (MNT), han tenido un importante incremento en los últimos años, debido a su asociación con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), con terapias inmunosupresoras especialmente en pacientes trasplantados (Palomino, 2002), y al uso de fármacos inmunosupresores, además, algunos estudios coinciden en que la prevalencia de MNT aumenta, mientras que es notable una disminución de la prevalencia de la tuberculosis (Bartralot, 2005).

1.4.3.2. Características

Es un grupo heterogéneo, muy numeroso y difícil de sistematizar. Ha recibido a lo largo de la historia varias denominaciones como: “*Mycobacterium Other Than Tuberculosis*” (MOTT), micobacterias ambientales, micobacterias anónimas o micobacterias oportunistas; Micobacterias no tuberculosas (MNT); pero su denominación más frecuente en lengua castellana es Micobacterias Atípicas (Casal, 2000). Estas micobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se les puede aislar del agua de los ríos, lagos, pantanos, piscinas, acuarios, grifos y desagües e incluso máquinas de hielo. También se presentan en el suelo, en la vegetación, así como en algunos vertebrados de sangre fría como los batracios, serpientes y peces; mamíferos (ganado bovino y porcino, monos) y aún en aves. Además, pueden habitar en superficies corporales y secreciones sin causar enfermedad, por lo que hasta la segunda mitad del siglo pasado su hallazgo se consideraba contaminación o colonización. Recientemente, se ha establecido que estos organismos también se encuentran en el agua de uso doméstico (García, 2005).

Hay factores que contribuyen al incremento de la flora micobacteriana en diferentes sustratos uno de ellos puede ser atribuido a mayores niveles de materia orgánica, heces, suelo y aguas superficiales (Covert et al., 1999).

Las micobacterias atípicas son consideradas microorganismos oportunistas que provocan infecciones a través de fuentes ambientales, como las mencionadas a priori. Los mecanismos de transmisión suelen ser a través de tracto respiratorio y digestivo o mediante inoculación directa en el caso de la piel, también se puede producir diseminación hematológica a partir de un foco visceral; mientras que aún no se ha demostrado el contagio o transmisión de persona a persona. Se ha dicho que estas

bacterias intervienen en infecciones de heridas, infecciones de la piel, huesos (osteomielitis), oído medio (otitis media), infecciones de catéteres en la vena central y enfermedad pulmonar. Las infecciones diseminadas casi siempre surgen en casos de deficiencia inmunitaria de tipo celular, en defectos inmunitarios congénitos o por la infección del VIH (Bartralot, 2005).

Otras micobacterias atípicas que por lo general no son patógenas. Caminero en el 2001, afirma que algunas especies son muy ubicuas y poco patógenas; otras son menos ubicuas y su aislamiento tiene un alto valor predictivo de enfermedad; otras no tienen significado clínico conocido y cada vez es más frecuente la descripción de nuevas especies no conocidas previamente. Por este motivo es importante la rápida detección de pseudo infecciones y enfermedades, a partir de técnicas moleculares.

1.4.3.3. Epidemiología y manifestaciones clínicas.

Las enfermedades producidas por micobacterias atípicas, no son de declaración obligatoria, por ende se intuye que las cifras de incidencia o prevalencia son puramente orientativas. No obstante, la incidencia de las infecciones por micobacterias atípicas ha ido tomando un mayor protagonismo en los últimos 20 años, debido a la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y al uso de fármacos inmunosupresores. Estudios coinciden que la prevalencia de MNT aumenta a nivel global, atribuyéndole 1,78 casos/100.000 habitantes; mientras que es notable una disminución de la prevalencia de tuberculosis (Bartralot, 2005). En estudios de cohorte se ha evaluado que las infecciones por micobacterias atípicas representan un 15% del total de los aislamientos de BAAR (Bacilos Alcohol Ácidos Resistentes), mientras que el 85% restante corresponde a *Mycobacterium tuberculosis* (Gruft, 1981).

En España donde la incidencia y prevalencia de tuberculosis es más elevada que en otros países desarrollados, la incidencia de infecciones por micobacterias no tuberculosas representa un 0.64 – 2.29% de todas las infecciones por micobacterias. Mientras que en el Ecuador, aún no tenemos estudios cuantitativos valorados en la incidencia de MNT. Entre las micobacterias de crecimiento rápido que se aíslan con más frecuencia están *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum* 30. Según el Centro de Referencia de Micobacterias de la Universidad de Córdoba, entre 1993 y 1998 se aislaron en España 453 casos de micobacterias atípicas, lo que representa el

19,4 % respecto a todos los aislamientos de micobacterias. De entre ellas, las especies más frecuentemente aisladas, por orden de frecuencia, fueron *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium simiae* (Valdés, 2004).

Las características clínicas de las infecciones, pueden ser similares a las causadas por *Mycobacterium tuberculosis* aunque, con frecuencia adoptan patrones clínicos diferentes y suelen ser resistentes a los fármacos tuberculostáticos convencionales (Bartralot, 2005). Las manifestaciones de las infecciones diseminadas por MNT, dependen de la especie y de la vía de propagación de la infección pero incluyen: fiebre, sudación nocturna, pérdida de peso, dolor abdominal, fatiga, diarrea y anemia. En el 10 - 20% de los adolescentes y adultos jóvenes con fibrosis quística se identifican micobacterias atípicas en particular el complejo *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium abscessus* (American Thoracic Society, 2002). Los puntos usuales de penetración de MNT, son abrasiones cutáneas (como las lesiones de la piel causadas por *Mycobacterium marinum*); incisiones quirúrgicas, mucosa bucofaríngea, vías gastrointestinales o respiratorias en el caso del MAC (*Mycobacterium avium complex*), neuropatías y casos raros de adenitis mediastínica y enfermedad endobronquial, ganglios linfáticos regionales, entre otros (American Thoracic Society, 2002).

La gran variabilidad en la distribución geográfica de las micobacterias atípicas y de sus cepas más patógenas suele también contribuir a la escasa especificidad clínica y a la aparición de pequeños brotes epidémicos en áreas geográficas concretas. (Caminero, 2001).

1.4.3.4. Aislamiento de Micobacterias No Tuberculosas (MNT).

La mayor parte de las micobacterias atípicas, aisladas en adultos provienen de esputos, lavados bronquiales, siendo la piel uno de los constantes focos de infección. En niños, el principal agente aislado en los ganglios linfáticos fue el complejo *Mycobacterium avium* en contra de la creencia que atribuía a *Mycobacterium scrofulaceum* la principal causa de linfadenitis (Valdés, 2004).

De forma global hay un mayor aislamiento y por ende una mayor afectación en varones (59 %), si bien existe una prevalencia en mujeres en aislamientos de *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium simiae*. La

mayor incidencia se da en torno a la sexta década de la vida. Dentro de los grupos étnicos más afectados está los hispanos, blancos y negros. Entre los de menor incidencia, los asiáticos y los americanos nativos. El 73 % de los casos se dieron en zonas urbanas y el resto en el entorno rural (Valdés, 2004).

La relevancia del aislamiento en cultivo de una micobacteria atípica a partir de una muestra biológica en humanos, sea en saliva, piel o heces, debe evaluarse en base a las características clínicas, histológicas y microbiológicas de cada caso particular. Algunas especies son habitualmente patógenas, mientras que otras con frecuencia pueden ser contaminantes de la muestra (Pfyfer, 2003). El aislamiento repetido de innumerables colonias de una sola especie, muy a menudo denota enfermedad y no contaminación del cultivo ni colonización transitoria. La identificación de MNT de sitios estériles como líquido cefalorraquídeo o pleural, médula ósea, sangre, líquido aspirado de ganglios linfáticos, oído, tejido extirpado quirúrgicamente; constituye el método diagnóstico más fiable. En los países en vías de desarrollo, se pueden aislar micobacterias del material obtenido de sitios no estériles como: las muestras de lavado estomacal, una sola muestra de esputo sin bacilos acidorresistentes en el frotis, o una sola muestra de orina. Si este es el caso para la interpretación de resultados se deberá tener mucho cuidado y se deberán realizar también estudios para determinar contaminación o no de la muestra (American Thoracic Society, 2002).

Las condiciones de aislamiento e identificación de algunas especies atípicas son diferentes a las requeridas por *Mycobacterium tuberculosis*, sobre todo, en lo que respecta a la temperatura de incubación y al enriquecimiento de los medios de cultivo con determinados nutrientes, sin embargo, gracias al perfeccionamiento de las técnicas de cultivo y al desarrollo de las técnicas moleculares; periódicamente se describen nuevas especies y en la actualidad se identifican con mayor frecuencia las cepas atípicas (Bartralot, 2006).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es de nuestro conocimiento que las MNT se encuentran en el ambiente, principalmente en recursos hídricos, por tal razón la American Society for Microbiology, en 1997, realizó un estudio donde se probó científicamente que las micobacterias atípicas pueden sobrevivir, persistir, crecer y colonizar en sistemas de abastecimiento de agua potable, por su característica de resistencia a la desinfección. Este estudio se realizó en varios estados de USA (Boston,

Los Angeles, y el noreste Estados Unidos); los resultados establecieron que *Mycobacterium mucogenicum* fue el organismo aislado con mayor frecuencia (40 de 113 aislamientos en equivalencia al 35%), en muestras de agua potable de sistemas de distribución que utilizan las aguas superficiales como la fuente de agua. *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae* representa el 75% de los aislamientos de agua potable. Destacando un 19% de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*. Finalmente *Mycobacterium fortuitum* fue el aislamiento obtenido con mayor frecuencia del hielo de muestras de paciente procedentes de hospitales. Gracias a este estudio se afirma la hipótesis que los seres humanos se infectan mayoritariamente de fuentes ambientales y no por transmisión de persona a persona (Covert et al., 1999).

Cabe destacar, que la mayoría de aislamientos de MNT a nivel mundial, se han realizado de pacientes infectados con SIDA, en los cuales se ha aislado de preferencia *Mycobacterium avium*; constituyéndose en la micobacteria que ocupa el segundo lugar de causa de muerte para dichos pacientes (Covert et al., 1992). Hoy en día, el 10-30 % de las micobacterias aisladas en laboratorios clínicos corresponden al grupo de las micobacterias no pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Araya et al, 2006).

1.4.3.5. Factores de Riesgo

El factor de riesgo más importante asociado con enfermedad por micobacterias atípicas es el tabaco (66 %), seguido de la enfermedad pulmonar crónica (42 %), la infección por VIH (26 %) y el alcoholismo (20 %). Los casos que cursan con linfadenitis no tienen factores de riesgo. El enfisema y la bronquitis crónica son las patologías sistémicas asociadas con más frecuencia (O' Brien, 2000).

El VIH, los medicamentos inmunosupresores y la reducción en la inmunidad cruzada entre las micobacterias al existir un menor número de casos de contacto con el *Mycobacterium tuberculosis*, han propiciado un mayor espectro de personas susceptibles a las micobacterias atípicas. Una disminución del recuento de linfocitos CD4 por debajo de 40 cel./ml, aumenta el riesgo en 2,5 veces de infección diseminada por micobacterias atípicas en el caso de pacientes portadores del VIH32. Otros factores

que contribuyen a que exista un mayor número de casos son los cambios en los hábitos de vida, al exponernos a aerosoles con micobacterias, el envejecimiento de la población, el hacinamiento en diferentes comunidades (como ocurre en el Ecuador) y el desconocimiento del personal médico con respecto a la enfermedad y al tratamiento de la misma (Arasteh et al., 2000).

1.4.3.6. Clasificación de las micobacterias atípicas.

Las primeras descripciones se hicieron poco después del descubrimiento por Koch del *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, no fue hasta 1954 que Teimpe y Runyon pusieron de manifiesto que micobacterias diferentes a las tuberculosas podían infectar a animales y en algunos casos infectar y producir diversos tipos de enfermedades en humanos (Katoch, 2004). Inicialmente, la nomenclatura de estas especies se realizó según la velocidad de crecimiento, la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos, otras se realizaron atendiendo a su poder patogenicidad para las distintas especies animales como *Mycobacterium simiae* o *Mycobacterium avium*. Posteriormente se fueron aislando otras micobacterias a partir de muestras ambientales (aguas de lagos o ríos, cañerías de los hospitales, suelo, polvo, etc.) (Katoch, 2004).

Es así, como tomamos en consideración diferentes criterios y según los diferentes autores se enuncian las siguientes clasificaciones de relevante importancia.

1.4.3.6.1. Clasificación de Runyon

De todos es conocida la clasificación de Runyon en 1954, modificada en 1974, basada en las características de crecimiento de las micobacterias atípicas (Cuadro 1.1). Esta clasificación, fue la primera que se evaluó en micobacterias atípicas. En ella se establece una división natural entre las micobacterias de crecimiento lento (más de 7 días) y rápido (menos de 7 días), tomando en consideración también su capacidad de pigmentación: *fotocromógenas*, si producen colonias no pigmentadas en la oscuridad pero pigmentadas si se exponen a la luz; *escotocromógenas*, si producen colonias amarillas o naranjas con y sin luz, incluso algunas incrementan los pigmentos tras la exposición, y *no cromógenas*, si son siempre no pigmentadas debido a que no sintetizan pigmentos (Runyon, 1959).

Cuadro 1.1. Clasificación de micobacteria atípicas por Runyon

GRUPO	CARACTERÍSTICAS	ESPECIES DE <i>Mycobacterium</i>
I	Fotocromógenos Pigmento amarillo-claro Colonias rugosas Crecimiento lento (14-21 días)	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>
II	Escotocromógenas Pigmento naranja – rojizo Colonias lisas Crecimiento lento (10-14 días)	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>
III	No pigmentadas Crecimiento lento (14-21 días)	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. xenopi</i>
IV	Pigmentación variable Crecimiento rápido (5 -7 días)	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. ulcerans</i>

Fuente: Ruyon, 1954

Pero en nuestros días, atendiendo a los mismos criterios de Runyon se ha realizado modificaciones y se han incrementado nuevas especies que según la epidemiología actual son notables en aislamiento en laboratorios clínicos a nivel mundial, por tal razón se han incrementado 2 grupos en la pionera clasificación de Ruyon (Cuadro 1.2).

Se destaca además para ayuda técnica en los laboratorios clínicos, la misma clasificación modificada de Ruyon pero subdividida en grupos de crecimiento rápido y lento (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.2. Clasificación modificada de Runyon, según el interés clínico de micobacterias más frecuentemente aisladas en muestras clínicas.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS
I	Fotocromógenos Pigmento amarillo-claro Colonias rugosas Crecimiento lento (14-21 días)

GRUPO	CARACTERÍSTICAS	GRUPO	CARACTERÍSTICAS
II	Escotocromógenas Pigmento naranja – rojizo Colonias lisas Crecimiento lento (10-14 días)	III	No pigmentadas Crecimiento lento (14-21 días)
IV	Pigmentación variable Crecimiento rápido (5 -7 días)	V	Escotocromógenas Crecimiento rápido Pigmento amarillo naranja

GRUPO	CARACTERÍSTICAS
VI	No cromógenas crecimiento Rápido

Fuente: Casal, 2000

Cuadro 1.3. Clasificación modificada de Runyon, de micobacterias más frecuentemente aisladas en muestras clínicas. Grupo de lento crecimiento

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS DE INTERÉS CLÍNICO

Grupo de Crecimiento lento

GRUPO I. Fotocromógenas

- *M. kansasii*
- *M. asiaticum*
- *M. intermedium*
- *M. buckleyi*

Grupo II. Escotocromógenas

a.) Pigmento rosa - rojo

- *M. lycopinogenes*
- *M. lactis*
- *M. hiberniae*

GRUPO III. No cromógenas

- *M. tuberculosis*
- *M. bovis (M. bovis vac. BCG)*
- *M. africanum*
- *M. avium (M. suis, M. brunense)*
- *M. intracellulare*
- *M. gastri*
- *M. terrae*
- *M. triviale*
- *M. nonchromogenicum*
- *M. malmoense*
- *M. haemophilum*
- *M. shimoidei*
- *M. genavense*
- *M. conspicuum*
- *M. celatum*
- *M. triples*
- *M. braderii*
- *M. paratuberculosis*
- *M. heidelbergense*

Grupo II. Escotocromógenas

b.) Pigmento amarillo- naranja

- *M. gordonae*
- *M. scrofulaceum*
- *M. szulgai*
- *M. interjectum*
- *M. bohemicum*
- *M. lentiflavum*
- *M. tusciae*

c.) Pigmento irregular

- *M. xenopi*
- *M. simiae*
- *M. ulcerans*

Cuadro 1.4. Clasificación modificada de Runyon, de micobacterias más frecuentemente aisladas en muestras clínicas. Grupo de rápido crecimiento

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS DE INTERÉS CLÍNICO

Grupo de Crecimiento rápido

GRUPO IV. Fotocromógenas

- *M. marinum*
- *M. novocastrense*
- *M. piscium*

GRUPO V. Escotocromógenas

a.) Pigmento rosa rojo

- *M. engbaeck*
- *M. thamnophео*
- *M. rhodochrou*

b.) Pigmento amarillo-naranja

- *M. acapulcelnse*
- *M. aurum*
- *M. duvalii*
- *M. gadicum*
- *M. neoaurum*
- *M. gilvum*
- *M. obuense*
- *M. rhodesiae*
- *M. aichiense*
- *M. chubuense*
- *M. tokaiense*
- *M. hassiacum*

c.) Pigmento irregular

- *M. phlei*
- *M. vaccae*
- *M. thermoresistible*
- *M. parafortuitum*
- *M. diernhoferi*
- *M. smegmatis*
- *M. friburgensis, M. graminis*
- *M. rabinobich, M. lactiola*
- *M. goodii*
- *M. wolynski*
- *M. austroafricanum*
- *M. confluentis*

1.4.3.6.2. Micobacterias asociadas con enfermedades en humanos y animales.

Las micobacterias pueden dividirse en 3 grupos según el criterio básico clínico (Leão et al., 2004).

El primer grupo incluye los patógenos estrictos en humanos y animales por ejemplo *Mycobacterium avium* spp. *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium lepraemurium*, inclusive en este grupo se encuentra *Mycobacterium tuberculosis* complex. Estos patógenos estrictos generalmente no se encuentran en el ambiente.

El segundo grupo, consiste de micobacterias potencialmente patógenas en humanos y animales. La mayoría de estos patógenos se encuentran en cualquier lugar de la naturaleza. Se los conoce también como micobacterias oportunistas o patógenos ocasionales, término empleado para distinguirlos de los patógenos estrictos. Aunque algunos de ellos presentan excepciones como *Mycobacterium haemophilum* que nunca ha sido aislado del ambiente (Leão et al., 2004).

El tercer grupo consiste en especies saprofitas no patógenas.

1.4.3.6.3. Micobacterias basadas en el riesgo causante de la infección, desde el punto de vista clínico:

Esta clasificación de microorganismos se basa en determinar que tipo de riesgo causa la infección producida por las diferentes especies micobacterianas, en los humanos (Leão et al., 2004).

1.4.3.6.3.1. Grupo de Riesgo I:

Presentan bajo riesgo de infección para individuos como para la comunidad. Las enfermedades causadas por estos microorganismos nunca o raramente se han descrito como causantes de patología en adultos normales. Las especies están generalmente clasificadas como patógenos raros.

1.4.3.6.3.2 Grupo de Riesgo II:

Causan un riesgo moderado individual y de variable gravedad para la enfermedad, se presentan en comunidades con servicios básicos deteriorados. Las

especies implicadas están generalmente clasificadas como patógenos potenciales u oportunistas.

1.4.3.6.3.3 Grupo de Riesgo III:

El riesgo de transmisión se da por aire, tanto la enfermedad como la infección es severa y en algunos casos su fin es fatal. Existe un alto riesgo de contagio por el individuo portador, pero es moderado para la comunidad. Las especies clasificadas son generalmente clasificadas como patógenos estrictos.

1.4.3.6.3.4 Grupo de Riesgo IV:

Presenta un riesgo muy alto para el individuo que presenta la infección y frecuentemente es fatal. Causan un alto riesgo a la comunidad. Las especies de micobacterias no están incluidas en este grupo de riesgo, un ejemplo de esta clasificación es el Virus del Ébola.

1.4.3.7. Significado Clínico de micobacterias en muestras patológicas.

Los patógenos estrictos identificados en especímenes son casi siempre responsables de enfermedades. Estas especies patógenas o saprofitas, no manifiestan en primera instancia la enfermedad, punto de vista que atiende a un caso clínico asociado a consideración. Es relevante, la importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de diversas infecciones humanas con una importante morbilidad y mortalidad. La presencia de microorganismos atípicos en muestras clínicas puede tener 3 significados: (Leão et al., 2004).

1. *Mycobacterium* es el agente etiológico de micobacteriosis⁴. El diagnóstico microbiológico debe estar sustentado en signos clínicos y repetidos aislamientos de *Mycobacterium* del mismo paciente o por un aislamiento simple en el caso de haber tomado muestras asépticas de una lesión cerrada. Al proyectar los resultados existen repeticiones directas positivas que evidencian evidentemente la infección micobacteriana.

⁴ Micobacteriosis: En 1959, Penson propuso el término de «micobacteriosis», a una serie de procesos de las enfermedades infecciosas humanas ocasionados por micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* y a *M. leprae*.

2. Cuando *Mycobacterium* ha colonizado la muestra, pero no tiene ninguna significancia clínica. Esto frecuentemente resulta de equipos contaminados con micobacterias por ejemplo las endoscopias por recogimiento de líquido. Este fenómeno es común y se lo ha denominado: Seudo infección. La colonización de la muestra clínica puede también ser resultado del contacto del paciente con el medio circundante de la micobacteria, por ejemplo el agua contaminada.

Esta colonización puede estar vinculada a una infección aunque esta, no es siempre necesariamente una causa. Por definición, colonización significa que no hay reacción del huésped, mientras la infección significa que el huésped reacciona ante el contacto con la micobacteria. Esta reacción se determina mediante una prueba de reacción cutánea o anticuerpo, pero sin ninguna manifestación evidente de enfermedad. La infección como la colonización pueden ser pasajeras, intermitentes o prolongadas.

3. *Mycobacterium* originado por contaminación en el laboratorio. Por ejemplo en la descontaminación de soluciones o contaminación por otra muestra positiva. Los laboratoristas clínicos, bioanalistas e infectólogos deben estar vigilantes de los hechos o situaciones de los puntos 2 y 3 que ocurren frecuentemente. Esto es muy importante para hacer la distinción entre colonización, infección y enfermedad, y para referirse estrictamente al criterio de determinar el significado clínico del *Mycobacterium* aislado de una muestra patológica.

Actualmente, se tiende a rechazar el concepto de “colonización”, aunque existen múltiples casos clínicos que resultarían de difícil explicación sin este término. La gran mayoría de las micobacterias atípicas son resistentes “in vitro” a los fármacos antituberculosos, que solo son de ayuda en casos concretos y que en la mayoría de los casos deberán incluir macrólidos y quinolonas. El tratamiento va a depender, por lo tanto, de la sensibilidad a los diferentes fármacos que muestre cada una de las micobacterias atípicas, pero se debe notar que serán tratados por más de 3 antibióticos. (Caminero 2001).

1.4.3.8. Tratamiento

La elección del tratamiento varía en función de tres factores fundamentales: la forma de presentación clínica, la especie de micobacteria responsable y el estado inmunitario del enfermo (Caminero 2001).

La resistencia in vitro a la mayoría de los fármacos antituberculosos de primera línea es una de las características predominantes de las micobacterias atípicas, por esta razón se justifica la necesidad de incorporar tratamientos agresivos de hasta cinco y seis fármacos durante largos períodos de tiempo, llegando aún a la exéresis quirúrgica en casos de afección pulmonar localizada o infecciones avanzadas de mal manejo de mesoterapia; casos frecuentemente reportados (Caminero 2001).

El avance más importante en la adopción del tratamiento, tuvo inicio en el año 2000, con la introducción de los nuevos macrólidos como: la claritromicina de eficacia clínica y microbiológica, que es administrada en monoterapia o asociada a otros fármacos. Y la rifabutina, que es más activa “in vitro” que la rifampicina, constituyéndose en una pieza básica para este tratamiento (Casal, 2000).

Pero a pesar de la eficiencia de estas drogas, se debe realizar una valoración cautelosa antes de tomar la decisión de iniciar el tratamiento, especialmente en pacientes inmunocompetentes generalmente afectados de micobacteriosis, en los cuales se considera varios factores como: heterogeneidad de las formas clínicas, estabilidad de la enfermedad, edad del paciente, efectos secundarios, tolerancia y la larga duración del tratamiento antibiótico. El tratamiento clásico se basa en la asociación de al menos tres fármacos: claritromicina o azitromicina, rifabutina o rifampicina y etambutol. El tiempo óptimo de tratamiento no está establecido, pero en general, se acepta hasta 12 meses después de que el paciente se haya realizado una prueba de cultivo, y ésta sea negativa. Se suele observar una mejoría clínica a los 3-6 meses de iniciado el tratamiento, caso contrario, se debe sospechar una resistencia o mala tolerancia (Bartralot, 2000).

Una de las infecciones sistémicas más comunes, que se constituye la primera causa de enfermedad pulmonar y la más frecuente en la fase terminal de la enfermedad en pacientes VIH es la infección por *Mycobacterium avium complex*, cuyo tratamiento consiste en la asociación de tres fármacos como mínimo: 1) claritromicina (500 mg/2

veces día) o azitromicina (250mg/día ó 500 mg 3 veces/semana), 2) rifabutina (300 mg/día) o rifampicina (600 mg/día); y 3) Etambutol (25 mg/kg día, dos meses, seguido de 15 mg/kg por día). Para pacientes de baja masa corporal o bien de edad avanzada (>70 años) es mejor tolerado la claritromicina, a dosis de 250 mg/12 horas, o la azitromicina con 250 mg/3 veces semana. Otros fármacos a usar potencialmente serían las quinolonas, rifabutina, clofazimina y amikacina. Las últimas recomendaciones sugieren que la Rifampicina no se puede utilizar con los inhibidores de las proteasas – fármacos base en la terapéutica de los infectados por VIH– y sólo la rifabutina a dosis modificada puede utilizarse (Caminero, 2001).

Mycobacterium kansasii es la segunda causa de enfermedad pulmonar por micobacterias atípicas, siendo esta su manifestación clínica más frecuente. Aunque es un patógeno menos virulento que *Mycobacterium tuberculosis*, es la micobacteria atípica que produce el cuadro clínico y radiológico más parecido a la tuberculosis (Casal, 2000).

Las pruebas de sensibilidad han determinado que la rifampicina, el agente más efectivo contra *Mycobacterium kansasii*. Su tratamiento específico consiste de 9 meses con rifampicina y etambutol para pacientes inmunocompetentes, debiendo prolongarse hasta los 15- 24 meses en los pacientes con defensas comprometidas, con grave desnutrición, bronquiectasias generalizadas, etc. Otro macrólido utilizado es la claritromicina que tiene una actividad excelente “in vitro” contra *Mycobacterium kansasii*, pero se debe considerar en caso de intolerancia a cualquiera de los fármacos previamente expuestos. La mayoría de las infecciones clínicas (>90%) se deben a 3 especies: *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscesus*, y *Mycobacterium chelonae*. Estas especies son resistentes a todos los fármacos antituberculosos, aunque son sensibles a una serie de antibióticos tradicionales (Casal, 2000).

Para infecciones importantes provocadas por *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium abscesus* se recomienda tratamiento intravenoso con amikacina (10-15 mg/kg, dividido en 2 dosis) y cefoxitina durante un mínimo de dos semanas. El imipenem es una alternativa razonable a cefoxitina si los cultivos de *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium chelonae* son resistentes a este fármaco. En infecciones graves se recomienda un mínimo de 4 meses de tratamiento y para las infecciones óseas 6 meses (Casal, 2000).

Por lo tanto, el tratamiento de este grupo de enfermedades varía enormemente dependiendo de la especie o sub especie de micobacteria que produce el cuadro clínico y de su sensibilidad antimicrobiana, existiendo aún muchas lagunas sobre cuando, como y durante cuanto tiempo tratar. Lo que sí es evidente es que debe ser realizado en centros especializados y por personal profesional experto.

1.4.3.9. Micobacterias Atípicas de importancia clínica, aisladas frecuentemente

Existe una gran variabilidad geográfica tanto en especie como en la prevalencia de la enfermedad, difiriendo así, cada manifestación clínica. Esta variabilidad ha condicionado un incremento paralelo en la investigación y conocimiento de las micobacterias atípicas, que con lleva una estandarización en los criterios diagnósticos y en ensayos terapéuticos para cada una de ellas (Caminero, 2001).

Entre las principales micobacterias atípicas emergentes destacamos las siguientes:

1.4.3.9.1. *Mycobacterium abscessus*

Características Generales:

Anteriormente fue denominada *Mycobacterium chelonae subsp. abscessus*. Fue reconocida como nueva especie en 1992 por Kusunoki et al. *Mycobacterium abscessus* es una micobacteria no cromógena de rápido crecimiento, caracterizada por su incapacidad de crecimiento a una temperatura de 42°C. Crece en agar McConkey al 5% de NaCl, no es positiva a la prueba de nitrato reductasa y no es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono. A nivel morfológico *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus* son indistinguibles. Pero identificándolas por PRA, cada especie tiene patrones diferentes (Devallois, 1997).

Epidemiología:

Mycobacterium abscessus se encuentra en el ambiente. La mayoría de las colonias, se las encuentra en fuentes comunes de agua potable, pero también puede ser encontrado en el suelo.

En los seres humanos causa infecciones en la piel y tejidos blandos. *Mycobacterium abscessus* es la segunda micobacteria atípica aislada, más frecuentemente, de pacientes con infecciones respiratorias; después de *Mycobacterium avium* en pacientes con fibrosis quística, y ocupa el segundo lugar en frecuencia después de *Mycobacterium fortuitum*, como micobacteria asociada a infecciones extra pulmonares (Zhibang et al., 2002).

En Venezuela y Colombia se han reportado brotes de *Mycobacterium abscessus*, como consecuencia de la mala manipulación de instrumentos en el post operatorio, aunque en su mayoría se debe a infecciones post liposucción y lipoescultura. Además brotes se han registrado, por productos clandestinos de mesoterapia, creando abscesos purulentos en tejidos blandos (De Waard, 2008).

1.4.3.9.2. *Mycobacterium asiaticum*

Características generales:

Mycobacterium asiaticum fue aislada por primera vez de nodos linfáticos y vísceras sanas de monos importados de la India. Esta investigación se realizó gracias al Instituto de Investigaciones de Hungría (Leão et al., 2004). La descripción de las especies fue publicado en 1971 por Weiszfeiler et al. *Mycobacterium asiaticum* se caracteriza por presentar colonias fotocromógenas de crecimiento lento, específicamente crece de 17 a 21 días. Puede ser diferenciada debido a que presenta positividad en la prueba de hidrólisis de Tween, y es negativa para niacina y reducción de nitratos. *Mycobacterium asiaticum* es la principal causa de bursitis.⁵ Esta especie no está exenta de la identificación a través de PRA, ya que posee su propio patrón (Leão et al., 2004).

Epidemiología:

La primera indicación de que *Mycobacterium asiaticum* es un potencial patógeno para los seres humanos se describió en 1983, identificando a esta micobacteria de cinco pacientes Australianos que presentaban enfermedad pulmonar (García, 2005).

⁵ **Bursitis:** Es la inflamación del saco lleno de líquido (bolsa) que se encuentra entre el tendón y la piel o entre el tendón y el hueso. Esta condición puede ser aguda o crónica

Después fue reportado como patógeno causante de enfermedades pulmonares en pacientes de Los Ángeles California (Dawson, 1995).

1.4.3.9.3. *Mycobacterium avium complex*

Características generales:

M. avium complex (MAC) se compone de dos especies de crecimiento lento *M. avium* y *M. intracellulare* que no son pigmentadas y no son positivas a la hidrólisis Tween 80. Tienen actividad arylsulfatasa y poseen un óptimo crecimiento a 45°C (Thorel, 1990). En cuanto a morfología, las colonias son en su mayoría lisas, llanas y transparentes, pero si se mantienen a temperatura ambiente podemos apreciar una pigmentación amarillenta; otras herramientas que se han utilizado para la identificación son: el análisis de ácidos micólicos y cromatografía líquida (HPLC) de la pared celular. Pero, por lo general se utilizan sondas de ADN, en lugar de las pruebas bioquímicas (Leão et al., 2004).

Existen 3 diferentes subespecies que se han atribuido a *M. avium*: *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. paratuberculosis* y *M. avium subsp. silvaticum*. Estas tres subespecies presentan un fenotipo y genotipo diferentes, incluso difieren en epidemiología (Thorel, 1990), sin embargo, ha sido recientemente designada la especie *M. avium subsp. hominissuis*, aislada de seres humanos y otros mamíferos, esta especie ha sido separada de *M. avium subsp. avium*, aislada de aves (Mijs, 2002).

M. avium y *M. intracellulare* pueden distinguirse utilizando PRA, debido a que poseen patrones diferentes. Smole et al. han publicado recientemente una revisión científica detallando alrededor de 15 diferentes tipos de PRA para el MAC. El autor, identifica 3 tipos de PRA para *M. avium*, provenientes de aislamientos clínicamente significativos y 2 patrones PRA de *M. intracellulare*, igualmente significativos. Smole deduce que los 10 tipos de PRA adicionales del MAC, provienen de otras micobacterias aisladas del ambiente (Mijs, 2002).

Epidemiología:

M. avium ha sido aislado de entornos como agua potable, fuente común de infección para los enfermos de SIDA. Esta especie es un agente etiológico común de

las infecciones en los cerdos y de aves de corral, encontrándose dichas cepas en animales y humanos. Sin embargo, la transmisión del animal al hombre no parece ser importante. La mayoría de las infecciones causadas por MAC en pacientes con SIDA son causadas por *M. avium*. En contraste, *M. intracellulare* se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes que no están infectados por SIDA (Martín, 2002). MAC es la especie predominante de MNT en pacientes VIH positivos y es la micobacteria más frecuentemente aislada en América Latina de dichos pacientes (Leão et al., 2004).

1.4.3.9.4. *Mycobacterium celatum*

Características generales:

M. celatum fue descrita por primera vez en 1993 en especímenes clínicos, especialmente de vías respiratorias y sangre. Las colonias han sido descritas como no pigmentadas, pero la mayoría de las cepas son amarillo pálido. El distintivo más importante parece ser la prueba bioquímica positiva de actividad arylsulfatasa, el crecimiento a 45 ° C es negativo. Existen dos patrones de PRA para *M. celatum* (Leão et al., 2004).

Epidemiología:

M. celatum causa infección en Pacientes con SIDA. Recientemente Piersimoni et al., informó de un caso grave de infección pulmonar en un paciente inmunodeprimido (Leão et al., 2004).

1.4.3.9.5. *Mycobacterium chelonae*

Características generales:

M. chelonae se describió por primera vez en el Bergey's manual en 1923. En 1953, Moore y Frerichs detectaron una micobacteria desconocida en un absceso de rodilla, los autores identificaron que se trataba de una especie nueva diferente a *M. abscessus*. Stanford y Pattyn fueron los primeros en informar sobre estudios de aislados clínicos post inyección en Holanda e Inglaterra. Este estudio dio lugar a la denominación oficial *M. chelonae*. *M. chelonae* es una micobacteria no cromógena de rápido crecimiento. Sus colonias son mucosas, tienen la apariencia de donuts y

aparecen a los 4 días o 5 días de incubación utilizando medios de cultivo convencionales. Las pruebas bioquímicas características son: arylsulfatasa (+) en 3 días, crecimiento en McConkey sin violeta cristal, y negativas a la absorción de hierro y pruebas de reducción de nitrato. Cabe destacar, que es importante realizar una correcta distinción de esta micobacteria con posibles micobacterias idénticas en morfología y de características de crecimiento similares, estamos hablando de *M. fortuitum* y *M. abscessus*, ya que el tratamiento puede variar en función de la especie (Leão et al., 2004).

Epidemiología:

Esta especie es aislada frecuentemente de lagos, ríos de agua dulce, agua de mar, y los sistemas de aguas residuales. Su generalizada presencia en el medio ambiente hace de esta especie un contaminante en el laboratorio. Razón por la cual, puede contaminar soluciones, equipo médico y heridas quirúrgicas. En los seres humanos es asociada a alteraciones pulmonares, tejidos blandos o infecciones diseminadas, principalmente en pacientes con factores de riesgo tales como trasplante de riñón, cirugía, terapia con corticosteroides, etc. Ha sido recientemente implicada en focos de infección después de cirugía oftalmológica (láser, cataratas, traumatismos) y procedimientos estéticos (cirugía plástica, mesoterapia) (Freitas, 2003).

1.4.3.9.6. *Mycobacterium fortuitum*

Características generales:

M. fortuitum fue descrito por Costa Cruz en 1938. *M. fortuitum* es una micobacteria ambiental, no cromógena y de rápido crecimiento. Entre las principales características bioquímicas tenemos: arylsulfatasa a los 3 días (+), crecimiento en McConkey sin cristal violeta (+), crecimiento a 42°C y en presencia de 5% de NaCl (+), nitrato reductasa (+). En los métodos de identificación tradicional, las pruebas con hidratos de carbono y citrato de sodio son útiles para la separación de las bacterias clasificadas como pertenecientes al complejo *M. fortuitum*. En el PRASITE existen 3 patrones disponibles identificados. Pero Steingrube et al y Rocha da Silva et al., analizaron diferentes cepas de *M. fortuitum*, y describen patrones adicionales de PRA (Leão et al., 2004).

Epidemiología:

Esta especie se ha aislado de agua potable, sistemas de distribución de agua y de una gran variedad de suelos en todo el mundo. En los seres humanos, está frecuentemente asociada a infecciones cutáneas y rara vez en enfermedades pulmonares. Es un agente etiológico en infecciones post operatorias principalmente de la cardíaca (Leão et al., 2004).

1.4.3.9.7. Mycobacterium gastri

Características generales:

M. gastri fue aislado de especímenes de lavado gástrico humano. *M. gastri* es una micobacteria de lento crecimiento no pigmentada. Sus características fenotípicas son similares a *M. kansasii*, aunque la diferenciación entre ambas especies puede lograrse sobre la base de pigmentación, nitrato reducción, hidrólisis de Tween y pruebas de catalasa. La secuenciación del 16S rRNA confirma que ambas especies están estrechamente relacionadas. Se cuenta con un único patrón para esta especie (Leão et al., 2004).

Epidemiología:

M. gastri se ha aislado en especímenes de lavado gástrico a veces de esputo y de suelo, pero no es común aislarlo en el laboratorio clínico. En general se considera organismo no patógeno para los seres humanos, aunque se ha implicado en ocasiones a infecciones como peritonitis, artritis y vesiculitis seminal (Leão et al., 2004).

1.4.3.9.8. Mycobacterium genavense

Características generales:

M. genavense fue aislado en 1992 de la sangre de un paciente con SIDA en Ginebra, Suiza, por tal razón, el nombre se deriva de la ciudad de Ginebra. Una de las características de distinción de la especie es la incapacidad para crecer en Lowenstein Jensen, 7H11 agar u otros clásicos medios sólidos para la identificación de micobacterias, esta es la causa para que muchos laboratorios pierdan su identificación. *M. genavense* fue aislado por primera vez en medio Middlebrook 7H11 suplementado

con agar mycobactin que apoya el crecimiento de *M. genavense*. El primer patrón de PRA, se describió por Telenti et al. (Coyle, 1992).

Epidemiología:

La fuente de aislamiento de *M. genavense* en los seres humanos se desconoce aún, a pesar de que se ha propuesto pero no comprobado que una de las causas de adopción de este microorganismo puede ser la fuente intestinal. *M. genavense*, es comúnmente aislado en pacientes con SIDA. Los obstáculos que presenta *M. genavense* son la lentitud de crecimiento y las necesidades que requiere el organismo, por ejemplo el medio enriquecido con sangre. Un brote causado por *M. genavense* fue difundido en todo el mundo por Hadad et al., en el 2003 (Coyle, 1992).

1.4.3.9.9. *Mycobacterium gordonae*

Características generales:

M. gordonae es comúnmente aislada del medio ambiente. *M. gordonae* es de crecimiento lento y escotocromógeno según las características de pigmentación de Runyon. Esta especie hidroliza Tween 80, no es capaz de reducir nitratos, es ureasa negativa y catalasa positiva. Con lo que se refiere a morfología las colonias son lisas y de color amarillo o naranja, el crecimiento es óptimo a 37°C, pero es capaz de crecer en un rango de 25 a 37°C. *M. gordonae* es una especie altamente polimórfica. Ha presentado varios patrones de la RFLP, descritos por Telenti et al., el cual presenta cinco patrones de identificación y el PRASITE en la actualidad presenta nueve diferentes patrones. Cabe mencionar que *M. gordonae* I y III son los alelos más frecuentes en la mayoría de los estudios (Leão et al., 2004).

Epidemiología:

M. gordonae es una micobacteria ambiental, comúnmente encontrada en el agua. Esta especie que contamina en mayor frecuencia los laboratorios clínicos de microbiología se considera no patógena, sin embargo, varios informes han implicado esta especie en infecciones humanas. Pocos investigadores, tienen suficiente información para confirmar *M. gordonae* como agente etiológico causante de infección (Ruiz, 1998).

1.4.3.9.10. *Mycobacterium haemophilum*

Características generales:

M. haemophilum fue descrita por primera vez en 1978 en Israel por Sompolinsky et al., como la causa de infecciones cutáneas en pacientes con enfermedad de Hodgkin's. *M. haemophilum* es una micobacteria de crecimiento lento que tiene requisitos especiales para su crecimiento, como la suplementación con hierro o citrato férrico amoniacal). La temperatura óptima de crecimiento es entre 30°C y 32°C, al igual que *M. marinum* y *M. ulcerans*. Un patrón PRA se ha descrito para esta especie (Leão et al., 2004).

Epidemiología:

M. haemophilum es un agente patógeno de pacientes inmunocomprometidos especialmente aquellos con SIDA y transplantados (trasplante renal). Sampaio et al. describieron el aislamiento de *M. haemophilum* de tres pacientes en Brasil (Leão et al., 2004).

1.4.3.9.11. *Mycobacterium kansasii*

Características generales:

La descripción de *M. kansasii*, tuvo sus inicios en 1955 y desde ahí se han presentado una serie de informes documentando la presencia de *M. kansasii* en muestras de agua. *M. kansasii* es de crecimiento lento y fotocromógena. Crece a temperaturas entre 32°C y 42°C, obtiene un mejor crecimiento a 37°C, pero no crece a 45°C. Las principales características bioquímicas son la producción de catalasa (+), ureasa (+), nitrato reductasa (+) y la capacidad de hidrolizar Tween 80. Las colonias son ásperas o suaves, con bordes irregulares. La diversidad genética se ha demostrado por PRA, el mismo que define 5 patrones. *M. kansasii* I es el tipo más común en aislamientos humanos (Alcaide, 1997).

Epidemiología:

M. kansasii se ha aislado sobre todo de agua, rara vez de suelo. En los seres humanos, es causa de enfermedades pulmonares especialmente de pacientes

inmunodeficientes. La enfermedad causadas por esta especie ha sido descrita en todo el mundo, pero predominantemente en pacientes de zonas urbanas zonas (Alcaide, 1997).

1.4.3.9.12. Mycobacterium lentiflavum

Características generales:

M. lentiflavum fue descrito en 1996 de diferentes fuentes como: líquido gástrico, esputo, orina y biopsias procedentes de aislados clínicos. *M. lentiflavum* es escotocromógeno de lento crecimiento, que crece a temperaturas entre 22°C a 37°C. La mayoría de las características bioquímicas son negativas y por este motivo, la identificación no es posible utilizando el método tradicional. Se pueden realizar identificaciones mediante HPLC pero los patrones son ligeramente diferentes de otras especies no garantizando una eficiencia en el método. Pero por PRA se describe 4 patrones (Springer, 1996).

Epidemiología:

Esta especie no ha sido aislada del medio ambiente. Sin embargo, muchas cepas de los seres humanos no tienen una clara significancia clínica. Aunque existen varios casos de infecciones humanas descritas recientemente como linfadenitis cervical, enfermedades pulmonares e infecciones diseminadas. Existe un informe de aislamiento de *M. lentiflavum* I en Brasil, hasta el 2001, se presisa que en años venideros la frecuencia epidemiológica de la especie aumente. (Da Silva, 2001).

1.4.3.9.13. Mycobacterium malmoense

Características generales:

M. malmoense fue descrita por primera vez en 1977 en Suecia, en la ciudad de Malmo. La identificación en el laboratorio es a veces difícil porque se puede confundir con otras micobacterias de crecimiento lento y no pigmentadas como: *M. gastri*, *M. avium complejo*, o *M. shimoidei*. La hidrólisis de Tween 80 es positiva y permite una rápida diferenciación de MAC. Pero se recomienda el análisis de ácidos grasos y ácidos micólicos que son muy útiles para la confirmación de la identificación de *M.*

malmoense. Pero con el análisis del gen *hsp65* se identifica rápidamente a la especie. Hay dos patrones de *M. malmolense* identificados por PRA (Leão, 2004).

Epidemiología:

M. malmoense sólo esporádicamente ha sido recuperada del medio ambiente. Los organismos han sido aislados de aguas en Finlandia y de suelo en Japón. *M. malmoense* es un patógeno que causa enfermedad pulmonar porque la infección se limita principalmente a los pulmones. Esta micobacteria está difundida principalmente en pacientes inmunodeficientes, constituyéndose en un microorganismo comensal (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.14. *Mycobacterium marinum*

Características generales:

M. marinum fue descrita por primera vez en 1926 por Aronson et al. Esta micobacteria se aisló de peces enfermos provenientes de acuarios. *M. marinum* es un cultivador fotocromógeno lento, que muestra óptimo crecimiento entre 25-32°C. Las colonias son lisas y planas. Las principales características bioquímicas son: reducción de nitratos (-), catalasa (-), hidrólisis de Tween 80 (+) (la mayoría, pero no todas las cepas), arylsulphatasa (+) y prueba de la ureasa (+). Sólo se ha descrito un patrón de PRA, descrito en el PRASITE (Leão, 2004).

Epidemiología:

M. marinum es una micobacteria ambiental, principalmente asociada a infecciones en peces. En los seres humanos, estas infecciones están relacionados con la exposición al agua contaminada o de animales contaminados con esta micobacteria. La mayoría de las infecciones se producen en las extremidades en forma de lesiones en la piel aunque han sido descritas infecciones esporádicas en pacientes inmunodeficientes (Leão, 2004).

1.4.3.9.15. *Mycobacterium mucogenicum*

Características generales:

Hasta 1982, *M. mucogenicum* había sido denominado como *M. chelonae*, porque es bioquímicamente similar a *M. chelonae*. En 1995, una investigación genética, sobre la base de 16S rRNA, manifiesta la diversidad de las especies he inmediatamente se la consideró como una nueva especie denominada *M. mucogenicum*. *M. mucogenicum* es una micobacteria no cromógena de rápido crecimiento. Para su identificación se requieren de pruebas moleculares donde se han determinado 2 patrones (Springer, 1995).

Epidemiología:

M. mucogenicum se aisló de toques de agua y la mayoría de las cepas son mucoides (dando origen a su nombre). Rara vez ha sido identificado en infecciones humanas e infecciones de heridas (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.16. *Mycobacterium nonchromogenicum*

Características generales:

M. nonchromogenicum fue descrito por Tsukamura en 1965, como una micobacteria atípica no cromógena de crecimiento lento. Esta especie pertenece al complejo *M. terrae* al igual que *M. triviale*. Las principales características bioquímicas son hidrólisis de Tween 80, crecimiento a 42°C y positividad para producción de pirazinamidasas, pero es negativa para nitratos. La identificación más precisa a nivel de especie se realiza por PRA donde se han enunciado 2 patrones (Devallos, 1997).

Epidemiología:

M. nonchromogenicum es una micobacteria ambiental. Se ha aislado del suelo y fuentes de agua. Esta especie se considera no patógena, pero es el miembro con mayor frecuencia implicado en infecciones humanas del complejo *M. terrae* (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.17. *Mycobacterium peregrinum*

Características generales:

M. peregrinum se propuso por primera vez en 1962. Los investigadores basaron su estudio en características fisiológicas al compararlos con cepas que incluían

M. smegmatis y *M. phlei*. El nombre *M. peregrinum*, fue designado porque era la única colonia no pigmentada del grupo anteriormente mencionado. *M. peregrinum* es una micobacteria atípica no cromógena de rápido crecimiento que fue una subespecie del anteriormente denominado complejo *M. fortuitum*. Hoy en día, según los métodos tradicionales podemos distinguirlo de *M. fortuitum* porque no crece a 42°C, pero crece en un 5% de NaCl y mediante el uso de manitol como fuente de carbono (Devallos, 1997).

Tres patrones PRA se informaron en Devallois et al., y se incluyen en el PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>). Un nuevo patrón, pero similar a *M. peregrinum*, fue descrito por Rocha da Silva et al.

Epidemiología:

M. peregrinum es una micobacteria ambiental. En los seres humanos, se ha asociado y localizado pero no difundido en infecciones pulmonares y cutáneas. Debido a su presencia en el medio ambiente esta especie ha participado en pseudo-brotos de infecciones respiratorias y brotes de infecciones de heridas externas. Informes sobre infecciones supuestamente causadas por *M. fortuitum*, pueden referirse a *M. peregrinum*, especialmente antes de 1992, cuando la validez taxonómica de esta especie no era demostrada (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.18. *Mycobacterium scrofulaceum*

Características generales:

M. scrofulaceum se ha asociado con linfadenitis cervical en niños, además se ha aislado en fuentes naturales como: lagos, ríos y aerosoles. *M. scrofulaceum* es una micobacteria escotocromógena de crecimiento lento. Su óptima temperatura es de 37°C, no hidroliza Tween 80 y es negativo a la prueba de reducción de nitrato. Normalmente es positivo para ureasa y catalasa. Las colonias son lisas de color amarillo a naranja. Esta especie se ha asociado en el pasado a *M. avium*, ya que comparte varios factores genéticos, patogénicos, ecológicos y fenotípicos. Sin embargo, gracias a pruebas moleculares se han identificado como distintas especies. Un patrón emitido por PRA de *M. scrofulaceum* se informó por Telenti et al. y Devallois et

al. Además se ha incluido en el PRASITE de igual manera. Sin embargo Da Silva Rocha et al., informó de un nuevo patrón de RFLP (Leão et al, 2004).

Epidemiología:

M. scrofulaceum ha sido aislado del medio ambiente en su mayoría de lagos y ríos de climas cálidos. Sin embargo, en los últimos años, se ha observado una disminución en el número de aislados en el ambiente pero ha incrementado los aislados en humanos. En los seres humanos, esta especie se ha asociado a linfadenitis en los niños, se limita a la zona cervical, mandibular y ganglios linfáticos. La asociación con otras presentaciones clínicas son raras pero se han descrito: infecciones diseminadas, úlceras crónicas, nódulos cutáneos y enfermedades pulmonares en pacientes con SIDA (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.19. *Mycobacterium simiae*

Características generales:

M. simiae fue aislado de monos en 1965. *M. simiae* es una micobacteria fotocromógena. Crece óptimamente a 37°C, lentamente a 25°C y no presenta crecimiento a 45°C. En algunos aislados clínicos *M. simiae* pueden ser semejante al MAC, por esta razón es indispensable realizar la prueba de niacina para distinguir a estas especies. No siempre es fácil diferenciar *M. simiae* de *M. scrofulaceum*, mediante métodos tradicionales basados en pruebas de pigmentos, como la producción de niacina por lo que los métodos de análisis de ácidos micólicos y métodos moleculares deben utilizarse para confirmar *M. simiae*. Dos patrones de PRA, proponen los tipos I y II, se describen en Devallois et al., y cuatro patrones, con tipos diferentes, I, III, IV y V, se presentan en el PRASITE (Leão et al, 2004).

Epidemiología:

M. simiae normalmente es un contaminante del medio ambiente rara vez asociado con enfermedades humanas. La enfermedad clínica es similar a la causada por MAC incluyendo enfermedad pulmonar crónica. Se han notificado varios casos de infección por *M. simiae* en pacientes con SIDA (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.20. *Mycobacterium smegmatis*

Características generales:

M. smegmatis fue aislado por primera vez por Lustgarten et al. en 1885 y fue nombrado atendiendo a la secreción genital (smegma) a partir de la cual se lo aisló por primera vez de un paciente con una úlcera de pene. *M. smegmatis* es una micobacteria de rápido crecimiento y no pigmentada. Su temperatura de óptimo crecimiento es a 45°C. Entre las principales características bioquímicas están: el crecimiento en presencia de 5% NaCl, arylsulphatasa negativa (3 días), positiva a la prueba de nitrato reductasa. Algunos autores mencionan el grupo *M. smegmatis* como nueva especie que presenta significancia clínica pero poca frecuencia e incluyen también a especies aisladas recientemente como *M. wolinskyi* y *M. goodii* (Brown-Elliott, 2002). Un patrón de PRA se ha descrito y está disponible en PRASITE (Leão et al, 2004).

Epidemiología:

M. smegmatis es una micobacteria ambiental aislada de suelo y agua. Esta especie ha sido comúnmente implicada en infecciones humanas, como lesiones de tejidos blandos asociados con trauma y las infecciones en pacientes con SIDA y rara vez identificada en infecciones pulmonares (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.21. *Mycobacterium terrae*

Características generales:

M. terrae fue descrito por Wayne et al. en 1966. Fue aislado en 1968 de esputo y lavado gástrico a partir de especímenes humanos. Esta micobacteria es considerada casual y no residente patógena. *M. terrae* se presenta como colonias no cromógenas y de crecimiento lento. Las pruebas bioquímicas realizadas son: positiva a la hidrólisis de Tween 80 y nitrata. Negativa para: arylsulfatasa, ureasa, y pirazinamidas. El crecimiento óptimo es a 42°C. Otras especies como *M. triviale* y *M. nonchromogenicum* han sido consideradas como pertenecientes al complejo *M. terrae*. En el PRASITE se ha descrito un patrón de esta especie, Da Silva Rocha informó de tres nuevos patrones de PRA (Leão et al, 2004).

Epidemiología:

M. terrae es una micobacteria ambiental que se ha aislado de agua, suelo y verduras. Esta especie se ha documentado como causa de infecciones humanas: sinovial y pulmonar, y rara vez se difunde en las infecciones de pacientes con SIDA (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.22. *Mycobacterium thermoresistibile*

Características generales:

La cepa original se recuperó de tierra húmeda y de polvo de casa (Tsukamura, 1975). *M. thermoresistibile* es una micobacteria escotocromógena de rápido crecimiento. Las colonias son de color amarillo, de textura dura o lisa. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 37°C y 52°C. Las principales características bioquímicas son positiva a nitrato reductasa y a la hidrólisis de Tween 80. Negativa a la fosfatasa ácida, pruebas de citratos y la capacidad de crecer en NaCl 5%. Un solo patrón está presente en PRASITE. (Leão et al, 2004).

Epidemiología:

M. thermoresistibile es una micobacteria ambiental que se ha aislado de polvo de casa. Se considera no patógena para los seres humanos, aunque informes esporádicos se han asociado a esta especie, concretamente a las infecciones después de mamoplastía, abscesos pulmonares, e infecciones diseminadas en pacientes inmunodeficientes (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.23. *Mycobacterium ulcerans*

Características generales:

M. ulcerans se describió por primera vez en 1948 en Australia en una biopsia de una úlcera en un niño. *M. ulcerans* es una micobacteria ambiental de crecimiento lento que puede ser ligeramente pigmentada. Crece comúnmente en Lowenstein-Jensen medio y en medio líquido BACTEC, o Middlebrook 7H9 bajo condiciones microaerófilas (2,5 - 5% de oxígeno). Crece mejor a baja temperatura de 30°C. Las características fenotípicas son estrechamente

relacionadas con *M. marinum*. PRA puede diferenciar *M. ulcerans* y *M. marinum*. Un patrón fue descrito por Devallois et al., pero el Praside muestra que *M. ulcerans* tiene dos modalidades de PRA, es decir la especie presenta 2 tipos (Leão et al, 2004).

Epidemiología:

M. ulcerans causa una enfermedad en la piel humana llamada úlcera de Buruli o úlcera de Bairnsdale. En 1998, la OMS reconoce *M. ulcerans* como un patógeno emergente (Leão et al, 2004).

1.4.3.9.24. *Mycobacterium xenopi*

Características generales:

M. xenopi se describió por primera vez en 1959 y fue aislada de lesiones en la piel de un sapo africano. La principal característica de *M. xenopi* es su capacidad para crecer a 45°C. Aunque puede crecer lentamente a 37°C, pero no a 25°C. Es arylsulphatasa positiva a los 3 días y no hidroliza Tween 80 después de 14 días. Estas características son importantes porque *M. xenopi* puede confundirse con *M. avium* y *M. intracellulare*. Un patrón de PRA ha sido descrito y que también está presente en PRASITE (Leão, 2004)

Epidemiología:

En 1965, se caracterizó por infectar el pulmón de un ser humano de nacionalidad inglesa. Pero también se ha detectado en otros países. Se ha descrito que *M. xenopi* causa infecciones extrapulmonares en pacientes inmunocomprometidos; el SIDA es un factor de riesgo para infecciones por *M. xenopi*. Háfner et al., informó que *M. xenopi* es una de las especies más identificadas en la rutina de laboratorio, pero en América Latina se ha informado raramente. Además se ha recuperado de los entornos acuáticos en un estudio brasileño (Aily, 1999).

1.4.4. Diagnóstico molecular de micobacterias atípicas.

La taxonomía procariota ha pasado de la clasificación en función de las características fenotípicas, formalmente ya obsoleta, a la utilización de estudios

químicos y fundamentalmente genotípicos que por el elevado poder discriminativo se ha logrado diferenciar nuevas especies. Se han descrito hasta el momento alrededor de 100 especies de micobacterias. Desde 1990 se conocen 42 nuevas especies de micobacterias, gracias a pruebas basadas en ADN. No obstante, sigue existiendo un importante reservorio de nuevas especies (Valdés y Cid, 2004).

En los últimos años, los métodos alternativos para la identificación de micobacterias fueron desarrollados y evaluados para uso clínico, como pruebas de hibridación de ADN, análisis de ácidos micólicos, secuenciación de ADN, microarrays, y pruebas basadas en PCR, aunque los países en vía de desarrollo tienen una limitación relativa al adquirirlas, por el alto costo de los equipos (Leão et al., 2004).

1.4.4.1. Pruebas de ADN.

Existen varias pruebas moleculares para la identificación genotípica de microorganismos: perfiles de restricción del ADN tanto cromosómico (RFLP) como extracromosómico (fingerprinting); la amplificación de secuencias conocidas con su posterior restricción enzimática (PCR-RFLP).

La detección de genes de resistencia por diferentes métodos moleculares como amplificación por PCR de genes de resistencias, análisis PCR-RFLP, detección de mutaciones por PCR-RFLP, secuenciación de ADN y más recientemente los “Arrays” de oligonucleótidos de ADN en Microchips (Leão et al., 2004).

1.4.4.2. AccuProbe® Culture Identification Test: (Gen Probe, Inc. Dan Diego).

Incluye pruebas para confirmar el cultivo de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, MAC (pruebas individuales para *M. avium* y *M. intracelulare*) y *M. gonadae*. Es una sonda comercial, gracias a un ADN no radiactivo que permite identificar las micobacterias por hibridación con ARN ribosómico micobacteriano, de forma rápida (2h) y específica. Utiliza un marcador quimioluminiscente que es complementario al ARN ribosomal del organismo base de estudio. Este etiquetamiento de híbridos ADN/ARN son calculados en una prueba genética de luminiscencia.

1.4.4.3. INNO- LiPA *Micobacteria* V2. (Innogenetics NV, Gent, Belgium).

Consiste en aplicar el método de hibridación en reversa, en el cual la sonda genera amplicones de 400-500 bp de la región 16S-23S rRNA (ARN ribosomal). Cabe destacar que los primers son biotinilados (Leão, 2006). La amplificación de los productos biotinilados son hibridizados con 14 líneas reconocidas (sondas) inmóviles en un typing strip. Finalmente los híbridos son detectados a través de reacciones colorimétricas. Veinte sondas específicamente reactivas con *M. tuberculosis complex* (MTb probe line), *M. kansasii* (MKA-1, MKA-2, MKA-3), *M. xenopi* (MXE), *M. gonadae* (MGO), *M. genavense* (MGC), *M. simiae* (MSI), *M. marinum*-*M. ulcerans* (MMU), *M. celatum* (MCE), *M. avium* (MAV), *M. intracellulare* (MIN-1, MIN-2), *M. scrofulaceu* (MSC), *M. malmoense* (MML), *M. haemophilum* (MHP), *M. chelonae* (MCH-1, MCH-2, MCH-3), *M. fortuitum* (MFO) y *M. smegmatis* (MSM). Una sonda es específica para el género *Mycobacterium* (MYC) y una para MAIS complex (MAIS- que reacciona con *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* y otro MAC).

1.4.4.4. Secuenciación de ADN

El método molecular de referencia para la identificación de micobacterias es la determinación de secuencias del ADN ribosomal 16S (16S-ADNr). La molécula 16S-ADNr tiene una alta conservación y significancia filogenética en el cambio de la secuencia en cierta posición, la cual es específica para microorganismos de diferentes especies. Las regiones hiper variantes dentro de la molécula pueden estar disponibles para la identificación, porque las secuencias contienen relativamente alta diferencia entre especies pero relativamente baja variabilidad dentro de una especie (Valdés, 2004).

Existe además otro método de diferenciación el 16S-23S Internal transcribed spacer (ITS). ITS es la secuencia que representa un suplemento para la secuenciación del gen 16S rARN, para la diferenciación de algunas especies estrechamente relacionadas, mostrando una divergencia menor al 2% entre las especies (Leão et al., 2004).

1.4.4.5. Microarrays

Se basa en la hibridación de patrones producidos en alta densidad de oligonucleótidos, en array (chips de ADN) con sondas complementarias a 705 bases de

la secuencia del gen *rpoB* de *M. tuberculosis*, secuencias que son usadas para la identificación de 121 muestras comprendiendo a *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gonadae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* y *M. xenopi*. (Leão et al., 2004)

La identificación usando arrays, dio como resultado del análisis 180 bp de la secuencia 16S.

1.4.4.6. Pruebas basadas en PCR.

Diversos autores han propuesto pruebas basadas en PCR para la identificación de micobacterias atípicas a partir de cultivos de muestras clínicas o muestras extra pulmonares. La PCR es una técnica que tiene menos demanda que la secuenciación directa y es mucho más económica que las pruebas comerciales.

La amplificación del gen *dnaJ* y su hibridación fue usada por Takewaki, esta técnica permite la diferenciación de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. Kansasii* (Leaô et al., 2004).

De Beenhouwer, uso productos de amplificación del gen *16S ARNr* en un ensayo de hibridación con 7 pruebas para especies específicas identificando *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenipi*, *M. genavense* y *M. chelonae*. (Leaô et al., 2004).

Kulski, desarrolló un PCR múltiple con 6 primers para la amplificación del gen *16S ARNr* y el gen *MPB70*, permitiendo la identificación de *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. avium*, atendiendo al tamaño de los fragmentos identificados (Leaô et al., 2004).

Vaneechoutte, combinó la amplificación del gen *16S ARNr*, utilizando PCR con digestión enzimática empleando *CfoI* y *MboI*. Esta estrategia permitió diferenciar entre *M. avium*, *M. chelonae*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. simiae*, *M. terrae* y las especies pertenecientes a *M. tuberculosis complex* (Leaô et al., 2004).

Finalmente Telenti describió un método para diferenciar el diagnóstico de micobacterias, este método tiene el nombre de PRA (PCR- Restriction Enzyme Analysis) (Telenti et al., 1993).

1.4.4.6.1. PCR Restriction Enzyme Analysis (PRA).

Para la diferenciación de las micobacterias no pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se ha hecho uso del polimorfismo y la alta conservación del gen *hsp65*, el cual codifica para la proteína de shock térmico, hsp de 65KDa, (Chimara, 2008).

El gen *hsp65* está presente en todas las micobacterias y en algunas otras bacterias como la *Nocardia* spp. (Devallos et al., 1997).

La técnica molecular PRA, fue establecida en 1992 por Telenti y sus colaboradores, los cuales, basaron el método en la amplificación del gen *hsp65* utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, obteniendo un producto de amplificación de 441 bp, amplicones que posteriormente serán digeridos con enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII* (Telenti et. Al, 1992).

Para la interpretación de los patrones de restricción, Telenti evaluó las distancias de corrida electroforética (en milímetros), realizando una curva estándar de distancia de migración entre el marcador molecular y los fragmentos de los patrones restrictivos de la secuencia amplificada de cada enzima, gracias al empleo de un programa computacional. El tamaño de cada fragmento se contabilizó en pares de bases y para evitar confusiones con las bandas producto de los primers dimers, no se las tomaron en cuenta debido a que sus fragmentos son cortos menores a 60bp (Telenti et al, 1992).

En la identificación original propuesta por Telenti, se determinaron 29 especies incluidas subespecies, que atendían a características de crecimiento rápidas y lentas, tales microorganismos fueron evaluados por algoritmos establecidos por autoría de Telenti. A partir de 1993 se incrementaron investigaciones referentes a la identificación de micobacterias basadas en el proceso establecido por Telenti, la diferencia es que en nuestros días los estudios restrictivos utilizan de tres a cinco enzimas para aumentar la discretización entre especies, tal es el caso de las investigaciones realizadas por

Devallos et, al., que utilizó PRA para diferenciar 34 especies diferentes (Devallos et, al., 1997).

El objetivo del trabajo de Devallos et al., fue de extender la diferenciación de especies microbianas, haciendo un particular énfasis en la diferenciación de *Mycobacterium chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, y *M. peregrinum*, anteriormente referidas como *M. fortuitum complex* (compuesta por *M. fortuitum var. fortuitum*, *M. fortuitum var. peregrinum*, *M. chelonae subsp. chelonae*, and *M. chelonae subsp. abscessus*) (Devallos et, al., 1997).

Actualmente, puede emplearse un programa computacional para automatizar el análisis; este programa fue creado por el Instituto Pasteur de Paris, Francia y posee algoritmos específicos disponibles en la página de Internet (<http://www.app.chuv.ch/Prasite>) (Leão, 2004). PRA es una técnica molecular específica a nivel de especie, inclusive puede diferenciar diferentes tipos de la misma especie que tan solo una mínima variación de 5bp en los patrones de digestión enzimática, tal es el caso de *M. fortuitum* que presenta 2 tipos: *M. fortuitum* tipo I y *M. fortuitum* tipo II. Estas especies muestran algoritmos diferentes identificados por el PRASITE (Chimara et al., 2008)

Cuadro 1.5 Diferencia de *Mycobacterium fortuitum* tipo 1 y *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 utilizando en PRASITE.

Organismo	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
BstEII patrón	235 / 120 / 85
HaeIII patrón	145 / 120 / 60 / 55
Organismo	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2
BstEII patrón	235 / 120 / 85
HaeIII patrón	140 / 120 / 60 / 55

Fuente: Prasite

Varios grupos de investigación han usado esta técnica para la identificación de MNT, ayudándose de este banco de datos disponible on line. Estas investigaciones han descrito nuevos patrones PRA que diferencian especies, subespecies y hasta variantes alélicas de micobacterias atípicas (Hafner et al., 2004).

Estudios moleculares en Brasil, emplearon PRA para identificar diferentes especies del género *Mycobacterium*, los resultados obtenidos fueron sorprendentes en el país ya que se identificaron 24 cepas del género *Mycobacterium* de las cuales se caracterizaron 54 especies diferentes. Entre las observadas citamos: *Mycobacterium avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* (Oliveira, 2000).

El último estudio realizado en Brasil, 2008. Demostró alarmantes resultados mostrando el margen de discordancia entre los métodos fenotípicos y el PRA-*hsp65*. De un total de 434 aislamientos de MNT que se obtuvieron del Instituto Adolpho Lutz de Sao Paulo entre enero de 2000 y enero de 2001, se presentó que 321 (74%) de los aislamientos fueron concordantes aplicando los 2 métodos. Los 113 aislamientos restantes emitieron un diagnóstico completamente diferente en los 2 métodos. Posteriormente los aislados discordantes, se analizaron mediante el estudio del fragmento de 441bp perteneciente al gen *hsp65*, donde se obtuvieron resultados significativamente más precisos que los métodos fenotípicos (392 (90,3%) vs 338 (77,9%), respectivamente, $p < 0001$, según la Prueba de Fisher). Entre los 333 aislamientos que representan las más comunes especies patógenas, PRA-*hsp65* proporcionó un resultado incorrecto de sólo el 1,2% (Chimara, 2008).

El uso de otras enzimas de restricción como *Sau961*, *CfoI*, o *AvaII*, *HphI*, *HpaII* ha permitido la diferenciación de hasta 62 especies de micobacterias no tuberculosas del género *Mycobacterium* y con las tradicionales enzimas *BstEII* y *HAE III* se ha logrado identificar 96 especies a través de PRA (Hong, 2005).

1.4.4.6.2. Ventajas del PRA

El análisis de la restricción enzimática de los productos de PCR del género *Mycobacterium* es específico para la especie gracias a los patrones de ADN y al análisis del gen *hsp65*. Esta técnica molecular ha sido usada para diagnóstico, evaluaciones taxonómicas y caracterización de cepas de características novel (Oliveira, 2000). La técnica molecular PRA es un método rápido de tan solo 2 días, que reduce el tiempo para la identificación de micobacterias no tuberculosas. La identificación clásica de micobacterias, basadas en morfología, cultivo y pruebas bioquímicas, pueden demorar varias semanas después de la recepción de las muestras y en algunos casos no se logra

identificar correctamente los microorganismos con los protocolos disponibles. PRA ha logrado identificar hasta el momento 96 especies.

Existen métodos alternativos como la cromatografía en capa fina, cromatografía gas- líquido, cromatografía líquida de alta resolución y secuenciamiento del gen 16S ARNr, herramientas útiles y poderosas que han identificado varias especies de micobacterias. Sin embargo, su uso está limitado por el excesivo costo de los equipos, por esta razón es importante el desarrollo del método PRA, debido a que proporciona resultados rápidos y confiables, atendiendo un valor económico no costoso (Devallois et al., 2002). El análisis de patrones de restricción es un método alternativo, simple y económico, que puede ser implementado en forma rutinaria en los laboratorios de referencia de micobacterias (Araya, 2006). El tiempo para completar la identificación mediante PRA es de 48 horas, mientras que en la metodología tradicional se requieren 3 semanas o más (dependiendo de la cepa), para obtener resultados.

La identificación mediante PRA, también ha sido útil en la identificación del complejo *M. tuberculosis*, especialmente en muestras donde la identificación morfológica de la tuberculosis no es concluyente (Araya, 2006).

1.4.4.6.3. Desventajas del PRA

Debido a que la visualización de los patrones se lo realiza a manera personal o utilizando lectores de geles, se puede tener un margen de diferencia entre 5bp – 10bp de los tamaños de fragmentos de restricción (Devallos et al., 1997).

Este margen de diferencia es una desventaja de la técnica debido a que existe más de una base de datos descrita para MNT porque no se ha logrado uniformidad internacional para la interpretación de los resultados. Las diferencias pudieran deberse a condiciones de corrida electroforética, aplicadas en los ensayos realizados, al porcentaje de agarosa usada, tipo de agarosa utilizada e incluso, el tipo de gel empleado, puesto que se han reportado diferencias entre los patrones de corrida cuando se emplean geles de agarosa y geles de poliacrilamida, pero el rango de diferencia no puede ser mayor a 10bp (Yzquierdo, 2007).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones participantes en el proyecto

- Centro de Biomedicina, Laboratorio de Biología Celular y Microbiología Molecular, Quito – Ecuador.
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Quito – Ecuador
- Laboratorio de Tuberculosis, Hospital Vozandes, Quito- Ecuador
- Corporación Ecuatoriana de Biotecnología, Quito- Ecuador
- Centro de Biomedicina, Laboratorio de Tuberculosis, Caracas, Venezuela.

2.1.2. Personal cooperante

- Dr. Oswaldo Rodríguez MD, PhD
- Dra. Jannete Zurita – Msc. en Microbióloga.
- Dra. Sonia Ontaneda Msc. en Microbiología
- Theo Murer – Tecnólogo Laboratorista
- Dr. Jacobus de Waard – Especialista en micobacteriosis.
- Lic. Aileen Farreras – Bioanalista
- Lic. Anita Vargas – Microbióloga

2.2. Zona de estudio

2.2.1. Trabajo de campo

El trabajo de Campo se desarrolló en el Laboratorio de Tuberculosis del Hospital Vozandes de la ciudad de Quito, ubicado en la calle Villalengua Oe2-37 entre Veracruz y Av. 10 de Agosto, Quito- Ecuador.

2.2.2.Trabajo de laboratorio

El aislamiento, cultivo y extracción de ADN, se efectuó en el Hospital Vozandes de la ciudad de Quito, Laboratorio de Tuberculosis, ubicado en la calle Villalengua Oe2-37 entre Veracruz y Av. 10 de Agosto, Quito- Ecuador.

El trabajo de investigación y estandarización de la técnica se desarrolló en primera instancia en los Laboratorios de Biología Celular y Microbiología Molecular perteneciente al Centro de Biomedicina, localizado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador, Sodiro N 14-121 e Iquique, Quito- Ecuador.

Pero, la finalización y la mayor parte del período y proceso investigativo se realizó, en las instalaciones del Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE, Escuela de Bioanálisis, ubicado en la 12 de Octubre y Roca, Quito- Ecuador.

2.3. Período de tiempo de investigación

El desarrollo del proyecto tomó curso en Junio del 2007 y su finalización se realizó en Julio 2008.

2.4. Procedimientos

2.4.1.Selección de aislados clínicos y criterios de inclusión para la obtención de cepas.

Para el estudio se incluyó a todos los aislados clínicos que presentaron casos de micobacteriosis pulmonar o extrapulmonar, del Hospital Vozandes Quito, Laboratorio Microbiología y Tuberculosis en el período 2003 hasta Julio del 2008, los aislados clínicos, fueron diagnosticados previamente como micobacterias atípicas por análisis clínico del Laboratorio de Tuberculosis, mediante BAAR, siembra en Lowenstein, Kudoh, MGIT y capa delgada, además se realizaron pruebas bioquímicas entre las que se destacan: Arysulfatasa 3 días, Arysulfatasa 2 semanas, Catalasa semicuantitativa >45°C, catalasa termoestable a 68°C, niacina, reducción de nitratos, ureasa, hidrólisis de Tween + 10 días, Pyrazinamidas, entre otras (ANEXO A); todas

ellas, realizadas por las tecnólogas en laboratorio clínico (Yolanda Izurieta y Anita Vargas), dirigidos por la Doctora Jeannete Zurita.

Como base experimental del estudio, se incluyó 5 cepas de referencia ATCC (*American Tipo Culture Collection USA*), utilizadas como controles. Estas fueron *M. tuberculosis* ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 13950 y *M. smegmatis* ATCC35796.

2.4.2. Codificación de aislados clínicos

A cada aislado clínico se le asignó un código numérico, correspondiente al número de formulario global que presenta el Laboratorio de Tuberculosis. Pero el código que se utilizó para llevar a cabo la codificación de la prueba molecular PCR Restriction Enzyme Análisis (PRA), atendió al número de siembra de dicho paciente, codificación que es independiente al número del formulario del HVQ, Laboratorio de Tuberculosis. Por tal razón, el orden del código a emplearse no atiende una secuencia progresiva, debido a que no todos los aislados clínicos que ingresaron al formulario global del Laboratorio de tuberculosis, requerían una siembra para diagnosticar micobacterias atípicas.

2.4.3. Descongelación y siembra de aislados clínicos caracterizados como atípicos

El Laboratorio de Microbiología y Tuberculosis del Hospital Vozandes Quito, cuenta con un banco de cepas de micobacterias atípicas caracterizadas desde el 2003 hasta el 2008, estas cepas han sido congeladas en un medio de crioconservación que contiene:

Cuadro 2.1 Componentes del Medio de crioconservación.

<i>Componente</i>	<i>Alicuotar</i>
Glicerol	5 µl
Tripticasa soya	3 µl
TE	200 µl

Fuente: De Waard, 2006.

Se procede a descongelar las cepas y a sembrarlas en Lowenstein Jensen y se las lleva a incubación a 35°C o 37°C en algunos casos.

Cada tubo L-J se encuentra debidamente etiquetado con el número de congelación, número del paciente y fecha de siembra.

2.4.4. Análisis de características según la velocidad de crecimiento y pigmentación.

Se procede a discretizar si las micobacterias son de rápido o lento crecimiento. Según requieran más o menos de 7 días, para producir colonias visibles en un subcultivo sólido con un inóculo diluido.

Se procede a realizar la primera verificación después de 3 días de la fecha de siembra, la segunda verificación se realiza a los 7 días y finalmente la tercera verificación a los 15 días. (ANEXO B).

La segunda discretización atiende al tipo de pigmentación de la colonia: No cromógenas si no presenta la posibilidad de producir pigmento; Escotocromógenas si produce pigmento en ausencia de luz y Fotocromógena si presentan pigmento en presencia de luz. (ANEXO B).

Los datos proporcionados de velocidad de crecimiento y pigmentación son importantes para la correlación y certera interpretación de los resultados emitidos por la técnica molecular PRA.

2.4.5. Extracción de ADN de cultivos puros.

Para la extracción de ADN a partir de cultivos puros, se utilizaron los protocolos del Practical Handbook for Phenotypic and Genotypic Identification of Micobacteria, 2004, con pequeñas modificaciones, al igual que el protocolo publicado por De Waard, 2006, del Laboratorio de Tuberculosis del Centro de Biomedicina de Caracas, Venezuela.

En primera instancia, se añade 100 µl de TET en un tubo eppendorff de 2ml, y con la ayuda de una aza microbiológica transferir una muestra considerable de la bacteria, (proveniente de un medio sólido), resuspendiéndola en el buffer hasta lograr homogenizar el medio. Pero si la bacteria proviene de un medio líquido, se transfiere

1ml del cultivo a un tubo de microrcentrífuga, se centrifugó por 5min. a 13.000 rpm y se procede a resuspender el pellet en 100µl de TET (Leão et al, 2004). Los pasos detallados a continuación se deberán seguir con sistematización tanto para medios sólidos como para medios líquidos.

La inactivación se realiza por calentamiento a 100°C por 10 min, con la finalidad de lisar la pared celular de las micobacterias rica en lípidos (De Waard, 2006). Luego se centrifugó a 13.000 rpm, por 5 min y se lavó el pellet con NaCl, atendiendo la misma técnica de centrifugación. Después se resuspende la bacteria en el buffer de resuspensión (TET), pH 8.0. Se utiliza de 0.2 – 1ml (dependiendo de la masa) de TET. Hervir por 10 min y congelar a -20°C por toda la noche (Leão et al, 2004).

Cuadro 2.2 Componentes del Buffer de Resuspensión. TET

<i>Componente</i>	<i>Concentración</i>
Triton X- 100	1% (v/v)
Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Fuente: Leão et al, 2004

Se presenta una alternativa para optimizar el tiempo total de la extracción y finalizar el proceso en un solo día, para lo cual se reemplaza el paso de congelación overnight, por un proceso alterno que consiste en hervir 10 min la resuspensión e inmediatamente congelarlo por 10 min más, repitiendo este proceso (hervir-congelar) 3 veces. (Leão et al, 2004)

2.4.6. Transporte y almacenamiento del ADN genómico micobacteriano.

Los tubos eppendorff que contienen el ADN micobacteriano, se transportaron en un contenedor aislante del calor, con paquetes de gel congelante; con el propósito de garantizar la cadena de frío, 4°C, desde el Hospital Vozandes Quito, lugar donde se realizó la extracción, hasta el Laboratorio de Diagnóstico Molecular PUCE.

Las muestras se almacenaron a -70°C, para su posterior procesamiento.

2.4.7. Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó utilizando el espectrofotómetro (UV WINLAB Software, Perkin-Elmer), Lambda 25 UV/VIS, bajo las especificaciones requeridas por el equipo, en el DISERLAB de la PUCE.

Se preparó diluciones de ADN, en tubo plástico estéril de 15 ml (Corning), que contenía 3000µl de agua tipo biología molecular (Invitrogen), donde se añadió 5 µl de ADN de cada muestra obtenida, colocándose esta mezcla en cubetas de cuarzo de 4ml (Perkin-Elmer), que posteriormente se ubicaron dentro del espectrofotómetro y se procedió a medir la absorbancia. Para el blanco se colocó 3.005 ml de agua tipo biología molecular (Invitrogen).

La absorbancia de los aislados clínicos y de los controles fueron leídos a 260 y 280 nm., para conocer la calidad de ADN en la muestra, se procedió a dividir el valor obtenido a 260 nm para el valor obtenido a 280 nm., donde el número resultante que denota buena calidad de la muestra, debe ser mayor a 1.5 (*Monteiro et al., 1997*). Además se calculó la concentración del ADN (N), mediante la fórmula:

$$N(\mu\text{g}.ml^{-1}) = 70A_{260} - 40A_{280}$$

Finalmente se divide este valor por el factor de dilución y se obtiene la concentración de ADN (*Surzycky, 2000*).

2.4.8. Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *M. tuberculosis complex*.

El objetivo es amplificar un segmento de 123pb del fragmento de inserción IS6110, presente en todas micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*.

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 51 µl por reacción en el termociclador (Flexigene, Techne / Mycicler, MJ Research). La mezcla por reacción contiene: 45µl correspondientes a PCR SuperMix (Invitrogen) compuesta por 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP, 22 U *Taq* ADN Polimerasa/ml recombinante con

estabilizadores; 1μ del primer IS1 (5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG 3') y 1μl del primer IS2 (5' CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3'), tanto para IS1 y Is2 se utiliza una concentración final de 200 nM y finalmente 4μl de ADN .

El proceso de amplificación consistió en una etapa de denaturación inicial de 95°C por 5 min, seguida por 40 ciclos de amplificación que incluyeron 2 min de denaturación a 94°C, 2 min de hibridación a 60°C y 2 min de extensión a 72°C, para terminar con una etapa de extensión final de 7 min a 72°C. Su duración total es de 4horas y 48 minutos (Leão et al., 2004)

Cuadro 2.3 Secuencia de los primers y longitud de los productos de ADN amplificados.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Longitud del producto (bp)</i>
IS1	5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG 3'	<i>hsp65</i>	123
IS2	5' CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3'	<i>hsp65</i>	123

Fuente: Leão et al, 2004

2.4.9. Amplificación del ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para Micobacterias atípicas.

El objetivo en este proceso es amplificar un segmento de 441pb del gen *hsp65*, presente en todas la especies del género *Mycobacterium*. Este producto de amplificación es esencial para la digestión enzimática, sin el cual no existen productos de digestión.

La PCR se llevará a cabo en un volumen total de 51 μl por reacción en el termociclador (Flexigene, Techne). La mezcla por reacción contendrá: 45μl correspondientes a PCR SuperMix (Invitrogen) que contiene: (22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP, 22 U *Taq* ADN Polimerasa/ml recombinante con estabilizadores); 1μ del

primer Tb11 (5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3') y 1µl del primer Tb12 (5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'), tanto para Tb11 como Tb12 se utiliza una concentración final de 200 nM y finalmente 4µl de ADN .

Cuadro 2.4 Secuencia de los primers, posiciones de alineamiento, y longitud de los productos de ADN amplificados.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Longitud del producto (bp)</i>
Tb11	5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3'	<i>hsp65</i>	441
Tb12	5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'	<i>hsp65</i>	441

Fuente: Telenti, 1992.

El proceso de amplificación consistió en una etapa de denaturación inicial de 95°C por 5 min, seguida por 45 ciclos de amplificación que incluyeron 1 min de denaturación a 94°C, 1 min de hibridación a 65°C y 1 min de extensión a 72°C, para terminar con una etapa de extensión final de 7 min a 72°C. Su duración total es de 2 horas y 28 minutos (Leão et al., 2004)

2.4.10. Análisis de Resultados de la PCR.

Para el análisis de los productos de PCR en función de su tamaño, tanto los fragmentos obtenidos utilizando primers IS1/IS2 como para Tb11/Tb12; se sometió a electroforesis a 5V/cm, utilizando una cámara (GelXLUltraV-2, Labnet), cuya área de corrida es de 13.5 cm, por lo tanto el voltaje total utilizado fue de 70V. Se utilizó Agarosa L.E (Promega), para la preparación de un gel al 1.6%, empleándose como Buffer TBE 5X a pH 8.2.

Cuadro 2.5 Componentes del Buffer TBE 5X

<i>Componente</i>	<i>Concentración</i>
Tris HCl	445mM
ácido bórico	445mM
EDTA	10 mM

Fuente: Leão et al., 2004

Previo al carga de la muestra, se mezcla 10 μ l de ADN obtenido por PCR con 2 μ l de buffer de carga tipo II, compuesto por azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v) y descrito como de tipo II por *Sambrook, et al., 1989*.

Para su visualización se realizara una tinción con 4 μ l de Sybr® Safe, cargado directamente al gel. Los productos se visualizaron a través de un Safe ImageMNT (Invitrogen), de luz azul. Fueron fotografiado (Cyber-shot DSC-S700, Sony) para facilitar y evidenciar el análisis.

El tamaño de los productos de amplificación de micobacterias, se obtuvieron comparando fragmentos de ADN de tamaño conocido, gracias al empleo de marcadores moleculares. Como marcador de peso molecular se utilizó: TrackIt™ 100bp DNA Ladder, Invitrogen.

Se verificó, un control positivo y un blanco, por cada gel realizado.

2.4.11. Digestión de las enzimas de restricción.

Con los resultados emitidos de las dos amplificaciones, se seleccionan las muestras que tuvieron productos amplificables de 441bp cuyo producto de PCR será digerido separadamente con las enzimas de restricción BstE II y HAE III.

Los productos que obtuvieron una amplificación de 123bp, tienen como objetivo discretizar las micobacterias atípicas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, más no intervienen en la digestión enzimática.

Las reacciones enzimáticas de BstE II y HAE III se llevan acabo en dos áreas separadas (PRE Y POST- PCR), con el objeto de evitar contaminación por amplicones durante todo el proceso y en el área de PRE- PCR del Laboratorio de

Diagnóstico Molecular.

En el área de Pre-PCR, se realizó la preparación del cóctel enzimático y el proceso de incubación.

Para el cóctel enzimático se utilizaron tubos eppendorff de 1ml con la finalidad de obtener una menor superficie para aumentar la concentración de intercambio de calor en el proceso de incubación.

El cóctel enzimático contiene un volumen de 10 μ l para cada enzima (Leão et al., 2004). Para BstEII se empleó 2.5 μ l de buffer BstE II, 0.5 μ l de BstE II, 0.5 μ l de suero fetal bovino y 6.5 μ l de agua grado biología molecular. Para HAE III se empleó 2.5 μ l de buffer HAE III, 0.5 μ l de HAE III, 0.5 μ l de suero fetal bovino y 6.5 μ l de agua grado biología molecular (De Waard, 2006).

El área de Post-PCR se encuentra apartada totalmente del área de Pre-PCR, en esta área se coloca 15 μ l del producto de amplificación de PCR (441bp) al cóctel enzimático que fue anteriormente preparado en Pre-PCR, evitando de esta manera una certera contaminación con amplicones en la cabina de Pre- PCR, utilizada además para extracción de ADN de otros proyectos del laboratorio.

El volumen total de la reacción enzimática es de 25 μ l para cada enzima, dicho volumen es sometido a incubación. Para BstEII se utilizó la incubadora (FANEM modelo 002CB) y se sometió a una temperatura de 60°C y para HAE III se utilizó la incubadora (FISHER Scientific Isotemp) a 37°C.

El proceso de digestión se llevó a cabo durante 3 horas, respectivamente.

2.4.12. Análisis de fragmentos de restricción.

Los patrones de restricción, productos de la digestión enzimática, fueron analizados por electroforesis (GelXLUltraV-2, Labnet), a 70V por 190 min.

Se utilizó Agarosa L.E (Promega), para la preparación de un gel al 3%, empleándose como Buffer TBE 0.5X a pH 8.2. Se coloca 8 μ l de Sybr® Safe directamente en el gel.

Previo al carga de la muestra, se mezcla 10 μ l de los productos digeridos con 2 μ l de buffer de carga tipo II. En los pocillos inicial y final, se coloca 6 μ l de marcador de peso molecular: TrackIt™ 50pb, con la finalidad de linealizar y analizar los productos de restricción.

En todos los pocillos disponibles se procede a cargar los productos de digestión atendiendo a la regla de los algoritmos, siempre se cargará el producto digerido por BstEII y a continuación HAE III, del mismo paciente.

Los patrones se visualizaron a través de un Safe ImageMNT (Invitrogen), de luz azul. Fueron fotografiado (Cyber-shot DSC-S700, Sony) para facilitar y evidenciar el análisis.

Los fragmentos de restricción son analizados atendiendo la variación de distancia electroforética, comparados con un marcador estándar de peso molecular conocido. Cabe destacar que para evitar confusiones con los fragmentos que producen primer dimer, se omiten los fragmentos restrictivos menores o iguales a 50bp.

Los resultados obtenidos fueron analizados, conjuntamente con métodos morfológicos (velocidad de crecimiento y pigmentación), comparándolos e interpretándolos por algoritmos conocidos como el de Telenti, Brunillo y Devallos. Además se cuenta con un programa computacional que presenta un banco de datos de patrones restrictivos para más de 96 especies de micobacterias. Su nombre es PRASITE disponible en la página web. app.chuv.ch/Prasite.

2.5. Análisis de Datos

La base del estudio se enfocó en la implementación y optimización de la técnica molecular PCR Restriction Enzyme Análisis. El estudio no se enfocó en proporcionar un análisis bioestadístico, debido a que la muestra es pequeña, se cuenta tan solo con 29 aislados clínicos, que se obtuvieron en el sector privado (Hospital Vozandes, Quito, Ecuador). La diferencia entre el número de muestras de esta investigación versus los aislados clínicos que se obtienen en el sector público (Ministerio de Salud del Ecuador) tiene un rango amplio en magnitud, debido a que el estado controla más del 90% de los casos de tuberculosis y micobacteriosis a nivel

nacional por el manejo del programa DOTS. Por ende este estudio no puede destacar resultados de especificidad o sensibilidad de la técnica por la desventaja del tamaño de muestra, pero no por ello se puede negar resultados relevantes que conllevaron una investigación descriptiva experimental y análisis sintético. Este método de investigación fue aplicado durante toda la fase de experimentación.

El proceso de análisis sintético, se realizó mediante la interpretación de patrones de restricción generados por BstEII y HAE III. Dichos patrones se compararon con el banco de datos que establece el PRASITE⁶, además de algoritmos establecidos por Telenti et al., 1993 (ANEXO C) y Brunello et al., 2001. (ANEXO D).

Los resultados obtenidos se describieron como una comparación cualitativa entre los métodos tradicionales versus los métodos moleculares, específicamente se comparó el diagnóstico de especie emitido por las baterías bioquímicas y morfológicas del cultivo, versus los patrones generados por el polimorfismo del gen *hsp65* empleando la técnica molecular PCR Restriction Enzyme Analysis.

⁶ Programa computacional creado para automatizar el análisis de especies micobacterianas, a través de patrones específicos generados por las enzimas BstEII y HAE III; el programa fue creado por el Instituto Pasteur de Paris, Francia y posee algoritmos específicos disponibles en la página de Internet (<http://www.app.chuv.ch/PRAsite>)

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Aislados clínicos involucrados en el estudio

Entre Octubre del 2003 y Julio del 2008, en el Hospital Vozandes Quito, Ecuador, se aislaron 29 cepas clínicas, siendo el 2006, el año de mayor número de aislamientos clínicos.

Tabla 3.1 Aislados clínicos participantes en el estudio

<i>Año</i>	<i>Número de aislamientos clínicos</i>
2003	2
2004	4
2005	2
2006	14
2007	3
2008	4
Total	29

3.2. Optimización de la técnica molecular PRA

La técnica molecular PCR- Restriction Enzyme Analysis PRA, incluye 3 procesos determinantes para la obtención de resultados óptimos: extracción de ADN, amplificación del gen *hsp65* y digestión enzimática.

Los 3 procesos fueron optimizados atendiendo la disponibilidad de costo-beneficio y eficiencia de tiempo, en comparación con el protocolo base del “*Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycoacteria*” (Leão et al., 2004). Los protocolos optimizados para: extracción de ADN genómico, proceso de amplificación del gen *hsp65*, proceso de amplificación para IS6110 y digestión enzimática se describen detalladamente en el capítulo 2.

3.2.1. Optimización de parámetros en el proceso de extracción de ADN micobacteriano

Para la optimización del protocolo de extracción de ADN genómico, se combinaron dos protocolos diferentes pero publicados bajo la misma autoría, Leão et al., 2004; más la adición del protocolo descrito por el Laboratorio de Tuberculosis del Centro de Biomedicina de Caracas, Venezuela; publicado por Jacobus de Waard, 2006.

La inactivación de las bacterias se desarrolló bajo las condiciones de temperatura y tiempo, establecidas por De Waard, y en base a los protocolos publicados por Leão et al., se adoptó TET como buffer de resuspensión además de la recomendación para la ruptura de la pared celular mediante ciclos de congelación y ebullición.

3.2.1.1. Cuantificación de ADN

Las 36 muestras de ADN (29 aislados clínicos + 5 controles ATCC + 2 cepas *M. bovis*); medidas por espectrofotometría presentaron un valor mínimo de 1.18 y el máximo de 2.06. Del total de muestras, 31 presentaron valores mayores o iguales a 1.5, número que denota buena calidad de ADN en la muestra y 5 aislados clínicos presentan valores menores a 1,5.

Al evaluar los valores de calidad y cantidad de ADN establecidos en el Anexo F, se determina que la optimización en el proceso de extracción de ADN fue exitosa.

3.2.2. Optimización de parámetros de PCR en el proceso de amplificación del gen *hsp 65* y amplificación de la secuencia de inserción IS6110.

La optimización de los parámetros de PCR se realizó en base al protocolo sugerido por el fabricante de PCR SuperMix (Invitrogen). El programa de amplificación para el gen *hsp65* fue descrito inicialmente por Telenti, 1992. Leão et al., utiliza el mismo número de ciclos de amplificación, pero varía en un parámetro, incrementa una denaturalización inicial de 95°C por 5min para mejorar el proceso de amplificación, razón por la cual adoptamos dicha añadidura en el programa de amplificación para nuestro estudio.

En cuanto al programa de amplificación para la secuencia de inserción IS6110, no se realizó ninguna variación en el programa sugerido por Leão et al.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa que amplificó fragmentos específicos del gen *hsp65* fue efectuada con los primers Tb11 y Tb12, obteniendo un producto de amplificación de 441bp, el mismo que fue amplificado en todas las cepas estudiadas.

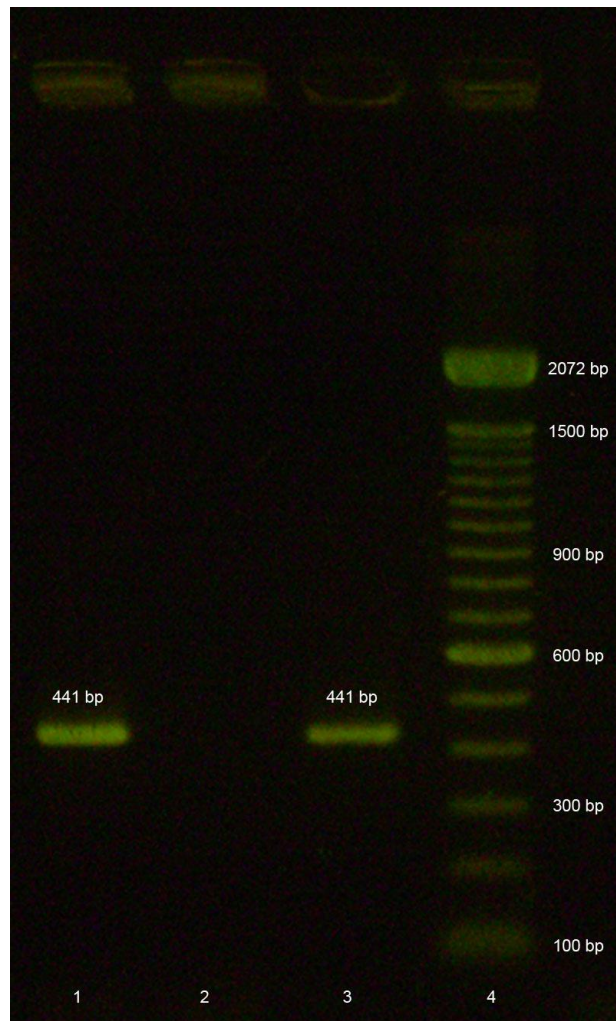


Figura 3.1 Amplificación del gen *hsp 65*

Pocillo 1: producto de amplificación del control positivo (*M. avium* ATCC 25291) del gen *hsp65*. Primers Tb11 y Tb12; **Pocillo 2:** producto de amplificación del control negativo (agua) del gen *hsp 65*. Primers Tb11 y Tb12; **Pocillo 3:** producto de amplificación del gen *hsp65* del aislados clínicos 580 que presenta micobacteriosis; **Pocillo 4:** Marcador molecular de 100-1500pb (Invitrogen).

La segunda técnica, en base a la reacción en cadena de la polimerasa que amplificó fragmentos específicos de la secuencia de inserción IS6110, fue realizada con los primers IS1 y IS2, obteniendo un producto de amplificación de 123pb, dicho producto fue amplificado en todas las cepas pertenecientes a *Mycobacterium tuberculosis* complex.

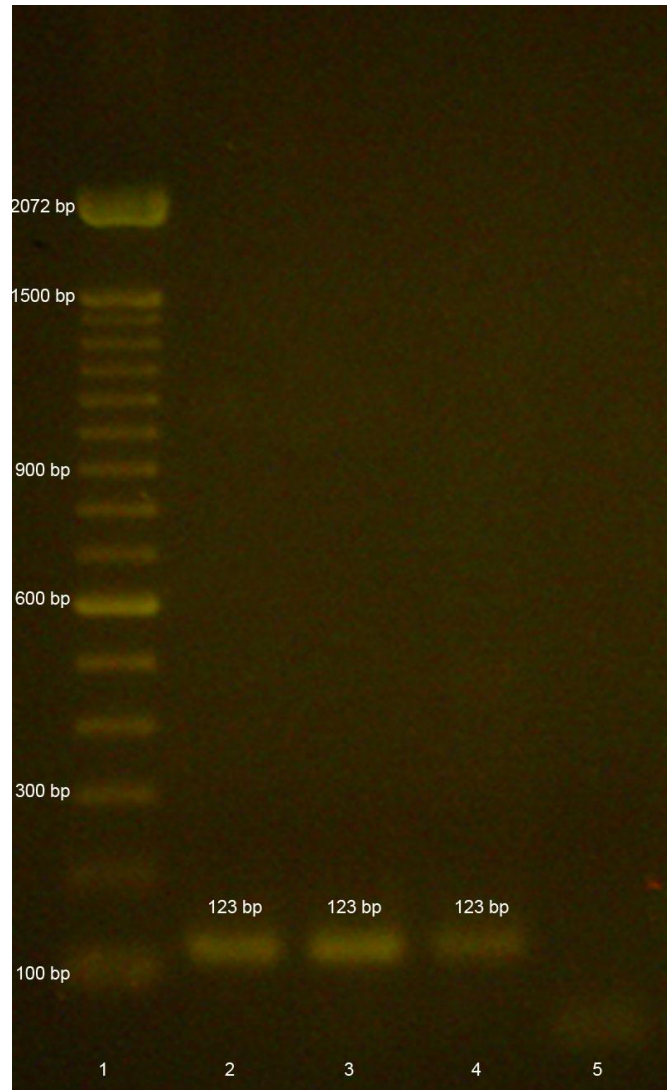


Figura 3.2 Amplificación de la Secuencia de Inserción IS6110

Pocillo 1: Marcador molecular de 100-1500pb (Invitrogen), **Pocillo 2:** producto de amplificación de la secuencia de inserción IS6110. Control positivo (*M. tuberculosis* ATCC 27294) Primers IS1 e IS2; **Pocillo 3:** producto de amplificación de la secuencia de inserción IS6110. Control positivo (*M. bovis*), Primers IS1 e IS2; **Pocillo 4:** producto de amplificación de la secuencia de inserción IS6110. Aislado clínico 576 Primers IS1 Y IS2; **Pocillo 5:** producto de amplificación del control negativo (*M. kansasii* tipo 1 ATCC 12478).

3.2.3. Optimización de parámetros de PCR en el proceso de digestión enzimática.

La optimización del proceso de digestión enzimática consistió en utilizar la mitad de la cantidad (0.5µl) de cada enzima, más 0.5 µl de Suero fetal bovino; coadyuvante de la reacción. A diferencia del protocolo propuesto por Leão et al., el cual utiliza en el proceso digestivo 1µl de BstEII y 1 µl de HAE III; y no utiliza suero fetal bovino. Se comprobó que la eficiencia de la reacción es la misma en los 2 casos, como lo podemos visualizar en la Figura 3.3.

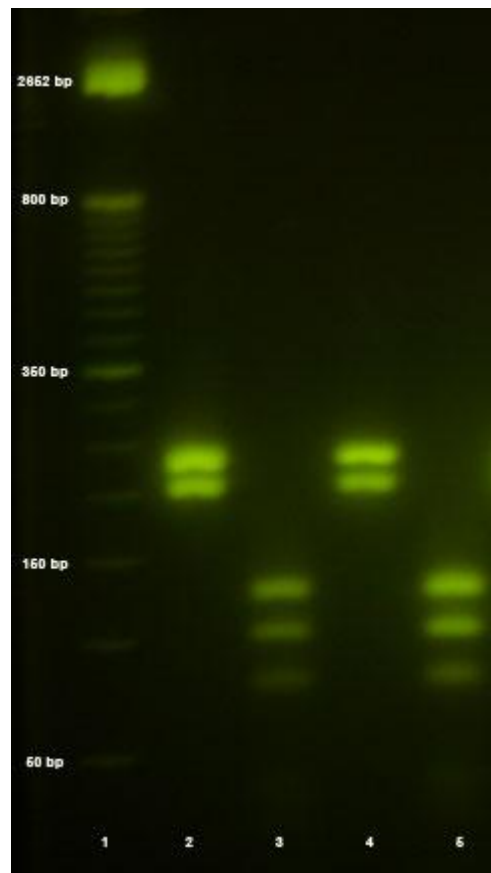


Figura 3.3 Patrones de restricción de *M. kansasii* ATCC 12478

Pocillo 1: Marcador molecular de 50pb -800pb (Invitrogen), **Pocillo 2:** Digestión enzimática utilizando 1µl de BstE II para *M. kansasii* ATCC 12478; **Pocillo 3:** Digestión enzimática utilizando 1µl de HAE III para *M. kansasii* ATCC 12478; **Pocillo 4:** Digestión enzimática utilizando 05µl de BstE II para *M. kansasii* ATCC 12478 **Pocillo 5:** Digestión enzimática utilizando 0.5µl de HAE II para *M. kansasii* ATCC 12478

3.3. Identificación de cepas controles ATCC por medio de la técnica de diagnóstico molecular PCR Restriction Enzyme Analysis (PRA)

Para comprobar la correcta adopción de la técnica de diagnóstico molecular PRA, se contó con 4 controles MNT y 1 control perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Los 5 controles ATCC amplificaron un fragmento de 441pb del gen *hsp65*, producto de amplificación que fue digerido separadamente con las enzimas de restricción empleadas en PRA, BstEII y HAE III, generándose los siguientes fragmentos.

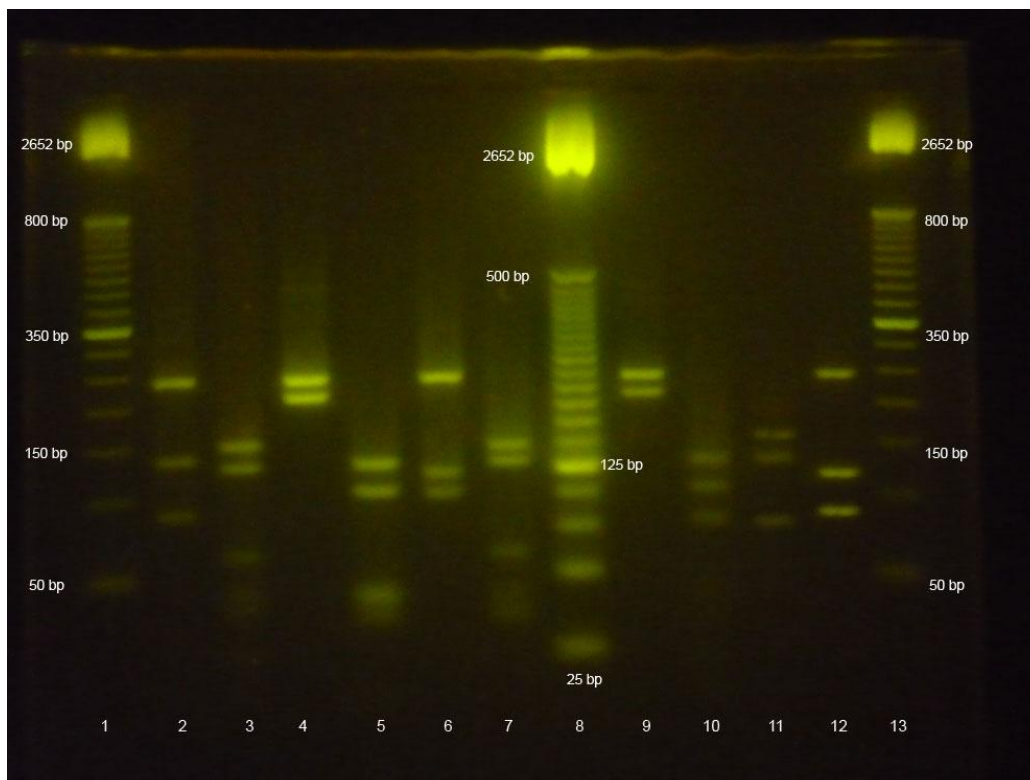


Figura 3.4 Identificación de los fragmentos de restricción de cepas ATCC

Pocillo 1 y 13: Marcador molecular de 50pb-800bp (Invitrogen), **Pocillo 2:** Digestión enzimática BstE II para *M.smegmatis* ATCC 35796; **Pocillo 3:** Digestión enzimática HAE III para *M.smegmatis* ATCC 35796; **Pocillo 4:** Digestión enzimática utilizando BstE II para *M. avium s. avium tipo 1* ATCC 25291; **Pocillo 5:** Digestión enzimática HAE II para *M. avium s. avium tipo 1* ATCC 25291; **Pocillo 6:** Digestión enzimática BstE II para *M. intracellulare tipo 1* ATCC 13950 **Pocillo 7:** Digestión enzimática HAE III para *M. intracellulare tipo 1* ATCC 13950; **Pocillo 8:** Marcador

molecular de 25pb-500bp (Invitrogen); **Pocillo9:** Digestión enzimática utilizando BstE II para *M. kansasii* ATCC 12478; **Pocillo 10:** Digestión enzimática HAE II para *M. kansasii* ATCC 12478; **Pocillo11:** Digestión enzimática HAE II para *M. tuberculosis complex tipo 1* ATCC 27294; **Pocillo 12:** Digestión enzimática utilizando BstE II para *M. tuberculosis complex tipo 1* ATCC 27294.

Por medio del proceso de análisis de los fragmentos de restricción de PRA se estableció que los fragmentos generados por la digestión de BstEII y HAEIII tuvieron un tamaño entre 235bp a 60bp.

Se puede afirmar que los fragmentos restrictivos visualizados en la Figura 3.3 son los correctos, porque al comparar y analizar los patrones de restricción de BstEII y HAE III, realizados en el presente estudio, respecto a los perfiles de restricción del banco de datos que emite el programa computacional PRASITE, se evidencian resultados idénticos, comprobándose que la codificación de cepas ATCC, efectivamente corresponde en género, especie, sub especie y tipo a la cepa conocida con anterioridad.

Tabla 3.2 Identificación de controles ATCC por PRA

CONTROL	ATCC	PRA
<i>M. avium s. avium tipo 1</i>	ATCC 25291	BstE II: 235 / 210 / 0
		HAE III: 130 / 105 / 0 / 0
<i>M. intracellulare tipo 1</i>	ATCC 13950	BstE II: 235 / 120 / 100
		HAE III: 145 / 130 / 60 / 0
<i>M. smegmatis tipo 1</i>	ATCC 35796 ATCC 19420	BstE II: 235 / 130 / 85
		HAE III: 145 / 125 / 60 / 0
<i>M. kansasii tipo 1</i>	ATCC 12478	BstE II: 235 / 210 / 0
		HAE III: 130 / 105 / 80 / 0
<i>M. tuberculosis complex tipo 1</i>	ATCC 27294	BstE II: 235/120/85
		HAE III: 150/130/70/0

3.4. Identificación de cepas clínicas de Micobacterias no tuberculosas (MNT), provenientes del HVQ, mediante la técnica de diagnóstico molecular PCR Restriction Enzyme Analysis (PRA)

De los 29 aislados clínicos analizados por PRA se determinó: 27 cepas de micobacterias atípicas, 1 cepa de *Mycobacterium tuberculosis* complex y 1 aislado clínico no fue identificado como ninguna especie de micobacteria, sea esta típica o atípica y gracias al poder discriminativo de PRA, se evidenció que tampoco el aislado clínico se puede caracterizar como especie perteneciente a la Familia Nocardiae.

De las 27 cepas de micobacterias atípicas se determinó 14 especies del género *Mycobacterium*, cada una con su respectivo tipo (Tabla 3.3). Cabe destacar que dentro de las 27 cepas clínicas, se determinaron 2 especies que poseen patrones no identificables, según los perfiles del Praside.

Tabla 3.3 Identificación por medio de PRA de especies del género *Mycobacterium*, con sus respectivos tipos. Provenientes de aislados clínicos del HVQ.

Especie y tipo de micobacteria atípica	Número de aislados clínicos	Código de la cepa HVQ
<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 5	1	406
<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1	4	609
		543
		694
		563
<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1	2	291
		506
<i>Mycobacterium genavense</i> tipo 2	1	510
<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 1	1	408
<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 3	1	519
<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1	4	580
		620
		532

		3205
<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2	2	3262 3348
<i>Mycobacterium flavescens</i> tipo 1	1	501
<i>Mycobacterium ulcerans</i> tipo 1	1	213
<i>Mycobacterium peregrinum</i> tipo 1	1	2852
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> tipo 2	2	663 565
<i>Mycobacterium mucogenicum</i> tipo 2	1	523
<i>Mycobacterium hodleri</i> tipo 1	1	555
<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 4	1	622
<i>Mycobacterium malmoense</i> tipo 1	1	513
No hay patrón posiblemente contaminado	1	223
No identificado	1	386

El aislado clínico número 576, designado según la codificación del HVQ, fue previamente diagnosticado como micobacteria atípica de acuerdo a los métodos clásicos. Sin embargo, la evaluación de esta cepa mediante PRA determinó que no era una micobacteria atípica, debido a que los resultados obtenidos por análisis de patrones de restricción mostraban la presencia de una cepa del *Mycobacterium tuberculosis* complex. Para la confirmación se realizó la amplificación de la secuencia de inserción IS 6110, obteniendo un producto de amplificación de 123 pares de bases, afirmando así que se trata de *Mycobacterium tuberculosis* complex tipo 1.

Tabla 3.4 Identificación por medio de PRA del aislado clínico 576.

Identificación por PRA	Número de aislados clínicos	Código de la cepa HVQ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex tipo 1	1	576

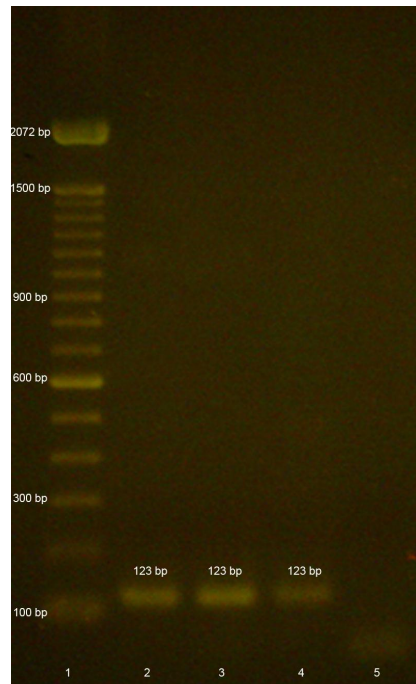


Figura 3.5 Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* complex tipo 1.
Aislado clínico 576

Pocillo 1: Marcador molecular de 100-1500 (Invitrogen), **Pocillo 2:** producto de amplificación de la secuencia de inserción IS6110. Control positivo (*M. tuberculosis* ATCC 27294) Primers IS1 y IS2; **Pocillo 3:** producto de amplificación de la secuencia de inserción IS6110. Control positivo (*M. bovis*), Primers IS1 y IS2; **Pocillo 4:** producto de amplificación de la secuencia de inserción IS6110. Aislado clínico 576 Primers IS1 Y IS2; **Pocillo 5:** producto de amplificación del control negativo (*M. kansasii* tipo 1 ATCC 12478).

El aislado clínico número 3344 fue diagnosticado por métodos tradicionales como una posible especie de nocardia o micobacteria atípica. Este diagnóstico no fue confirmado a través del método molecular PRA, método que caracterizó a la cepa clínica como especie no perteneciente al género *Mycobacterium*, debido a que no amplificó el fragmento de 441bp que evidencia la presencia del gen *hsp65*, el mismo que está presente en todas las micobacterias y en nocardia spp.

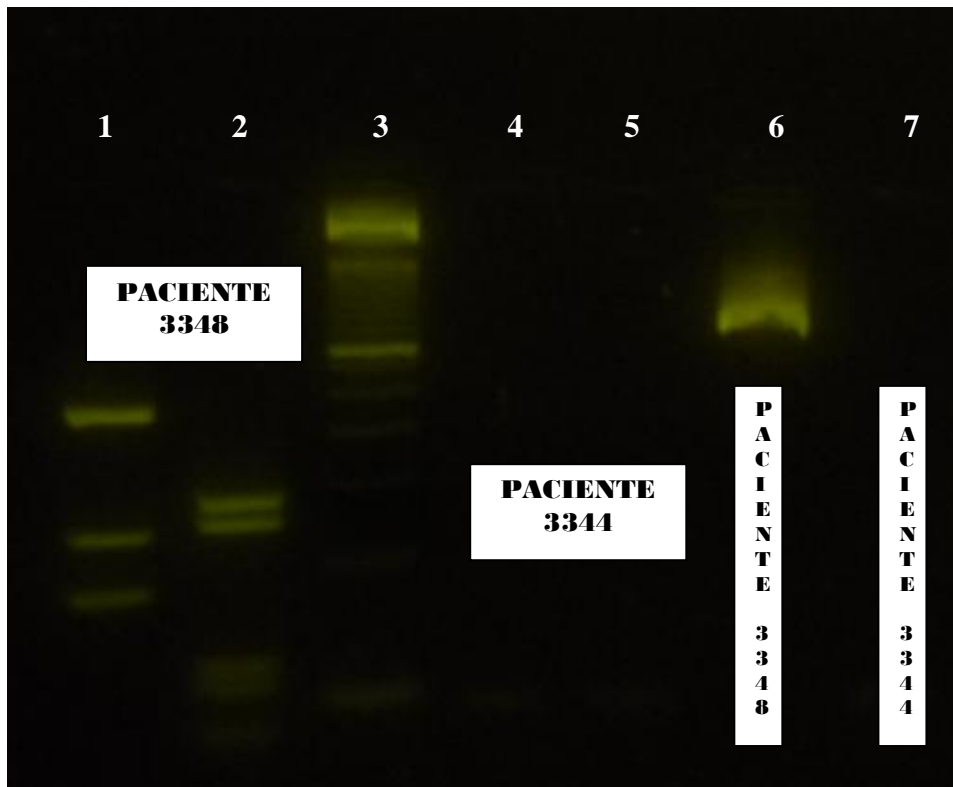


Figura 3.6 Identificación de especie no perteneciente a la familia Mycobacteriaceae ni Nocardiaceae. Aislado clínico 3344

3.5. Comparación cualitativa del método molecular PRA con los métodos tradicionales para la identificación de las cepas clínicas.

Los diagnósticos fueron realizados a través de métodos clásicos como pruebas bioquímicas y morfología de cultivo realizadas en el Laboratorio de Tuberculosis del Hospital Vozandes Quito. Los resultados de dichas pruebas revelaron que los 29 aislados clínicos eran micobacterias atípicas.

Los métodos tradicionales discreparon en un 6.89% con la técnica molecular PRA en relación a la detección de MNT (Tabla 3.5). Evidenciándose una correcta discretización en la detección de micobacterias no tuberculosas por PRA.

Tabla 3.5 Relación de detección de MNT mediante diagnóstico clásico y molecular

Tipo	Diagnóstico	
	Clásico n (%)	Molecular (PRA) n (%)
MNT Negativo	0/29 (0%)	2/29 (6.89%)
MNT Positivo	29/29 (100%)	27/29 (93.10%)

Además, los métodos tradicionales discreparon en un 72.42% con la técnica molecular PRA en relación a la identificación específica de género, especie, subespecie y tipo de cepas clínicas atípicas, debido a que solo 8 (27.58%) de las cepas clínicas coincidieron en el diagnóstico tradicional con el molecular.

Tabla 3.6 Cepas que mostraron concordancia diagnóstica, evaluadas por métodos tradicionales y métodos moleculares (PRA).

AISLADO CLÍNICO	MÉTODOS TRADICIONALES	PRA
694	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1
3205	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
532	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
3348	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2
213	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i> tipo 1
663	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> tipo 2
506	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1
622	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 4

En 21 (72,41%) de las muestras clínicas no hubo concordancia entre los resultados obtenidos por las pruebas clásicas y el análisis de los patrones de restricción. Dicha afirmación se evidencia al observar los patrones de restricción que no coinciden con el diagnóstico emitido por métodos tradicionales, casos que son evaluados en el capítulo 4.

Tabla 3.7 Cepas que mostraron discordancia diagnóstica entre métodos tradicionales y métodos moleculares (PRA).

AISLADO CLÍNICO	MÉTODOS TRADICIONALES	PRA
406*	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 5
609	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1
291	<i>Mycobacterium haemophilum</i> u otras de crecimiento rápido	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1
510	<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>Mycobacterium genavense</i>
408*	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 1
543	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1
576	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex tipo 1
580	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
501	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Mycobacterium flavescens</i>
565	<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> tipo 2
513	<i>Mycobacterium chelonae</i> o <i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i> tipo 1
563	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1
2852	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium peregrinum</i> tipo 1
519	<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 3
620	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
3262	<i>Mycobacterium abscessus</i> . Reactivo caducado	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2
3344	<i>Nocardia</i>	No es MNT
223	Complejo <i>avium</i> - <i>intracellulare</i>	No hay patrón posiblemente contaminado
523	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> tipo 2
555	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium hodleri</i> tipo 1
386	Complejo <i>avium</i> - <i>intracellulare</i>	No identificable

3.6. Sensibilidad, valores predictivos e índice de desempeño de la técnica molecular PCR restriction enzyme analysis (PRA)

Al comparar la técnica de diagnóstico molecular PCR Restriction Enzyme Analysis (PRA) con el diagnóstico clásico (morfología y pruebas bioquímicas) en relación a la detección de MNT se encontró una sensibilidad del 100%, especificidad de 93.10%, valor predictivo positivo de 93.5% y valor predictivo negativo de 100%.

Tabla 3.8 Relación de detección de MNT entre el diagnóstico molecular y el diagnóstico clásico

<i>Detección de Métodos clásicos</i>	<i>Detección de Método Molecular</i>		<i>TOTAL</i>
	<i>Positivo</i>	Negativo	
Positivo	29	2	31
Negativo	0	27	27
TOTAL	29	29	58

Tabla 3.9 Porcentaje de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del diagnóstico molecular por PRA para la detección de MNT, en comparación con los métodos tradicionales

<i>PCR restriction enzyme analysis (PRA)</i>	
Sensibilidad	100 %
Especificidad	93.10 %
Valor predictivo positivo	93.5 %
Valor predictivo negativo	100 %

3.7. Comparación cualitativa de especies entre métodos tradicionales y métodos moleculares (PRA).

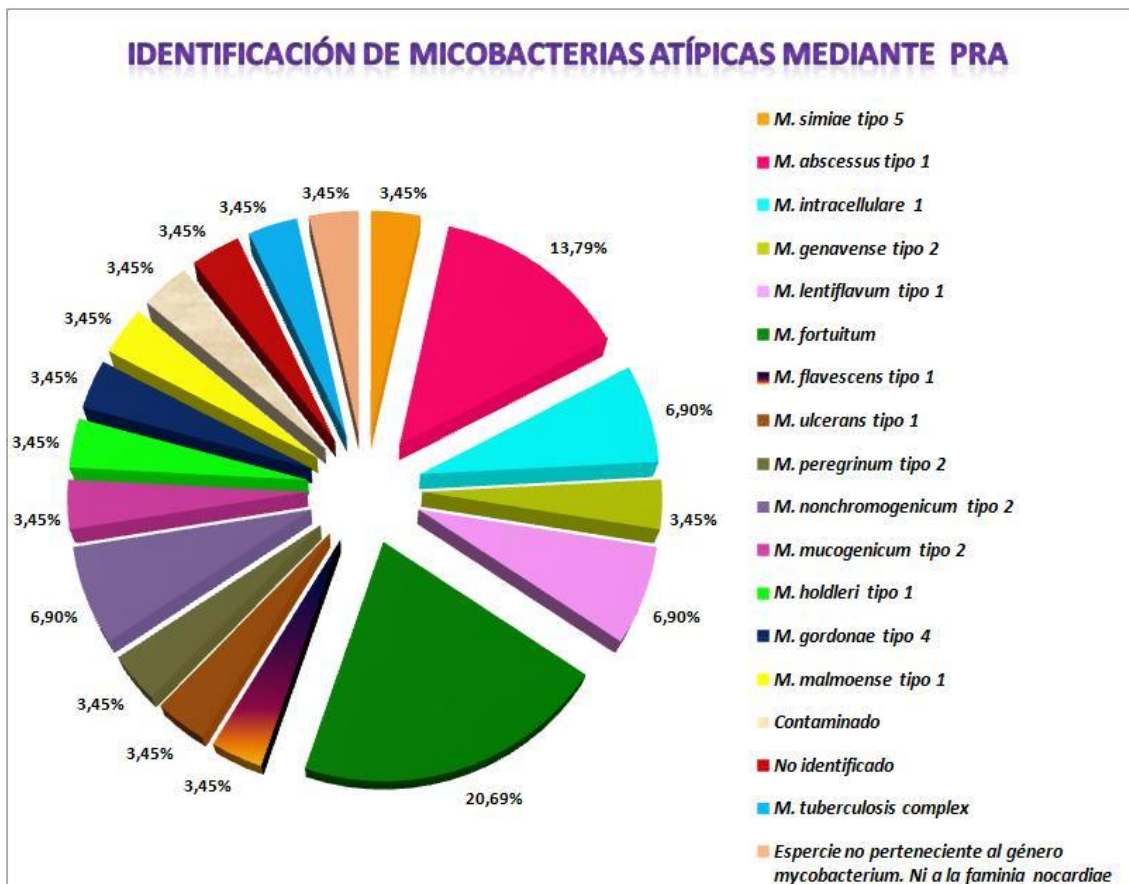


Figura 3.7. Identificación de Micobacterias atípicas mediante la técnica molecular PRA.

De las 27 cepas atípicas se determinó 14 especies del género *Mycobacterium* mediante PRA, mientras que, los métodos tradicionales determinaron 12 especies, entre ellas *M. avium complex* y *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. Kansasii* y *M. haemophilum* u otras de crecimiento rápido; especies que no fueron identificados por PRA.

El análisis polimórfico del gen *hsp65* determinó 8 especies que los métodos tradicionales no identificaron tal es el caso de: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. malmoense*, *M. hodleri*, *M. lentiflavum*, *M. genavense*, *M. flavescens* y *M. peregrinum*.

PRA, determinó que el 20.69% de los aislados clínicos corresponden a *M. fortuitum*, esto implica que de las 27 cepas atípicas, 6 aislados clínicos corresponden a

M. fortuitum, siendo ésta micobacteria la de mayor frecuencia en el estudio, coincidiendo con los datos epidemiológicos reportados en Latinoamérica.

La segunda especie aislada con mayor frecuencia por PRA es *M. abscessus* con el 13.79% de los aislados clínicos totales, representada por 4 aislados clínicos. Concordando de igual manera con los datos epidemiológicos reportados por laboratorios de referencia de micobacterias en Latinoamérica.

M. intracellulare, *M. lentiflavum* y *M. nonchromogenicum*, presentaron 2 aislados clínicos respectivamente, representando el 6.90% de los aislados totales, mientras que *M. simiae*, *M. genavense*, *M. flavescens*, *M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. hodleri*, *M. gordonae* y *M. malmoense*, presentaron el 3.45% de los aislados clínicos correspondiendo a 1 aislado clínico respectivamente.

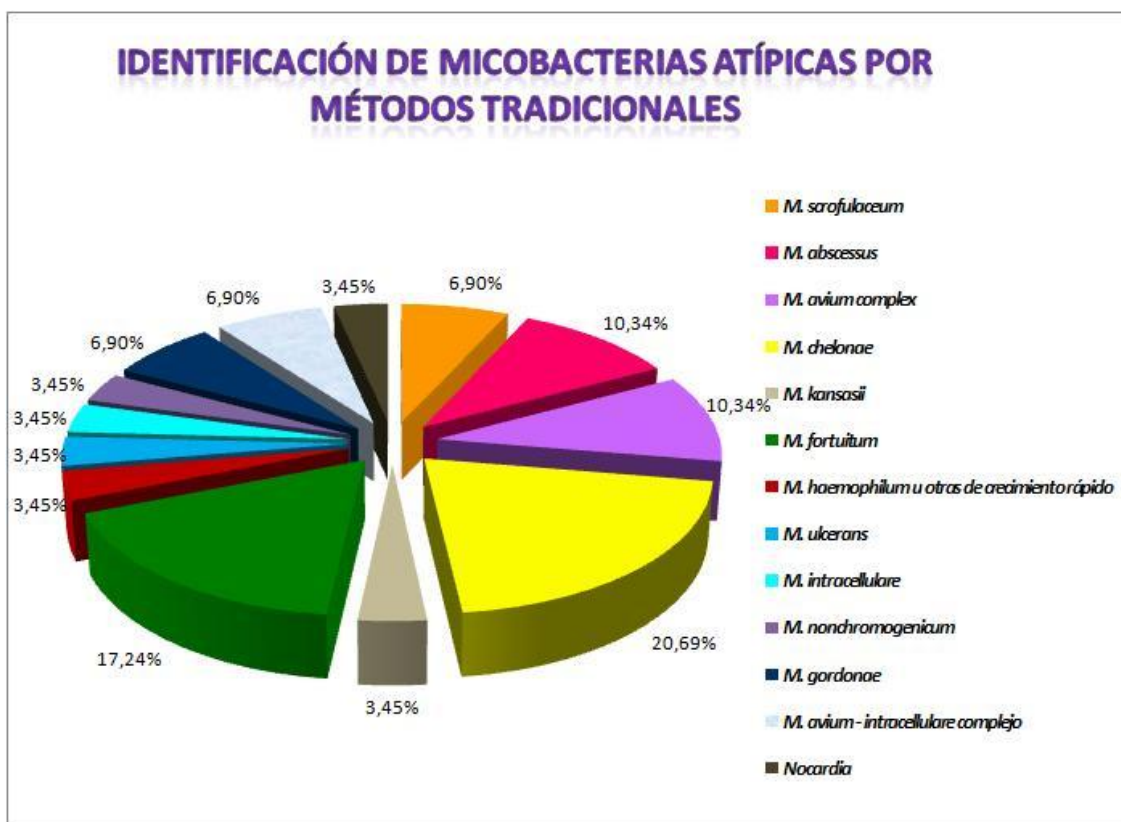


Figura 3.8. Identificación de Micobacterias atípicas mediante métodos tradicionales.

Según la caracterización que emitieron los métodos tradicionales, *M. chelonae* presenta la mayor frecuencia con el 20.69% del total de aislados clínicos, esto

representa 6 casos clínicos respectivamente, seguido de *M. fortuitum* que presenta 5 casos clínicos representados por el 17.24%. Las terceras cepas aisladas con mayor frecuencia por métodos tradicionales son *M. abscessus* y *M. avium complex* con 3 casos clínicos respectivamente, con un porcentaje correspondiente al 10.34%. Datos que no son confirmados en absoluto con PRA.

Los métodos tradicionales presentaron elevadas discrepancias en comparación con la identificación realizada por PRA. De las 12 especies identificadas, solo 6 especies fueron confirmadas por PRA, pero de éstas 6 especies el diagnóstico individualizado de los aislados clínicos determinados por pruebas bioquímicas y morfología de cultivo no concuerda con la frecuencia ni con su identificación real, en comparación con los resultados emitidos por PRA, como se observa en la tabla 3.7.

De las 6 especies concordantes entre los métodos tradicionales y PRA, que representan a 14 aislados clínicos, sólo 8 aislados clínicos concuerdan con el diagnóstico de PRA.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Discusión individualizada de casos clínicos

4.1.1. Aislado clínico 694

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium abscessus*. Los datos adicionales que reportaron las herramientas microbiológicas fueron: velocidad de crecimiento de la cepa y pigmentación. Para el presente caso la velocidad de crecimiento fue rápida; 4 días, debido a que la fecha de siembra de la cepa fue el 7 de abril del 2008, presentando evidencia de crecimiento el 11 de abril. (Anexo B). La característica de pigmentación fue: no pigmentada (Laboratorio de Tuberculosis. HVQ).

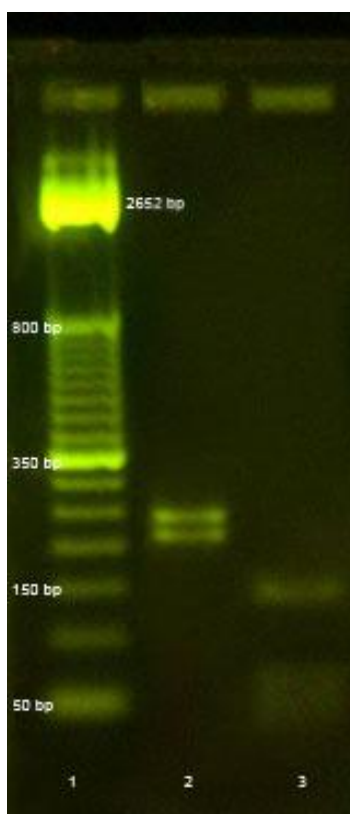


Figura 4.1 Digestión enzimática del aislado clínico 694.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Según el método molecular PRA, la cepa 694 generó patrones de restricción entre 245bp y 60bp. Los fragmentos de restricción generados por BstEII y HAE III caracterizan a una especie en particular, se trata de *Mycobacterium abscessus tipo 1*, caracterización que concuerda con las características fenotípicas de crecimiento y pigmentación emitidas por los métodos tradicionales.

Tabla 4.1 Identificación por PRA. Aislado clínico **694**.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
694 BstE II	245/220/0	235 / 210 / 0	<i>Mycobacterium abscessus tipo 1</i>
694 HAE III	150/70/60	145 / 70 / 60 / 55	

El margen de diferencia permitido de hasta 10bp (Devallos et al., 1997), al comparar los patrones obtenidos en el estudio versus el PRASITE y los algoritmos emitidos por Telenti et al., y Devallos et al., reflejan que la adopción y desarrollo de la técnica se realizó de forma correcta y concordante con los datos del banco de patrones restrictivos, PRASITE.

Adopté *Mycobacterium abscessus tipo 1* como la cepa que identifica al aislado clínico 694 porque el banco de datos del PRASITE, emitió como la cepa de *menor score* a *Mycobacterium abscessus tipo 1*, score que evidencia cual es el patrón modelo más cercano a la identificación correcta de la especie del género *Mycobacterium* (Chimara, 2008).

El score se establece por medio de la evaluación de la distancia Euclidiana, evaluación que es la base del programa computacional PRASITE, el cual permite la comparación de patrones de restricción del gen *hsp65* de cada Organismo en particular (PRASITE).

Esta comparación (longitud de los fragmentos visualizados en el gel de agarosa, realizados en le presente estudio vs. la longitud de los fragmentos que presenta el PRASITE es automatizada y dicha comparación evalúa sistemáticamente los patrones de similar o igual valor para la caracterización de la cepa a estudiarse. La totalidad de los patrones han sido evaluados y creados por el Instituto de Microbiología- CHUV (

Centro Hospitalario Universitario Baudios Laussane), Enfermedades Infecciosas–CHUV, Universidad Federal de Sao Paulo, Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Adolfo Lutz Instituto de Sao Paulo, Departamento de Micobacterias, Instituto Pasteur – Laboratorio de Referencia de Micobacterias, Centro Nacional Suizo de Micobacterias.

Es importante conocer que el score muestra la mínima pero importante distancia para la adopción del resultado. El PRASITE, cita 10 especies para la comparación de resultados, atendiendo a la diferencia de los scores; debido a que el poder de discriminación del PRASITE es elevado. Para el presente estudio se tomó en consideración para el análisis de resultados los 3 primeros scores, debido a que siendo una investigación pionera en el país, se estudiará más a fondo las posibles diversificaciones para la adopción de un resultado confiable; en comparación con la totalidad de los estudios, que en base a su experiencia diagnóstica, se enfocan en adoptar como único resultado el mínimo score (Arayala, 2006).

Cuadro 4.1 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 694.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
1	<i>Mycobacterium abscessus tipo 1</i>	235/210/0	145/70/60	15
130	<i>Mycobacterium phlei tipo 1</i>	235/210/0	140/80/60	20
12	<i>Mycobacterium austroafricanum tipo 1</i>	235/210/0	160/60/50	22

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

La diferencia del primer score perteneciente a *Mycobacterium abscessus tipo 1* en comparación con el segundo score perteneciente a *Mycobacterium phlei tipo 1* fue de 5 puntos, distancia que la consideramos relativamente elevada para no compatibilizar las 2 especies que diferencian además en su fenotipo. *Mycobacterium phlei tipo 1* es de crecimiento rápido y escotocromógeno, mientras que *Mycobacterium abscessus tipo 1* presenta crecimiento rápido pero en cuanto a su característica de pigmentación es: No pigmentada. Entonces adoptamos de forma segura y precisa el score 15, *Mycobacterium abscessus tipo 1*, que concuerda con las características fenotípicas emitidas por los métodos tradicionales realizados por el HVQ.

La caracterización de la cepa 694 fue concordante en los 2 métodos, tanto PRA como los métodos tradicionales la identificaron en género y especie, pero gracias a la sensibilidad y especificidad del método molecular, se puede determinar hasta el tipo de especie que posee la cepa, para este caso en particular PRA establece a *Mycobacterium abscessus* tipo 1, mientras que los métodos tradicionales solo llegan hasta la caracterización de la especie. No pueden identificar su tipo ni la subespecie si la hay (Hafner, 2004).

4.1.2. Aislados clínicos : 532, 3348, 3205

Las herramientas microbiológicas estándares, caracterizaron los aislados clínicos 532, 3205 y 3348 como *Mycobacterium fortuitum*. Estas herramientas enunciaron: características de crecimiento rápido y colonias no pigmentadas para las 3 cepas respectivamente. (Anexo B)

Según el método molecular PRA, las cepas 532, 3348 y 3205 generaron patrones entre 245bp y 55bp en los 3 aislados clínicos, pero los patrones de restricción muestran una mínima diferencia de 5bp en uno de los fragmentos de HAE III, discretizando de esta manera el tipo 1 y el tipo 2 de la misma especie, *M. fortuitum tipo1* de *M. fortuitum tipo 2*.

El análisis de PRA determinó que la cepa 3348 es *M. fortuitum tipo 2*, mientras que las cepas 3205 y 532 son *M. fortuitum tipo 1*.

Tabla 4.2 Identificación por PRA. Aislados clínicos **532 y 3205**.

 AISLADO CLÍNICO	 IDENTIFICACIÓN PRA	 IDENTIFICACIÓN PRASITE	 CEPA IDENTIFICADA
532 , 3205 BstE II	245/120/85	235/120/85	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>
532, 3205 HAE III	150/120/60/55	145 / 120 / 60 / 55	

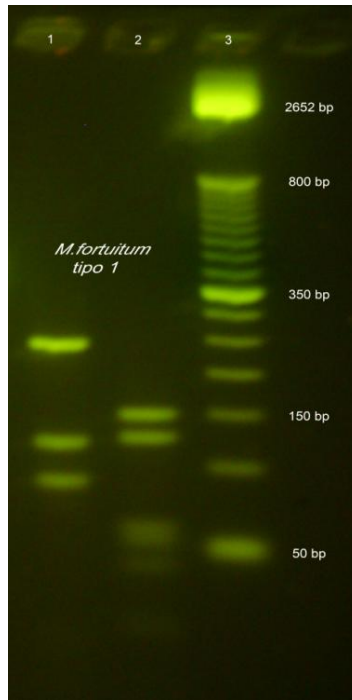


Figura 4.2 Digestión enzimática. Aislado clínico 532. *M. fortuitum tipo 1*.

Línea 1: Digestión enzimática con BstEII, Línea 2: Digestión enzimática con HaeIII. Línea 3: Marcador Molecular de 50bp a 800bp,

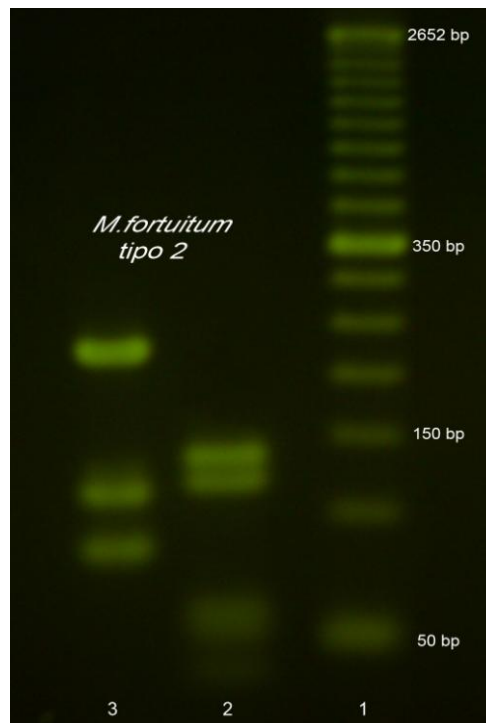


Figura 4.3 Digestión enzimática. Aislado clínico 3348. *M. fortuitum tipo 2*

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con HaeIII, Línea 3: Digestión enzimática con BstEII

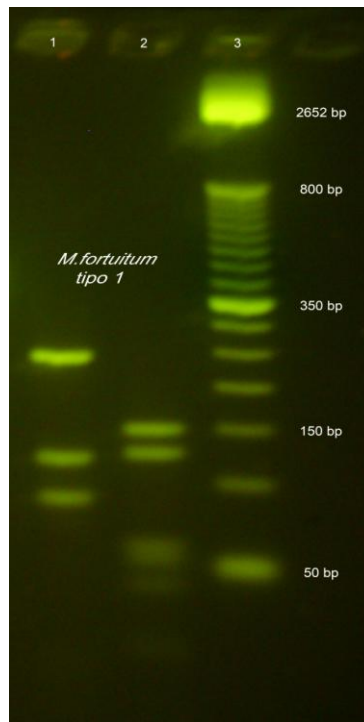


Figura 4.4 Digestión enzimática del aislado clínico 3205. *M. fortuitum* tipo 1.

Línea 1: Digestión enzimática con BstEII, Línea 2: Digestión enzimática con HAEIII, Línea 3: Marcador Molecular de 50bp a 800bp

Adopté *Mycobacterium fortuitum* tipo 1 para caracterizar a las cepas 532 y 3205, por ser la especie con mayor frecuencia epidemiológica en comparación con *Mycobacterium fortuitum* s. *acetamidolyticum* tipo 1, además que tomé en consideración su patogenicia. *Mycobacterium fortuitum* tipo 1 ha sido frecuentemente asociada a infecciones cutáneas, mientras que *Mycobacterium fortuitum* s. *acetamidolyticum* tipo 1, se caracteriza por causar infecciones pulmonares (Leão, 2004). Los aislados clínicos 532 y 3205, provinieron independientemente de un absceso de glúteo purulento, más no de expectoración; ratificando de esta manera el diagnóstico emitido por el menor score de PRA; *Mycobacterium fortuitum* tipo 1.

Cuadro 4.2 Diferentes scores que presenta el PRASITE para los aislados clínicos 532 y 3205.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
48	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1	235/120/85	145/120/60	11
51	<i>Mycobacterium fortuitum</i> s. <i>acetamidolyticum</i> tipo 1	235/120/85	145/120/60	11
49	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2	235/120/85	140/120/60	14

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Confirmamos que las cepas 532 y 3205, no son *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 porque al comparar las figuras 4.2 y 4.3; podemos visualizar de una forma clara que el primer fragmento de restricción (de mayor a menor bp), producido por la digestión de HAE III, para la cepa 3348 es inferior a 150bp, mientras que para *Mycobacterium fortuitum* tipo 1, el fragmento restrictivo se visualiza precisamente en 150bp.

A pesar de la afirmación realizada en cuanto a la apreciación visual que diferencia *Mycobacterium fortuitum* tipo 1 (cepas 532 y 3205) de *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 cepa 3348, empleamos el PRASITE para confirmar dicha apreciación. Ingresamos los valores de los fragmentos de restricción obtenidos en el estudio y analizamos las 3 especies de diferentes scores que presenta el programa.

Tabla 4.3 Identificación por PRA. Aislado clínico 3348.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
3348 BstE II	245/120/85	235/120/85	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2
3348 HAE III	140/120/60/55	140 / 120 / 60 / 55	

Cuadro 4.3 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 3348.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
49	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2	235/120/85	140/120/60	10
34	<i>Mycobacterium conceptionense</i> tipo 1	235/120/85	140/125/60	11
44	<i>Mycobacterium farcinogenes</i> tipo 1	235/120/85	140/125/60	11

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Adopté *M. fortuitum* tipo 2 como la cepa que identifica al aislado clínico 3348 porque el PRASITE, emitió a *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 como la cepa de menor score. *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 presenta un score de 10, mientras que *Mycobacterium conceptionense* tipo 1 y *Mycobacterium farcinogenes* tipo 1 presentan un score de 11. Que dos o más cepas de diferente especie presenten el mismo score

(idénticos patrones de restricción), se debe a la similitud genética entre especies, debido a que las micobacterias presentan un ADN repetitivo con una alta proporción de guanina y citosina (61% - 71%), motivo por el cual el análisis filogenético es tan estrecho (Chimara, 2008).

Descartamos que la cepa 3348 sea *Mycobacterium farcinogenes* tipo 1, porque su fenotipo no coincide con el fenotipo reportado por los métodos tradicionales, HVQ. El fenotipo de *Mycobacterium farcinogenes* tipo 1 es de crecimiento lento, mientras que el reporte microbiológico caracteriza la rapidez de crecimiento para los 3 aislados clínicos analizados.

El análisis radica en diferenciar entre *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 y *Mycobacterium conceptionense* tipo 1, los métodos microbiológicos no dan ninguna pauta adicional para diferenciarlas, porque las 2 especies presentan el mismo fenotipo, son de rápido crecimiento y no pigmentadas, características evidentes debido a que *Mycobacterium conceptionense* tipo 1, pertenece al grupo *Mycobacterium fortuitum*.

La denominación *Mycobacterium conceptionense* tipo 1, fue propuesta en el 2006, por ser una nueva especie que solamente es aislada de pacientes con osteítis postraumática (Adékambi, 2006).

Afirmamos que se trata de *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 primeramente porque uno de los patrones de restricción de HAE III presenta 120bp y no 125bp, además la patología de las muestras nos indican que fueron aisladas de abscesos externos localizados; más no, de biopsias de hueso; pero fundamentalmente adoptamos *Mycobacterium fortuitum* tipo 2 por presentar el score mínimo que muestra el diagnóstico certero de dichos aislados clínicos; siendo una de las especies mayormente aisladas en América Latina (Leão, 2004).

Finalmente destacamos que, en los 3 aislados clínicos, concuerda la identificación clásica y la identificación molecular, pero cabe destacar que el poder discriminativo de PRA, presenta un nivel mucho más elevado en comparación con los métodos tradicionales esto se debe a que el pilar base de PRA, es el análisis polimórfico del gen *hsp65*, por tal razón PRA especifica el tipo, subespecie, especie y género; mientras esto no ocurre con los métodos tradicionales cuya identificación solo presenta

resultados en base a especie y género y en ocasiones no logra identificar el Organismo correcto debido a la cercanía filogenética de las especies que no puede ser determinada por la sensibilidad de las pruebas bioquímicas (Chimara, 2008).

Las especies aisladas con mayor frecuencia y por ende las más comunes encontradas a nivel mundial son *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium chelonae*. En el presente estudio *Mycobacterium fortuitum* es la especie que tiene el mayor número de aislamientos, concordando nuestros resultados con los datos emitidos a nivel mundial (Tortoli, 2003).

4.1.3. Aislado clínico 213

Las herramientas estándares microbiológicas caracterizaron el aislado clínico 213 como *Mycobacterium ulcerans*. Estas herramientas emitieron características de crecimiento lento y colonias no pigmentadas. (Anexo B)

Según el método molecular PRA, la cepa 213 generó patrones entre 240bp y 80p cuyo análisis determinó que la cepa es *Mycobacterium ulcerans tipo 1*.

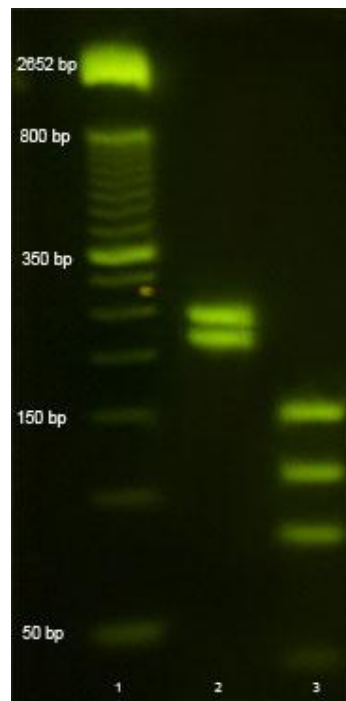


Figura 4.5 Digestión enzimática del aislado clínico 213. Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.4 Identificación por PRA. Aislado clínico 213.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
213 BstE II	240/210	235 / 210 / 0	<i>Mycobacterium ulcerans tipo 1</i>
213 HAE III	150/105/80	145 / 105 / 80 / 0	

Cuadro 4.4 Diferentes scores que presenta el PRASITE. Aislado clínico 213.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>102</u>	<i>Mycobacterium malmoeense</i> tipo 2	235/210/0	145/105/80	7
<u>103</u>	<i>Mycobacterium marinum</i> tipo 1	235/210/0	145/105/80	7
<u>165</u>	<i>Mycobacterium ulcerans</i> tipo 1	235/210/0	145/105/80	7

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

El análisis radica en diferenciar las 3 especies que presentan el mismo score, pero según investigaciones bibliográficas, difieren en las características fenotípicas. *Mycobacterium malmoeense* tipo 2 es de lento crecimiento y no pigmentada; *Mycobacterium marinum* tipo 1 es de lento crecimiento y fotocromógena y *Mycobacterium ulcerans* tipo 1 es de lento crecimiento y escotocromógena o no pigmentada (Leão, 2004).

Según las características fenotípicas se elimina automáticamente *Mycobacterium marinum* tipo 1, quedando en estudio de discusión *Mycobacterium marinum* tipo 1 y *Mycobacterium ulcerans* tipo 1, pero se adopta *Mycobacterium ulcerans* tipo 1 debido al criterio de patogenicidad. La característica propia de *M. ulcerans* son los aislamientos provenientes de úlceras de tejido hipo dérmico con induración pudiendo llegar a una necrosis, característica propia del aislado clínico 213. No se trata de *Mycobacterium malmoeense* tipo 2, porque según el criterio de patogenicidad, este microorganismo es aislado frecuentemente de los pulmones por ser una patógeno específico de enfermedades pulmonares. (Leão, 2004).

Los métodos tradicionales emitieron un diagnóstico correcto en la identificación de género y especie (*Mycobacterium ulcerans*), pero PRA es una técnica molecular que abarca una mayor especificidad, por tal razón caracteriza no solo el

género y la especie sino también subespecie y tipo de especie. En el caso específico del aislado clínico 213 es el tipo 1 de la especie *ulcerans* perteneciente al género *Mycobacterium*.

4.1.4. Aislado clínico 663

Las herramientas estándares microbiológicas caracterizaron el aislado clínico 663 como *Mycobacterium nonchromogenicum*. Estas herramientas emitieron características de crecimiento lento y colonias no pigmentadas. (Anexo B)

Según el método molecular PRA, el aislado clínico 663 generó patrones entre 320bp y 60p cuyo análisis determinó que la cepa es *Mycobacterium nonchromogenicum* tipo 2.

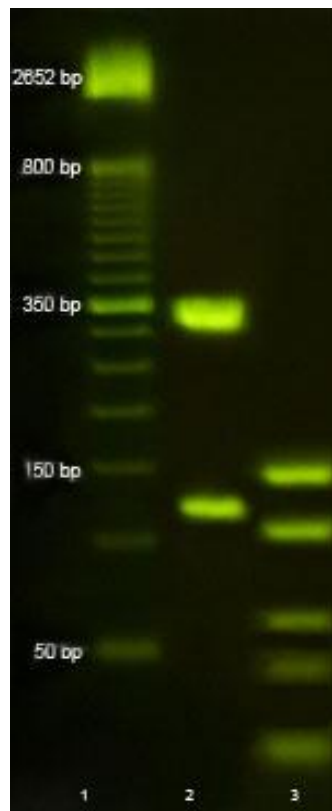


Figura 4.6 Digestión enzimática del aislado clínico **663**.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.5 Identificación por PRA, del aislado clínico **663**.

 AISLADO CLÍNICO	 IDENTIFICACIÓN PRA	 IDENTIFICACIÓN PRASITE	 CEPA IDENTIFICADA
663 BstE II	320/120	320 / 115 / 0	<i>Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2</i>
663 HAE III	140/95/60	140 / 90 / 60 / 0	

Cuadro 4.5 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 663.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>30</u>	<i>Mycobacterium chitae tipo 1</i>	320/115/0	140/90/60	7
<u>110</u>	<i>Mycobacterium mucogenicum tipo 3</i>	320/115/0	140/90/60	7
<u>115</u>	<i>Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2</i>	320/115/0	140/90/60	7

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

En el presente análisis las 3 especies que identifica el PRASITE como patrones modelos más cercanos al diagnóstico correcto, presentan un score de 7. Entonces la adopción de nuestro diagnóstico se enfocó al análisis de las características fenotípicas.

Mycobacterium chitae tipo 1 presenta un fenotipo de rápido crecimiento y de colonias no pigmentadas y el mismo fenotipo presenta *Mycobacterium mucogenicum* tipo 3, por lo tanto descartamos la posibilidad de que el diagnóstico se oriente a la caracterización de estas especies. Y afirmamos que es *Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2*, porque su fenotipo concuerda con el genotipo, además al evaluar la patogenicidad se afirma que esta especie está implicada frecuentemente en infecciones humanas (Leão, 2004).

Los métodos tradicionales y el método molecular, emitieron un diagnóstico concordante para la caracterización de la cepa 663.

4.1.5. Aislado clínico 506

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium intracellulare*. Además como datos adicionales

se reportaron la velocidad de crecimiento de la cepa y la pigmentación. Para el presente caso la velocidad de crecimiento fue lenta, superior a los 7 días, debido a que la fecha de siembra de la cepa fue el 7 de abril del 2008. La característica de pigmentación fue no pigmentada. (ANEXO B)

Según el método molecular PRA, la cepa 506 generó patrones de restricción entre 240bp y 60bp.

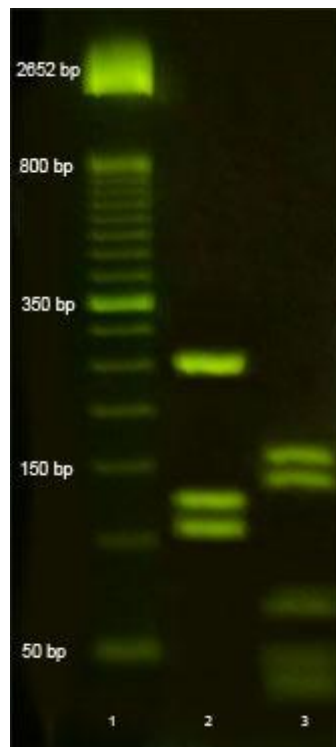


Figura 4.7 Digestión enzimática del aislado clínico **506**

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Los fragmentos de restricción generados por el PRASITE identificaron a 2 especies diferentes, pero con los mismos patrones de restricción, hablamos de *Mycobacterium chimaera tipo 1* y *Mycobacterium intracellulare tipo 1*. Al comparar las características fenotípicas, las 2 especies son de lento crecimiento y no pigmentadas; no pudiendo diferenciarlas atendiendo dichas características.

Tabla 4.6 Identificación por PRA, del aislado clínico **506**.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
506 BstE II	240/130/100	235 / 120 / 100	<i>Mycobacterium intracellulare tipo 1</i>
506 HAE III	150/135/60	145 / 130 / 60 / 0	

Cuadro 4.6 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 506.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>29</u>	<i>Mycobacterium chimaera</i> tipo 1	235/120/100	145/130/60	13
<u>81</u>	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1	235/120/100	145/130/60	13
<u>58</u>	<i>Mycobacterium goodii</i> tipo 1	235/130/85	145/125/60	19

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Recurrimos entonces a su patogenia y de igual forma la procedencia de aislamiento es la misma en las 2 especies, frecuentemente se aíslan de secreciones pulmonares de pacientes afectados por *M. tuberculosis*. Investigando con mayor profundidad, la herramienta que nos dio la pauta para marcar la diferencia fueron los estudios bibliográficos realizados por Schweickert en 2008; donde se destaca a *M. chimaera* como una bacteria perteneciente al MAC, cuya secuencia genética (16S rARN) es idéntica a *M. intracellulare* únicamente difiere en 1 nucleótido. Por tal motivo PRA no destaca diferencia entre las 2 especies pues su diagnóstico y tratamiento tienen la misma adopción. *M. chimaera* fue aislada en el viejo continente en Alemania en el 2008.

Posterior a la investigación bibliográfica y atendiendo la frecuencia epidemiológica de América Latina y nuestro país, caracterizamos a la cepa 506 como *Mycobacterium intracellulare tipo1* (OMS, 2006). Y de esta manera se pudo comprobar la coincidencia diagnóstica entre los métodos tradicionales y PRA.

4.1.6. Aislados clínicos 406 y 408

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, cultivo); fueron caracterizados como *Mycobacterium scrofulaceum*. Además como datos adicionales se reportaron la velocidad de crecimiento de la cepa y la pigmentación. Para el aislado clínico 406 la velocidad de crecimiento fue lenta, superior a los 15 días, debido a que la fecha de siembra de la cepa fue el 3 de abril del 2008. La característica de pigmentación: fotocromógena. Mientras que el aislado clínico 408 presentó crecimiento lento, evidenciando el crecimiento a los 15 días debido a que la fecha de siembra de la cepa fue el 3 de abril del 2008. La característica de pigmentación: escotocromógena. (ANEXO B)

Según el método molecular PRA, la cepa 406 generó patrones de restricción entre 440bp y 130bp.

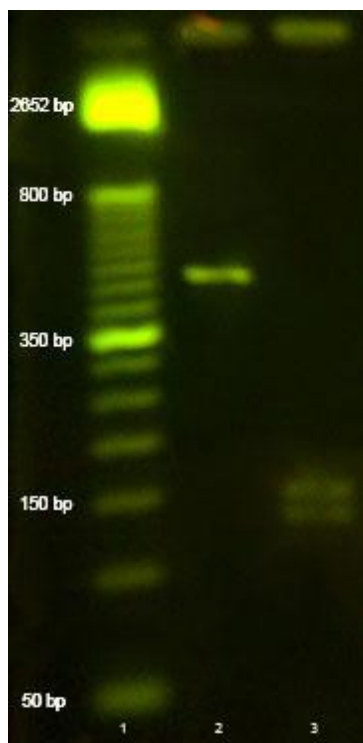


Figura 4.8 Digestión enzimática del aislado clínico 406.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

E idénticos patrones de restricción generó la cepa 408.

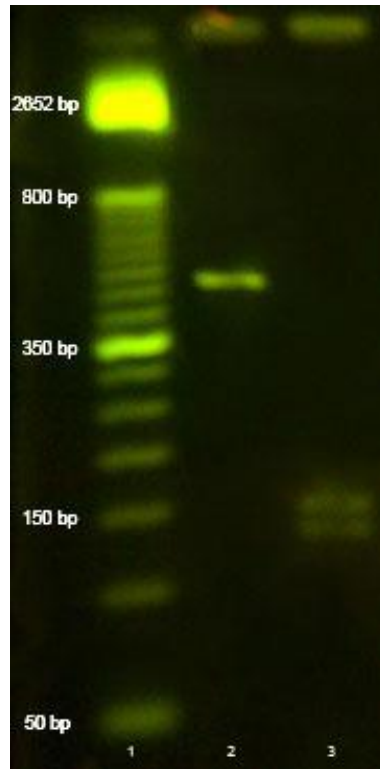


Figura 4.9 Digestión enzimática del aislado clínico 408.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Los fragmentos de restricción generados por el PRASITE, identificaron a 3 especies diferentes, pero con los mismos patrones de restricción, es decir presentaban el mismo score de 11; hablamos de *Mycobacterium florentinum* tipo 1, *Mycobacterium lentiflavum* tipo 1 y *Mycobacterium simiae* tipo 5.

Al comparar las características fenotípicas, analizamos que las 3 especies se diferencian según su fenotipo: *Mycobacterium florentinum* tipo 1 es de crecimiento lento y no pigmentada, *Mycobacterium lentiflavum* tipo 1 es lento y escotocromógeno coincidiendo tanto el fenotipo como el genotipo con el aislado clínico 408; mientras que *Mycobacterium simiae* tipo 5 es de crecimiento lento pero fotocromógeno, coincidiendo este último, con las características fenotípicas del aislado clínico 406.

Cuadro 4.7 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 406 y 408.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>46</u>	<i>Mycobacterium florentinum</i> tipo 1	440/0/0	145/130/0	11
<u>95</u>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 1	440/0/0	145/130/0	11
<u>174</u>	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 5	440/0/0	145/130/0	11

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Tabla 4.7 Identificación por PRA, del aislado clínico **406 y 408**.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
406 y 408 BstE II	440 / 0 / 0	440 / 0 / 0	<i>Mycobacterium simiae</i> <i>tipo 5 (406)</i> <i>Mycobacterium lentiflavum</i> <i>tipo 1 (408)</i>
406 y 408 HAE III	150/ 140/0	145 / 130 / 0 / 0	

La técnica molecular PRA, considera parcialmente certero el diagnóstico emitido por los métodos tradicionales que enunciaron a *Mycobacterium scrofulaceum* como identificación del aislado clínico 406. Porque de acuerdo a los patrones de restricción, *M. scrofulaceum* tipo 1, presenta similares patrones que la especie *M. simiae* tipo 2. Aunque difiere en los patrones establecidos por PRA, aclaramos que es la misma especie *M. simiae* pero esta especie se presenta en diferentes tipos. No variando en sus características fenotípicas pero sí en las genómicas, razón por la cual los métodos tradicionales la caracterizaron como *M. scrofulaceum*.

Cuadro 4.8 Patrones de restricción de *Mycobacterium scrofulaceum* tipo 1

Organismo	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> tipo 1
BstEII patrón	235 / 210 / 0
HaeIII patrón	145 / 130 / 95 / 0
Fenotipo	Lento crecimiento, escotocromógeno

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.9 Patrones de restricción de *Mycobacterium simiae* tipo 2

Organismo	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 2
BstEII patrón	235 / 210 / 0
HaeIII patrón	155 / 140 / 0 / 0
Fenotipo	Lento crecimiento, fotocromógeno

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

A pesar de coincidir con la característica fenotípica de velocidad de crecimiento, para la cepa 406, difieren en el tipo de pigmentación. La cepa 406 es fotocromógena, mientras que *M. scrofulaceum* es escotocromógena.

La diferencia diagnóstica entre los 2 métodos, se debe a que el resultado de las pruebas bioquímicas realizadas en el HVQ, presentan los mismos resultados de positividad y negatividad entre la especie *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium simiae*. Se destacan a continuación las pruebas positivas y negativas para las especies discutidas. Resultados positivos para: TCH, PBN, HA, Catalasa semicuantitativa y catalasa termoestable, ureasa, y reducción de telurito a los 9 días; mientras que presentaron resultados negativos para: Pirazinamidas, NaCl, Arysulfatasa a los 3 días, Arysulfatasa a las 2 semanas, Fosfatasa, β galactosidasa, hidrólisis de Twen. Las pruebas bioquímicas presentan mínimas diferencia pero no totales para diferenciar estas 2 especies, las cuales consisten en evaluar el crecimiento en isoniacida, en el cual *M. simiae* presenta una positividad mayor al 85%, mientras que *M. scrofulaceum* presenta positividad total, caso opuesto ocurre al evaluar la prueba de Niacina para *M. simiae* se afirma que del 15 al 49% la cepa es positiva, mientras que para *M. scrofulaceum* la cepa es totalmente positiva. Aunque exista una diferencia nuestro criterio es, que más del 50% de *M. simiae* puede presentar positividad a la prueba debido a que esta prueba bioquímica no es radical. En cuanto a la reducción de nitratos *M. scrofulaceum* presenta del 15 al 49% de positividad a la prueba, mientras que *M. simiae* presenta una negatividad total. Como apreciamos existe una similitud elevada entre las 2 especies, razón por la cual son especies difíciles de determinar por métodos tradicionales, por tal razón para su identificación se requieren métodos más avanzados como análisis de ácidos micólicos o métodos moleculares como PRA (Leão, 2004).

Debemos aclarar que los resultados discordantes no se establecen por una falta inadecuada del procesamiento de los métodos tradicionales, la diferencia radica en que el ADN micobacteriano es un ADN repetitivo en su secuencia debido a que tiene una alta proporción de guanina y citosina (61% - 71%) en su genoma, esto hace que las características fenotípicas sean prácticamente las mismas entre las diferentes especies (Dorronsoro, 2007).

Según Leão, et al., no es posible la diferenciación de *Mycobacterium lentiflavum* por métodos tradicionales, esta aclaración determina que la cepa 408 diagnosticada por el método molecular PRA como *Mycobacterium lentiflavum tipo 1*; no podría ser determinada por métodos tradicionales que la diagnosticaron como *M. scrofulaceum*, caracterización que es incorrecta porque ninguno de los 4 tipos de la *M. lentiflavum*, coincide o se asemeja a los patrones de *M. scrofulaceum*; pero gracias a PRA, podemos aserir al observar las figuras 4.8 (Cepa 406. *M. simiae* tipo 5) y la figura 4.9 (cepa 408. *M. lentiflavum* tipo 1), que presentan los mismos patrones debido a la similaridad fenotípica y genotípica entre *M. simiae* y *M. lentiflavum* que gracias al tipo de pigmentación fueron diferenciadas (Leão, 2004).

Cuadro 4.10 Patrones de restricción de *Mycobacterium lentiflavum* tipo 1

Organismo	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 1
BstEII patrón	440 / 0 / 0
HaeIII patrón	145 / 130 / 0 / 0
Fenotipo	Lento crecimiento, escotocromógeno

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.11 Patrones de restricción de *Mycobacterium lentiflavum* tipo 2

Organismo	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 2
BstEII patrón	320 / 115 / 0
HaeIII patrón	145 / 130 / 0 / 0
Fenotipo	Lento crecimiento, escotocromógeno

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.12 Patrones de restricción de *Mycobacterium lentiflavum* tipo 3

Organismo	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 3
BstEII patrón	235 / 120 / 100
HaeIII patrón	145 / 130 / 0 / 0
Fenotipo	Lento crecimiento, escotocromógeno

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.13 Patrones de restricción de *Mycobacterium lentiflavum* tipo 4

Organismo	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 4
BstEII patrón	235 / 120 / 85
HaeIII patrón	130 / 95 / 0 / 0
Fenotipo	Lento crecimiento, escotocromógeno

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

4.1.7. Aislados clínicos 609 y 543

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, cultivo); fueron caracterizadas como *Mycobacterium chelonae*. Además como datos adicionales se reportaron la velocidad de crecimiento de la cepa y la pigmentación. Para la cepas 609 y 543 la velocidad de crecimiento fue rápida, 4 días, debido a que la fecha de siembra de las cepas fue el 7 de abril del 2008. La característica de pigmentación: no pigmentada (ANEXO B)

Según el método molecular PRA, las cepas 609 y 543 generaron patrones de restricción entre 240bp a 55bp. Dichos patrones son congéneres.

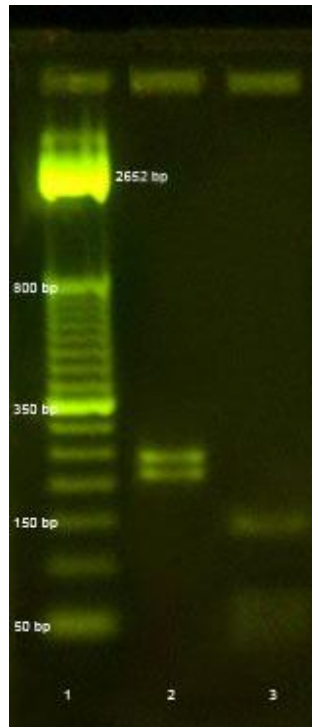


Figura 4.10 Digestión enzimática del aislado clínico 609.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

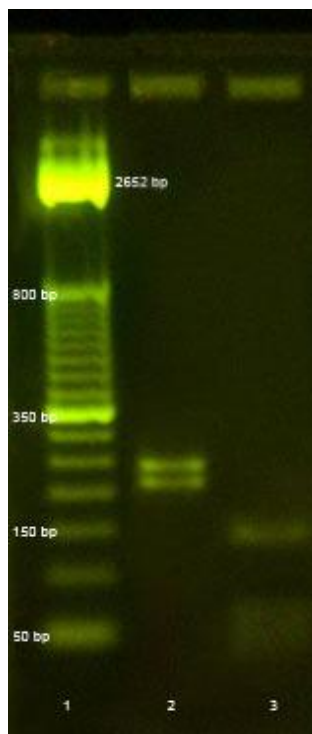


Figura 4.11 Digestión enzimática del aislado clínico 543.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.8 Identificación por PRA. Aislados clínicos 609 y 543.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
609 y 543 BstE II	245/210	235 / 210 / 0	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1
609 y 543 HAE III	150/75/60	145 / 70 / 60 / 55	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron *Mycobacterium abscessus* tipo 1 con el menor score, seguida en 3 puntos por *Mycobacterium phlei* tipo 1, especie que la descartamos porque su fenotipo reporta que es una bacteria de crecimiento rápido y escotocromógena, no coincidiendo con los datos reportados por el HVQ. Y prescindimos a *Mycobacterium chlorophenicum* tipo 1 por su score evidentemente es más alejado en 9 puntos del score del patrón correcto.

Cuadro 4.14 Diferentes scores que presenta el PRASITE. Aislados clínicos 609 y 543.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>1</u>	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1	235/210/0	145/70/60	12
<u>130</u>	<i>Mycobacterium phlei</i> tipo 1	235/210/0	140/80/60	15
<u>31</u>	<i>Mycobacterium chlorophenicum</i> tipo 1	235/210/0	140/90/60	21

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Adopté el score de 12 como el resultado correcto empleando PRA, además afirmamos que los patrones designados por el PRASITE son semejantes al los patrones de restricción tanto para HAE III como para BstEII, identificados en el estudio. Asimismo, los métodos tradicionales que evaluaron pigmentación y velocidad de crecimiento, concuerdan con los patrones de PRA, por lo tanto afirmamos que la cepa es *Mycobacterium abscessus* tipo 1.

La técnica molecular PRA, considera inválido el diagnóstico emitido por los métodos tradicionales que enunciaron a *Mycobacterium chelonae* como identificación de los aislados clínicos 609 y 543, debido a que a pesar de coincidir con la característica

fenotípica de la velocidad de crecimiento, no coincide con la pigmentación ni con su genotipo como lo muestra el cuadro 4.7.

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 3 especies diferentes, pero sus scores demuestran en definitiva una elevada diferencia entre los patrones por tal razón adopté el score de 12 como la mejor opción y al evaluar el resultado de PRA, además que los patrones de restricción tanto para HAE III como para BstEII, son idénticos a los que se identificó en el estudio. También los métodos tradicionales que evaluaron pigmentación y velocidad de crecimiento, coinciden con el patrón de PRA, por lo tanto afirmamos que la cepa es *Mycobacterium abscessus tipo 1*.

Pero el diagnóstico final de los métodos tradicionales fue que las cepas 543 y 609 presentaban *Mycobacterium chelonae*, resultado que no concuerdan con los patrones de restricción presentados por PRA, ni aún en las 10 especies que presenta el PRASITE para su comparación. Esto se debe a que *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus* tienen similitud en los resultados establecidos por pruebas bioquímicas, solo se diferencian en una de ellas. *Mycobacterium abscessus* es NaCl positivo, mientras que *Mycobacterium chelonae* es NaCl negativo, pero previa a esta última prueba de discretización se realizaron pruebas bioquímicas de arilsulfatasa y nitratos, pruebas en las cuales las 2 especies tienen los mismos resultados y como discutimos en los puntos anteriores la explicación radica en el ADN repetitivo que presentan las micobacterias.

Cuadro 4.15 Patrones de restricción que presenta el PRASITE para *Mycobacterium chelonae* tipo 1.

Organismo	<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1
BstEII patrón	320 / 130 / 0
HaeIII patrón	200 / 60 / 55 / 50
Fenotipo	Rápida y no pigmentada

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Previo a la presente explicación optamos por diagnosticar por PRA, *Mycobacterium abscessus tipo 1*.

4.1.8. Aislado clínico 291

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium haemophilum*. Además como datos adicionales se reportaron la velocidad de crecimiento de la cepa y la pigmentación. Para el presente caso la velocidad de crecimiento fue lenta, superior a los 7 días, debido a que la fecha de siembra de la cepa fue el 3 de abril del 2008. La característica de pigmentación fue no pigmentada. (ANEXO B) Informe HVQ dice que es escotocromógena y rápida, pero hay una controversia, si el reporte final es *M. haemophilum* u otras de crecimiento rápido nunca puede ser *M. haemophilum* porque su fenotipo es lento y no pigmentada por tal razón asumo que las características: lenta y no pigmentada.

Según el método molecular PRA, el aislado clínico 291 generó patrones entre 235bp y 60p.

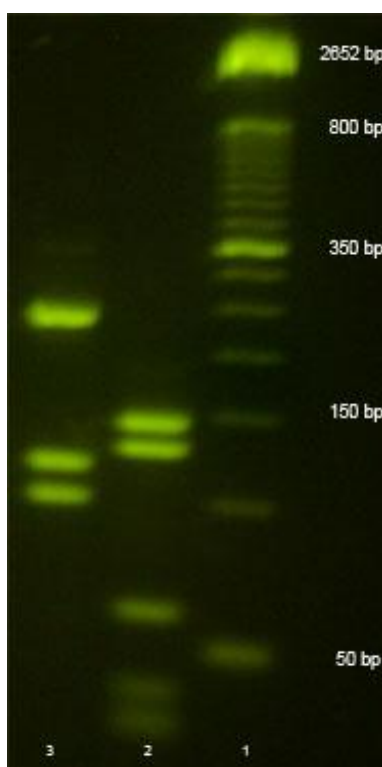


Figura 4.12 Digestión enzimática del aislado clínico 291.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática coëna III, Línea 3: Digestión enzimática con BstEII.

Tabla 4.9 Identificación por PRA, del aislado clínico **291**.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
291 BstE II	235/120/105	235 / 120 / 100	<i>Mycobacterium intracellulare tipo 1</i>
291 HAE III	150/130/60	145 / 130 / 60 / 0	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima son los mismos que los patrones generados por el aislado clínico 506, debido a que se trata de la misma cepa *Mycobacterium intracellulare tipo 1*, por lo tanto la discusión es idéntica al punto 4.5.

Cuadro 4.16 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 291.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>29</u>	<i>Mycobacterium chimaera</i> tipo 1	235/120/100	145/130/60	7
<u>81</u>	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1	235/120/100	145/130/60	7
<u>66</u>	<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 9	235/120/100	160/115/60	19

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero la identificación realizada por el método PRA, no coincide con los métodos tradicionales que designan al aislado clínico 291 como *M. haemophilum*, porque a pesar de coincidir con las características fenotípicas (velocidad de crecimiento y pigmentación), no coincide con su genotipo como lo muestran los cuadros 4.16 y 4.17

Cuadro 4.17 Patrones de restricción de *Mycobacterium haemophilum* tipo 1

ID	68
Organismo	<i>Mycobacterium haemophilum</i> tipo 1
BstEII patrón	320 / 130 / 0
HaeIII patrón	160 / 110 / 0 / 0
Fenotipo	Lento crecimiento, no pigmentado

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

La explicación que validamos se centra en el poder discriminatorio de la técnica molecular PRA, ventaja que no poseen los métodos tradicionales. Razón por la cual al realizar las pruebas bioquímicas más frecuentes, las 2 especies presentan positividad o negatividad en forma paralela. Únicamente se las puede diferenciar con las pruebas reducción de Telurito, PNB (crecimiento en ácido p-nitro benzóico) y catalasa termoestable (68°C), en el HVQ no se realiza la prueba de PNB.

4.1.9. Aislado clínico 510

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium avium complex*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es lenta y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B).

Según el método molecular PRA, el aislado clínico 510 generó patrones entre 240bp y 130p.

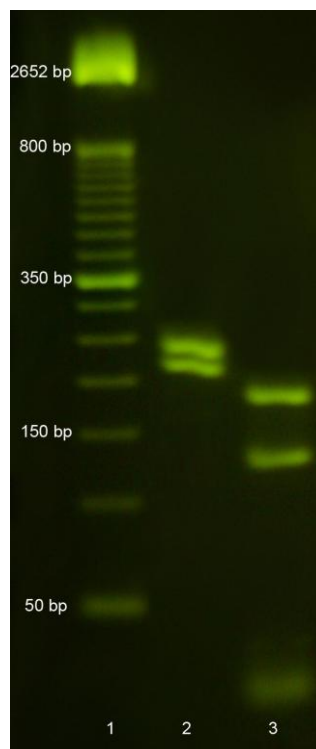


Figura 4.13 Digestión enzimática del aislado clínico 510.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.10 Identificación por PRA, del aislado clínico **510**.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
510 BstE II	240/220	235/210/0	<i>Mycobacterium genavense tipo 2</i>
510 HAE III	190/130/0	185/130/0	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 2 especies diferentes, *Mycobacterium genavense tipo 2* y *Mycobacterium simiae tipo 1* y *tipo 2*. *Mycobacterium genavense tipo 2* y *mycobacterium simiae tipo 1*, mostraron los mismos patrones de restricción, es decir presentaban el mismo score de 12. Al comparar las características fenotípicas, analizamos que las 2 especies se diferencian según su fenotipo: *Mycobacterium genavense tipo 2* es de crecimiento lento y no pigmentada, mientras que *Mycobacterium simiae tipo 1* es lento y fotocromógeno; coincidiendo *Mycobacterium genavense tipo 2*, con las características fenotípicas evaluadas en el presente estudio.

Cuadro 4.18 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 510.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>55</u>	<i>Mycobacterium genavense tipo 2</i>	235/210/0	185/130/0	12
<u>148</u>	<i>Mycobacterium simiae tipo 1</i>	235/210/0	185/130/0	12
<u>149</u>	<i>Mycobacterium simiae tipo 2</i>	235/210/0	155/140/0	38

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero la identificación realizada por el método PRA, no concuerda en forma precisa con los métodos tradicionales que designan al aislado clínico 510 como *Mycobacterium avium complex*, debido a que a pesar de coincidir con las características fenotípicas (velocidad de crecimiento y pigmentación), no coincide con su genotipo. Como analizamos ya en anteriores caso, esto se debe a que las pruebas bioquímicas no son tan sensibles para discretizar las diferentes especies y presentan positividad a todas las especies genotípicamente parecidas, porque la diferencia entre nucleótidos es mínima en un complejo o en un grupo específico (Schweickert en 2008).

Por tal motivo afirmamos que la identificación tradicional para el aislado clínico 510, no se encuentra mal realizada. La diferencia diagnóstica se enfoca al poder discriminatorio de los métodos tradicionales, poder que es mucho mayor en los métodos moleculares, prueba de ello el PRASITE emite entre los resultados; 10 especies para su comparación y llegar al modelo más cercano para la identificación del patrón y en este caso específico entre las 10 especies se encuentra *Mycobacterium avium complex*, el cual está formado por *M. intracellulare*, *M. avium*. spp y *M. chimaera*.

Cuadro 4.19. 10 especies que guardan cercanía para la adopción del resultado del aislado clínico 510.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>55</u>	<i>Mycobacterium genavense</i> tipo 2	235/210/0	185/130/0	12
<u>148</u>	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 1	235/210/0	185/130/0	12
<u>149</u>	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 2	235/210/0	155/140/0	38
<u>147</u>	<i>Mycobacterium shottsii</i> tipo 1	235/210/0	225/110/0	42
<u>15</u>	<i>Mycobacterium avium s. avium</i> tipo 3	235/210/0	145/130/0	46
<u>80</u>	<i>Mycobacterium intermedium</i> tipo 1	235/210/0	145/130/0	46
<u>78</u>	<i>Mycobacterium interjectum</i> tipo 1	235/210/0	145/130/0	46
<u>151</u>	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 6	235/210/0	145/130/0	46
<u>83</u>	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 3	235/210/0	145/130/0	46
<u>143</u>	<i>Mycobacterium seoulense</i> tipo 1	235/210/0	145/130/0	46

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

4.1.10. Aislado clínico 576

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium chelonae*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es rápida y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B).

Según el método molecular PRA, el aislado clínico 576 generó patrones entre 245bp y 70bp.

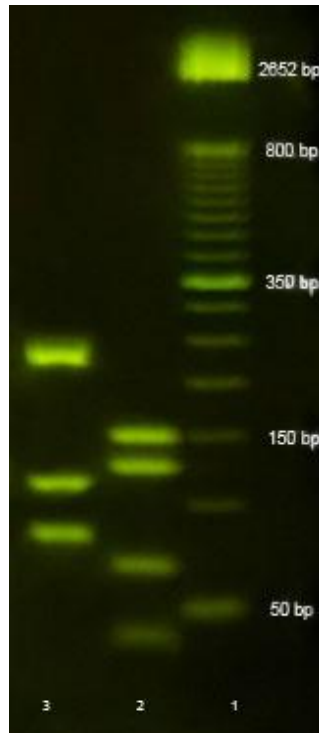


Figura 4.14 Digestión enzimática del aislado clínico 576.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con HAEIII, Línea 3: Digestión enzimática con BstEII,

Tabla 4.11 Identificación por PRA, del aislado clínico 576.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
576 BstE II	245/120/85	235 / 120 / 85	<i>Mycobacterium tuberculosis complex tipo 1</i>
576 HAE III	155/130/70	150 / 130 / 70 / 0	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 3 scores diferentes. Pero el score menor es de 14 que está representado por *Mycobacterium tuberculosis complex* tipo 1. Seguido con una diferencia de 7 puntos por *Mycobacterium gordonae* tipo 1; al analizar las 2 cepas empezando por el fenotipo *Mycobacterium gordonae* tipo 1 no concuerda con el fenotipo evaluado por el HVQ, ni aún coincide con el genotipo porque presenta patrones con un margen de diferencia elevada principalmente en HAE III.

Cuadro 4.20 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 576.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
163	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> tipo 1	235/120/85	150/130/70	14
59	<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 1	235/120/85	160/115/60	21
3	<i>Mycobacterium agri</i> tipo 1	235/130/85	160/145/60	23
48	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1	235/120/85	145/120/60	23

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Se tenía un diagnóstico dudoso al reportar que el aislado clínico 576, sea *Mycobacterium tuberculosis complex* tipo 1, porque se conocía con anterioridad por parte del HVQ, que todos los aislados clínicos eran MNT, pero para confirmar y no desmentir el resultado emitido por PRA, se realizó PCR para amplificar la secuencia de inserción IS6110, presente en todas las micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y efectivamente como se muestra en capítulo 3 punto 3.4; obtuvimos una amplificación de 123bp (Figura 3.5), propia de una especie perteneciente al complejo *M. tuberculosis*.

PRA, posee una desventaja, no puede distinguir que miembro del complejo *M. tuberculosis* es, para ello se debe realizar otros estudios moleculares en base a las regiones de delección como Rd1 y Rd9, donde se estudian locis característicos del complejo realizando un PCR multiplex (Huard, 2003).

Podemos aseverar nuestro resultado, al analizar las características fenotípicas del aislado 576, en primera instancia hubo discordancia debido a que el reporte del HVQ indicó que se trataba de una especie de crecimiento rápido y *Mycobacterium tuberculosis complex* tipo 1, es de crecimiento lento, por tal razón se repitió el cultivo del aislado clínico 576, y se confirmó efectivamente que la velocidad de crecimiento fue lenta. Afirmando el diagnóstico emitido por PRA.

Y para confirmar aún más la controversia del aislado clínico 576, se compararon los patrones de restricción de *Mycobacterium tuberculosis complex* tipo 1, y *Mycobacterium fortuitum* tipo 1, especie que obtuvo el 4to score en orden decreciente, estas especies son controversiales puesto que sus patrones tienen una marcada pero pequeña diferencia y en casos de identificación novata, puede prestarse a

confusión fundamentalmente si no se conjuga el análisis fenotípico con el genotípico (De Waar, 2006).

Al comparar los 2 patrones de PRA podemos identificar claramente que *Mycobacterium tuberculosis complex* tipo 1, presenta un fragmento de restricción en HAE III de 70bp. En *Mycobacterium fortuitum tipo 1* también encontramos fragmentos de restricción pequeños, emitidos por HAE III, pero son inferiores a los 60bp; ésta es la diferencia que siempre se debe considerar al evaluar estas 2 especies.

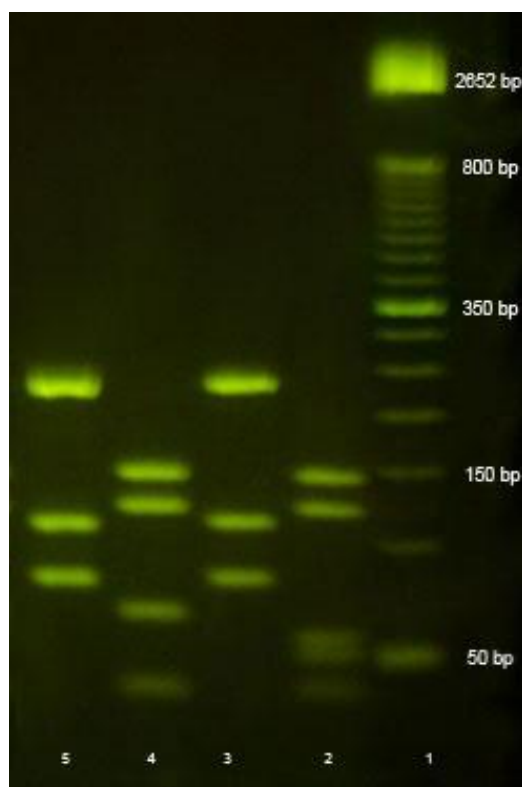


Figura 4.15 Digestión enzimática del aislado clínico 576 y aislado clínico 580

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con HAEII. *Mycobacterium fortuitum* tipo 1, Línea 3: Digestión enzimática con BstEII *Mycobacterium fortuitum* tipo 1. Línea 4: Digestión enzimática con HAE III. *Mycobacterium tuberculosis complex* tipo 1, Línea 5: Digestión enzimática con BstEII *Mycobacterium tuberculosis complex* tipo 1.

4.1.11. Aislado clínico 580

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium abscessus*. Se reportó que la velocidad de

crecimiento de la cepa es rápida y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B).

Según el método molecular PRA, el aislado clínico 580 generó patrones entre 240bp y 55bp.

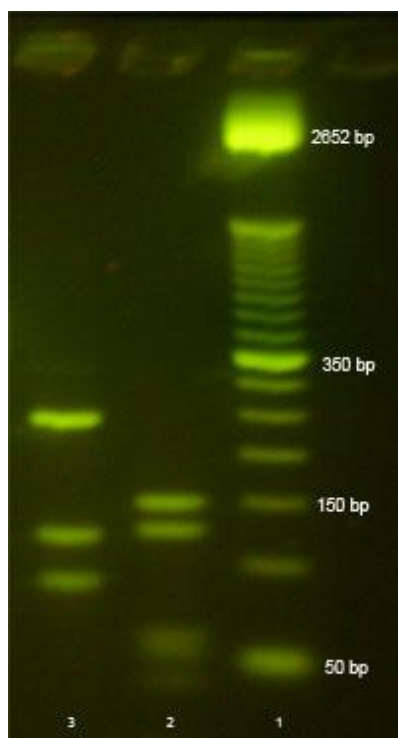


Figura 4.16 Digestión enzimática del aislado clínico 580.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con HAEIII.
Línea 3: Digestión enzimática con BstEII

Tabla 4.12 Identificación por PRA, del aislado clínico **580**.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
580 BstE II	245/120/85	235 / 120 / 85	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>
580 HAE III	145/120/60/55	145 / 120 / 60 / 55	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron 2 scores del mismo valor (10) y un score de mínima diferencia en comparación con los primeros

(11). El resultado que emitió el PRASITE indica que las 3 especies son las mismas solo difieren en la subespecie y el tipo. Por ende coinciden con el fenotipo.

Adopté *Mycobacterium fortuitum tipo 1* por ser la especie con mayor frecuencia epidemiológica en comparación con *Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum tipo 1*, además que tomé en consideración la patogenia. *Mycobacterium fortuitum tipo 1*, ha sido frecuentemente asociada a infecciones cutáneas, mientras que *Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum tipo 1*, se caracteriza por causar infecciones pulmonares (Leão, 2004). El aislado clínico provino de un absceso de tejido blando. Herida en el brazo.

Cuadro 4.21 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 580.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
48	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>	235/120/85	145/120/60	10
51	<i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum tipo 1</i>	235/120/85	145/120/60	10
49	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 2</i>	235/120/85	140/120/60	11

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero el diagnóstico molecular no coincide con el diagnóstico tradicional. Los métodos tradicionales evaluaron al aislado clínico 580 como *Mycobacterium abscessus*. Y como se muestra en la figura 4.16, los patrones emitidos por PRA que representan a *Mycobacterium fortuitum tipo 1*, difieren con amplio rango a los patrones de *Mycobacterium abscessus*, sea este tipo 1 o tipo 2.

Cuadro 4.22 Patrones PRA de *Mycobacterium abscessus tipo 1*

Organismo	<i>Mycobacterium abscessus tipo 1</i>
BstEII patrón	235 / 210 / 0
HaeIII patrón	145 / 70 / 60 / 55
Fenotipo	Rápido / no pigmentado

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.23 Patrones PRA de *Mycobacterium abscessus* tipo 2

Organismo	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 2
BstEII patrón	235 / 210 / 0
HaeIII patrón	200 / 70 / 60 / 50
Fenotipo	Rápido / no pigmentado

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Por tanto afirmamos que *Mycobacterium fortuitum* tipo 1, es el diagnóstico correcto. La discusión para abordar el diagnóstico sobre las pruebas tradicionales es el mismo que en los anteriores casos.

4.1.12. Aislado clínico 501

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium kansasii*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es rápida y la característica de pigmentación es: escotocromógena. (ANEXO B). Los patrones de restricción pertenecientes al aislado clínico 501, según PRA generaron fragmentos entre 440bp y 55bp.

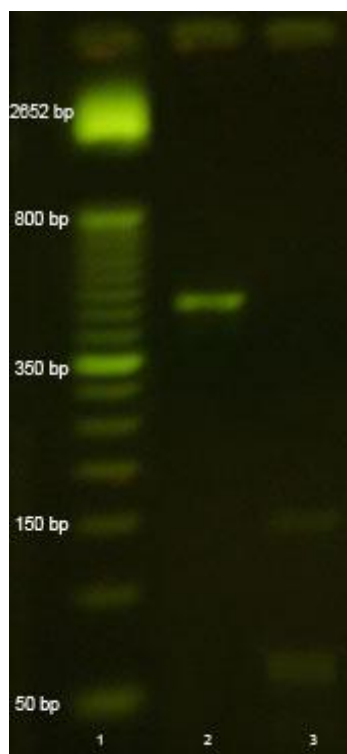


Figura 4.17 Digestión enzimática del aislado clínico 501.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.13 Identificación por PRA, del aislado clínico **501**.

 AISLADO CLÍNICO	 IDENTIFICACIÓN PRA	 IDENTIFICACIÓN PRASITE	 CEPA IDENTIFICADA
501 BstE II	440/0/0	440/0/0	<i>Mycobacterium flavescens</i> tipo 1
501 HAE III	145/60/55	140/55/50	

En análisis del PRASITE, destaca 3 especies diferentes, cada una con su score. *Mycobacterium novocastrense* tipo 1, posee el menor score, seguida de *Mycobacterium flavescens* tipo 1. En este caso en particular no adoptamos la especie que posee el menor score como diagnóstico porque *M. novocastrense* es una bacteria de crecimiento rápido pero el tipo de pigmentación es fotocromógena, no concordando con el fenotipo de la cepa emitido por los métodos tradicionales del HVQ.

Cuadro 4.24 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 501.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>116</u>	<i>Mycobacterium novocastrense</i> tipo 1	440/0/0	140/60/50	7
<u>45</u>	<i>Mycobacterium flavescens</i> tipo 1	440/0/0	140/55/50	9
<u>24</u>	<i>Mycobacterium brumae</i> tipo 1	440/0/0	145/70/60	11

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Se adoptó *M. flavescens* tipo 1 como resolución porque tanto las características fenotípicas como genotípicas concuerdan en la caracterización de la especie, además según su epidemiología es una de las cepas comúnmente aisladas en muestras clínicas y con el tiempo ha sido considerada no patógena (Leão, 2004). No es *Mycobacterium novocastrense* tipo 1, porque el fenotipo difiere con el genotipo además que según la epidemiología esta especie fue aislada en Inglaterra de una biopsia procedente de la mano de un niño de 6 años (NCBI, 2008).

Los métodos tradicionales destacaron que el aislado clínico es *M. kansasii*, pero al observar los patrones de PRA, podemos negar esta afirmación, debido a que los patrones restrictivos para *M. kansasii* son absolutamente distintos. No asemejándose en ninguno de los 6 tipos que presenta *M. kansasii*.

Cuadro 4.25 Patrones para *Mycobacterium kansasii* tipo 1.

Organismo	<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo 1
BstEII patrón	235 / 210 / 0
HaeIII patrón	130 / 105 / 80 / 0

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.26 Patrones para *Mycobacterium kansasii* tipo 2.

Organismo	<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo 2
BstEII patrón	235 / 130 / 85
HaeIII patrón	130 / 105 / 0 / 0

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.27 Patrones para *Mycobacterium kansasii* tipo 3.

Organismo	<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo 3
BstEII patrón	235 / 130 / 85
HaeIII patrón	130 / 95 / 70 / 0

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.28 Patrones para *Mycobacterium kansasii* tipo 4.

Organismo	<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo 4
BstEII patrón	235 / 120 / 85
HaeIII patrón	130 / 115 / 75 / 60

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.29 Patrones para *Mycobacterium kansasii* tipo 5.

Organismo	<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo 5
BstEII patrón	320 / 115 / 0
HaeIII patrón	130 / 95 / 75 / 60

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.30 Patrones para *Mycobacterium kansasii* tipo 6.

Organismo	<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo 6
BstEII patrón	235 / 130 / 85
HaeIII patrón	130 / 105 / 70 / 0

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

4.1.13. Aislado clínico 565

Las herramientas estándares microbiológicas caracterizaron el aislado clínico 565 como *Mycobacterium avium complex*. Estas herramientas emitieron características de crecimiento lento y colonias no pigmentadas. (Anexo B)

Los patrones de restricción pertenecientes al aislado clínico generaron fragmentos entre 240bp y 60bp cuyo análisis determinó que la cepa es *Mycobacterium nonchromogenicum* tipo 2.

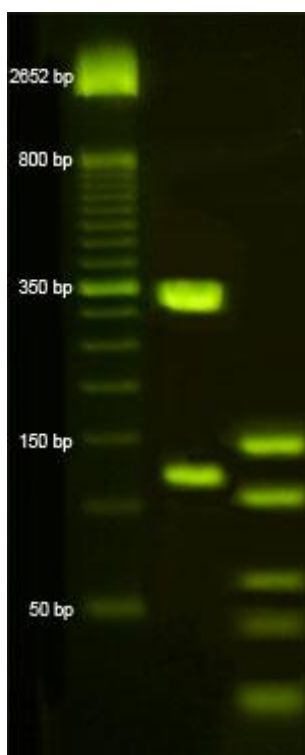


Figura 4.18 Digestión enzimática del aislado clínico 565.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.14 Identificación por PRA, del aislado clínico 565.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
565 BstE II	320/120	320 / 115 / 0	<i>Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2</i>
565 HAE III	140/95/60	140 / 90 / 60 / 0	

Cuadro 4.31 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 565.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>30</u>	<i>Mycobacterium chitae tipo 1</i>	320/115/0	140/90/60	7
<u>110</u>	<i>Mycobacterium mucogenicum tipo 3</i>	320/115/0	140/90/60	7
<u>115</u>	<i>Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2</i>	320/115/0	140/90/60	7

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

En el presente análisis las 3 especies que identifica el PRASITE como patrones modelos más cercanos al diagnóstico correcto, presentan un score de 7. Entonces la adopción de nuestro diagnóstico se enfocó a las características fenotípicas.

Mycobacterium chitae tipo 1 presenta un fenotipo de rápido crecimiento y de colonias no pigmentadas y el mismo fenotipo presenta *Mycobacterium mucogenicum tipo 3*, por lo tanto descartamos la posibilidad de que el diagnóstico se oriente a la caracterización de estas especies. Y afirmamos que es *Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2*, porque su fenotipo concuerda con el genotipo, además al evaluar la patogenicidad se afirma que esta especie esta implicada frecuentemente en infecciones humanas (Leão, 2004).

Pero según el diagnóstico final de los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium avium complex*, diagnóstico que a pesar de coincidir en las características fenotípicas con el diagnóstico de PRA, genotípicamente presenta una amplia diferencia principalmente en los fragmentos de restricción de la enzima BstEII, porque ningún miembro del *M. avium complex*, presenta esta identificación en los fragmentos como lo hemos comprobado en

las discusiones de los casos en los cuales se han referido *M. avium*, *M. intracellulare* y *Mycobacterium conceptionense*.

4.1.14. Aislado clínico 622

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium gordonae*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es lenta y la característica de pigmentación es: escotocromógena. (ANEXO B).

Los patrones de restricción, emitidos por PRA pertenecientes al aislado clínico 622 generaron fragmentos entre 320bp y 55bp.

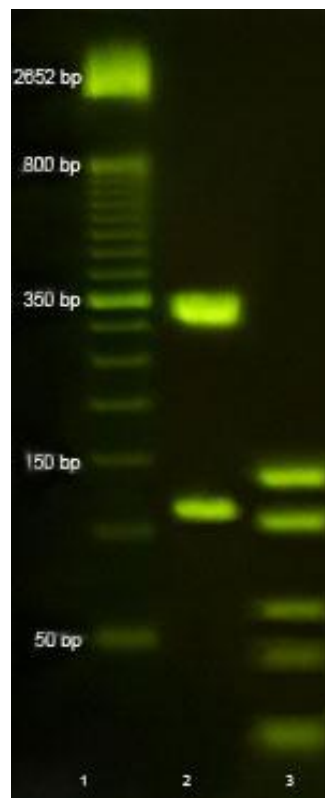


Figura 4.19 Digestión enzimática del aislado clínico 622.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.15 Identificación por PRA, del aislado clínico 622.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
622 BstE II	320/120/0	320/115/0	<i>Mycobacterium gordonae tipo 4</i>
622 HAE III	140/110/55	130/115/60	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 2 especies diferentes, pero sus scores demuestran en definitiva una diferencia entre los 2 patrones.

El patrón de PRA *Mycobacterium gordonae tipo 4* coincidió con el diagnóstico de los métodos tradicionales, velocidad de crecimiento y pigmentación y pruebas bioquímicas. Adoptamos además esta especie porque su patogenia indica que es una de las micobacterias aisladas con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos principalmente de pacientes infectados con VIH (Leão, 2004). En comparación con *Mycobacterium botniense tipo 1* que no presenta casos clínicos reconocidos.

Cuadro 4.32 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 622.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>62</u>	<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 4	320/115/0	130/115/60	13
<u>21</u>	<i>Mycobacterium botniense</i> tipo 1	320/130/0	130/115/60	16
<u>65</u>	<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 8	320/115/0	130/110/70	19

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

4.1.15. Aislado clínico 513

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium chelonae* o *M. abscessus*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es lenta y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B).

Los patrones de restricción, emitidos por PRA pertenecientes al aislado clínico 513 generaron fragmentos entre 245bp y 90bp.

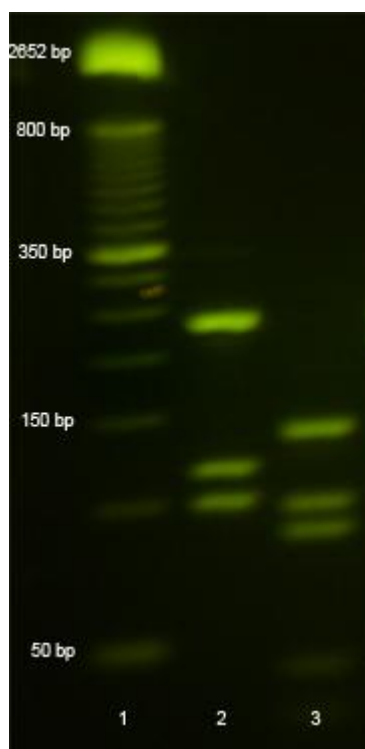


Figura 4.20 Digestión enzimática del aislado clínico 513.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.16 Identificación por PRA, del aislado clínico **513**.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
513 BstE II	245/125/100	235 / 120 / 100	<i>Mycobacterium malmoeense tipo 1</i>
513 HAE III	145/110/90	145 / 105 / 80 / 0	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 3 especies diferentes, pero sus scores demuestran en definitiva una elevada diferencia entre los patrones por tal razón adopté el score de 15 como la mejor opción al evaluar el resultado de PRA, además que los patrones de restricción tanto para HAE III como para

BstEII, son idénticos a los que se identificó en el estudio. También se evaluó pigmentación y velocidad de crecimiento, coincidiendo con el patrón de PRA, por lo tanto afirmamos que la cepa es *Mycobacterium malmoense tipo 1*.

Cuadro 4.33 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 513.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>101</u>	<i>Mycobacterium malmoense</i> tipo 1	235/120/100	145/105/80	15
<u>67</u>	<i>Mycobacterium gordonae</i> tipo 10	235/120/100	130/110/95	19
<u>23</u>	<i>Mycobacterium brisbanense</i> tipo 1	235/120/100	140/125/100	21

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero el diagnóstico final de los métodos tradicionales fue que la cepa 513 es como *Mycobacterium chelonae* o *Mycobacterium abscessus*, resultado que no concuerdan con los patrones de restricción presentados por PRA, ni aún en las 10 especies que presenta el PRASITE para su comparación.

Estas 2 afirmaciones de los métodos tradicionales se deben a que *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus* tienen similitud en los resultados establecidos por pruebas bioquímicas, solo se diferencian en una de ellas. *Mycobacterium abscessus* es NaCl positivo, mientras que *Mycobacterium chelonae* es NaCl negativo, pero previa es esta última prueba de discretización se realizaron pruebas bioquímicas de arilsulfatasa y nitratos, pruebas en las cuales las 2 especies tienen los mismos resultados y como discutimos en los puntos anteriores la explicación radica en el ADN repetitivo que presentan las micobacterias.

Sin embargo los patrones que se obtuvieron después de la digestión del producto de amplificación del aislado clínico 513, es muy diferente a las especies diagnosticadas por los métodos tradicionales y al realizar la comparación de los patrones y al no encontrar familiaridad entre ellos se afirma que el correcto diagnóstico se realizó por PRA, como *Mycobacterium malmoense tipo 1*.

Cuadro 4.34 Patrones de restricción que presenta el PRASITE para *Mycobacterium abscessus* tipo 1 y 2

Organismo	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 2
BstEII	235 / 210 / 0	235 / 210 / 0
HaeIII	145 / 70 / 60 / 55	200 / 70 / 60 / 50

Cuadro 4.35 Patrones de restricción que presenta el PRASITE para *Mycobacterium chelonae* tipo 1

Organismo	<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1
BstEII patrón	320 / 130 / 0
HaeIII patrón	200 / 60 / 55 / 50

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

4.1.16. Aislado clínico 563

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium fortuitum*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es rápida y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B)

Los patrones de restricción, emitidos por PRA pertenecientes al aislado clínico 563, generaron fragmentos entre 240bp y 55bp.

Tabla 4.17 Identificación por PRA, del aislado clínico 563.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
543 BstE II	240/210	235/210/0	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1
543 HAE III	150/70/55	145 / 70 / 60 / 55	

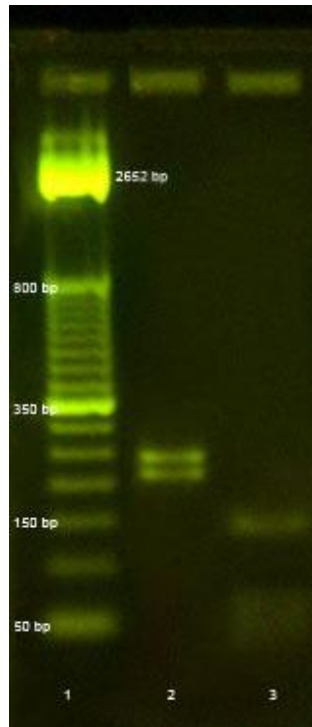


Figura 4.21 Digestión enzimática del aislado clínico 563.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 3 especies diferentes, pero sus scores demuestran en definitiva una elevada diferencia entre los patrones, por tal razón adopté el score de 9 como la mejor opción al evaluar el resultado de PRA, además que los patrones de restricción tanto para HAE III como para BstEII obtenidos del PRASITE, difieren a los obtenidos en el estudio, tan solo con 5bp, distancia aceptada para emitir un diagnóstico certero (Devallos, et al, 2002). También los métodos tradicionales que evaluaron pigmentación y velocidad de crecimiento, coinciden con el patrón de PRA, por lo tanto afirmamos que la cepa es *Mycobacterium abscessus tipo 1*.

Cuadro 4.36 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 563.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>1</u>	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1	235/210/0	145/70/60	9
<u>12</u>	<i>Mycobacterium austroafricanum</i> tipo 1	235/210/0	160/60/50	16
<u>130</u>	<i>Mycobacterium phlei</i> tipo 1	235/210/0	140/80/60	16

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero el diagnóstico final de los métodos tradicionales fue que la cepa 563 es *Mycobacterium fortuitum*, resultado que no concuerdan con los patrones de restricción presentados por PRA, ni aún en las 10 especies que presenta el PRASITE para su comparación. Esto se debe a que *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium abscessus* tienen similitud en los resultados establecidos por pruebas bioquímicas, solo se diferencian en una de ellas. *Mycobacterium fortuitum* es nitratos positivo, mientras que *Mycobacterium abscessus* es nitratos negativo.

Cuadro 4.37 Patrones de restricción que presenta el PRASITE para *Mycobacterium fortuitum* tipo 1, 2, 3 y *s. acetamidolyticum*

Organismo	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
BstEII	235 / 120 / 85
HaeIII	145 / 120 / 60 / 55
Organismo	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2
BstEII	235 / 120 / 85
HaeIII	140 / 120 / 60 / 55
Organismo	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 3
BstEII	235 / 120 / 85
HaeIII	135 / 90 / 85 / 0
Organismo	<i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tipo 1
BstEII	235 / 120 / 85
HaeIII	145 / 120 / 60 / 55

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Previa a la presente explicación y al comparar los patrones de restricción de las 2 especies, optamos en diagnosticar por PRA, a la cepa 563 como *Mycobacterium abscessus* tipo 1.

4.1.17. Aislado clínico 2852

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium fortuitum*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es rápida y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B).

Los patrones de restricción, emitidos por PRA pertenecientes al aislado clínico 2852, generaron fragmentos entre 240bp y 50bp.

Tabla 4.18 Identificación por PRA, del aislado clínico 2852.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
2852 BstE II	240/210	235 / 210 / 0	<i>Mycobacterium peregrinum</i> tipo 1
2852 HAE III	150/140/100/50	145 / 140 / 100 / 50	

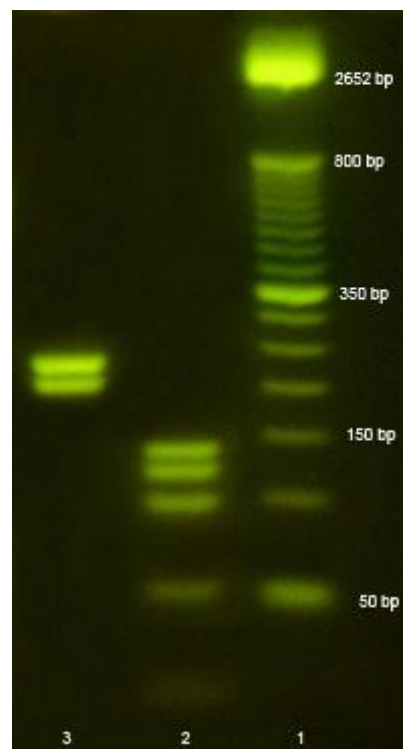


Figura 4.22 Digestión enzimática del aislado clínico 2852.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con HAEIII, Línea 3: Digestión enzimática con BstEII.

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 2 especies diferentes, pero sus scores demuestran en definitiva una elevada diferencia entre los patrones de HAE III, por tal razón adopté el score de 7 como la mejor opción al evaluar el resultado de PRA, además que los patrones de restricción tanto para HAE

III como para BstEII obtenidos del PRASITE, son idénticos a los que se identificó en el estudio. La única diferencia es un tamaño de 5pb, en el primer fragmento digerido por la enzima BstEIII. También los métodos tradicionales que evaluaron pigmentación y velocidad de crecimiento, concuerdan con el patrón de PRA, por lo tanto afirmamos que la cepa es *Mycobacterium peregrinum tipo 1*.

Cuadro 4.38 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 2852.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>127</u>	<i>Mycobacterium peregrinum</i> tipo 1	235/210/0	145/140/100	7
<u>138</u>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> tipo 1	235/210/0	145/130/95	13
<u>128</u>	<i>Mycobacterium peregrinum</i> tipo 2	235/210/0	140/125/100	19

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

No se trata de *Mycobacterium scrofulaceum tipo 1*, porque su fenotipo no coincide con las características emitidas. *Mycobacterium scrofulaceum tipo 1* es de crecimiento lento y escotocromógeno y el aislado clínico 2852 caracterizado como *Mycobacterium peregrinum tipo 1* es no pigmentado y de crecimiento rápido.

Pero el diagnóstico final de los métodos tradicionales fue que la cepa 2852, no presentaron reporte final.

4.1.18. Aislado clínico 519

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium avium complex*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es lenta y la característica de pigmentación es: escotocromógena. (ANEXO B).

Los patrones de restricción, emitidos por PRA pertenecientes al aislado clínico 519, generaron fragmentos entre 245bp y 105bp.

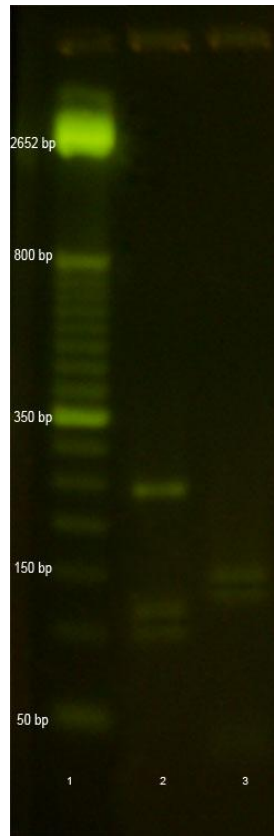


Figura 4.23 Digestión enzimática del aislado clínico 519.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.19 Identificación por PRA, del aislado clínico 519.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
519 BstE II	245/120/105	235 / 120 / 100	<i>Mycobacterium lentiflavum tipo 3</i>
519 HAE III	150/140/0	145 / 130 / 0 / 0	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron a 3 especies diferentes, pero sus scores demuestran en definitiva una elevada diferencia entre los patrones de BstEII, por tal razón adopté el score de 16 como la mejor opción al evaluar el resultado de PRA.

Cuadro 4.39 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 519.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>97</u>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 3	235/120/100	145/130/0	16
<u>145</u>	<i>Mycobacterium sherrisii</i> tipo 1	235/120/85	145/130/0	25
<u>150</u>	<i>Mycobacterium simiae</i> tipo 3	235/130/85	145/130/0	27

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cabe destacar que el fenotipo del aislado 519 concuerda con el genotipo generado por PRA. No realizamos mayores comparaciones entre las 2 especies *Mycobacterium sherrisii* tipo 1 y *Mycobacterium simiae* tipo 3, porque presentan un score mucho mayor que se aleja del resultado óptimo.

Pero el diagnóstico final de los métodos tradicionales fue que la cepa 519 es *Mycobacterium avium* complex, resultado que emiten las pruebas bioquímicas porque *Mycobacterium intracellulare*, miembro del MAC presenta pruebas de positividad iguales a las de *Mycobacterium lentiflavum* como por ejemplo catalasa y pirazinamidasas; de igual forma ocurre con las pruebas negativas a acumulación de niacina, reducción de nitratos, hidrólisis de tween 80, arilsulfatasa y ureasa (NCBI MEDLINE).

Al comparar los patrones de restricción de *Mycobacterium intracellulare* vs *Mycobacterium lentiflavum* tipo 3, no existe mayor diferencia y por tal compatibilidad entre estas especies las pruebas bioquímicas emitieron el diagnóstico referido, pero la adopción correcta en base al análisis del gen *hsp65* es la que se menciona con anterioridad.

Cuadro 4.40 Patrones PRA para *Mycobacterium lentiflavum* tipo 3

Organismo	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tipo 3
BstEII	235 / 120 / 100
HaeIII	145 / 130 / 0 / 0

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Cuadro 4.41 Patrones PRA para *Mycobacterium intracellulare* tipo 1

Organismo	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1
BstEII patrón	235 / 120 / 100
HaeIII patrón	145 / 130 / 60 / 0

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

4.1.19. Aislado clínico 620

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología, cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium chelonae*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es rápida y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B).

Los patrones de restricción, emitidos por PRA pertenecientes al aislado clínico 620, generaron fragmentos entre 240bp y 55bp

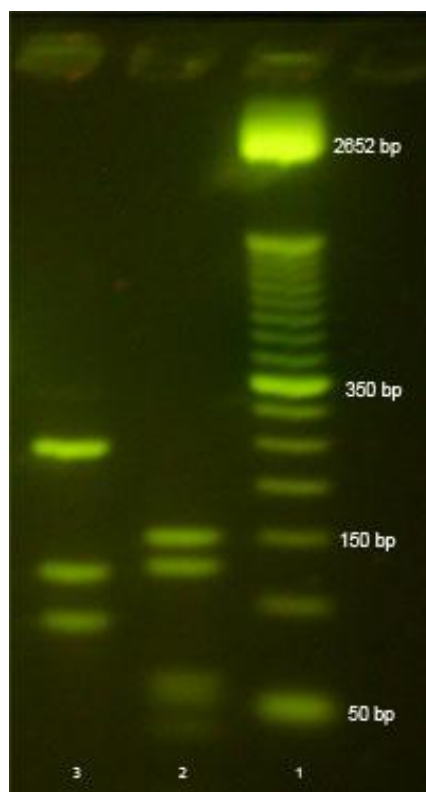


Figura 4.24 Digestión enzimática del aislado clínico 620.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con HAEIII, Línea 3: Digestión enzimática con BstEII.

Tabla 4.20 Identificación por PRA, del aislado clínico 620.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
620 BstE II	245/120/85	235 / 120 / 85	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>
620 HAE III	150/120/60	145 / 120 / 60 / 55	

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron 2 scores del mismo valor (11) y un score de pequeña diferencia en comparación con los primeros (14). El resultado que emitió el PRASITE indica que las 3 especies son las mismas solo difieren en la subespecie y el tipo. Por ende coinciden con el fenotipo.

Adopté *Mycobacterium fortuitum tipo 1* por ser la especie con mayor frecuencia epidemiológica en comparación con *Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum* tipo 1, además que tomé en consideración la patogenia. *Mycobacterium fortuitum* tipo 1 ha sido frecuentemente asociada a infecciones cutáneas, mientras que *Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum* tipo 1, se caracteriza por causar infecciones pulmonares (Leão, 2004). El aislado clínico provino de un absceso cerrado de tejido cutáneo.

Cuadro 4.42 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 620.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
48	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1	235/120/85	145/120/60	11
51	<i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tipo 1	235/120/85	145/120/60	11
49	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2	235/120/85	140/120/60	14

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero el diagnóstico molecular no coincide con el diagnóstico tradicional el cual evalúa al aislado clínico 620 como *Mycobacterium chelonae*. Y como se muestra en la figura 4.24, los patrones emitidos por PRA que representan a *Mycobacterium fortuitum tipo 1*, difieren con amplio rango a los patrones de *Mycobacterium chelonae*,

Cuadro 4.43 Patrones PRA de *Mycobacterium chelonae*

ID	28
Organismo	<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1
BstEII patrón	320 / 130 / 0
HaeIII patrón	200 / 60 / 55 / 50
Fenotipo	Rápido / no pigmentado

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Por tanto afirmamos que *Mycobacterium fortuitum tipo 1*, es el diagnóstico correcto. La discusión para abordar el diagnóstico sobre las pruebas tradicionales es el mismo que en los anteriores casos.

4.1.20. Aislado clínico 3262

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium abscessus*. Se reportó que la velocidad de crecimiento de la cepa es rápida y la característica de pigmentación es: no pigmentada. (ANEXO B).

Los patrones de restricción, emitidos por PRA pertenecientes al aislado clínico 3262, generaron fragmentos entre 240bp y 60bp

Tabla 4.21 Identificación por PRA, del aislado clínico 3262.

 AISLADO CLÍNICO	 IDENTIFICACIÓN PRA	 IDENTIFICACIÓN PRASITE	 CEPA IDENTIFICADA
3262 BstE II	240 / 120 / 85	235 / 120 / 85	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 2</i>
3262 HAE III	140 / 120 / 60	140 / 120 / 60 / 55	

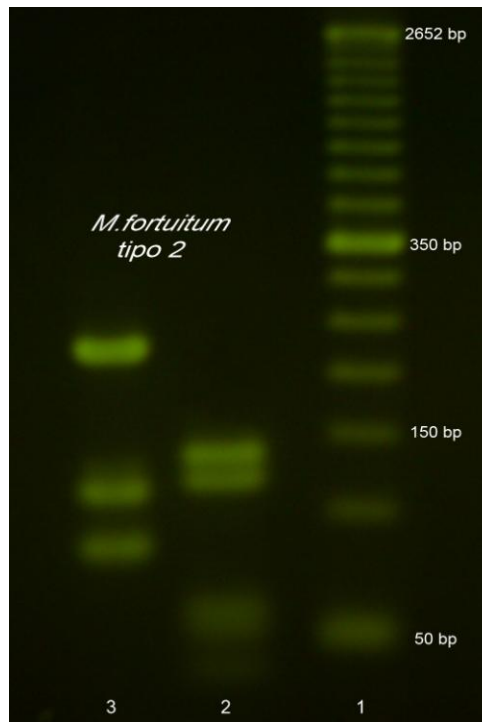


Figura 4.25 Digestión enzimática del aislado clínico 3262.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con HAEIII, Línea 3: Digestión enzimática con BstEII.

Los fragmentos de restricción generados por cada enzima identificaron 3 scores diferentes, determinando 3 especies. El resultado que emitió el PRASITE con el menor score es 5, representando a la especie *Mycobacterium fortuitum tipo 2*, dicha especie coincide en el fenotipo revelado con anterioridad.

Adopté *Mycobacterium fortuitum tipo 2* por ser la especie con mayor frecuencia epidemiológica en comparación con *Mycobacterium conceptionense tipo 1*, además que tomé en consideración la patogenia, *Mycobacterium conceptionense tipo 1* ha sido frecuentemente asociada a inflamaciones de huesos; mientras que *Mycobacterium fortuitum tipo 2*, se caracteriza por causar infecciones post operatorias afectando en general a los tejidos blandos (Leão, 2004). El asilado clínico provino de una paciente que después de realizarse una cirugía plástica fue contaminado en su glúteo por *Mycobacterium fortuitum tipo 2*.

Cuadro 4.44 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 3262.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
49	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 2	235/120/85	140/120/60	5
34	<i>Mycobacterium conceptionense</i> tipo 1	235/120/85	140/125/60	7
44	<i>Mycobacterium farcinogenes</i> tipo 1	235/120/85	140/125/60	7

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero el diagnóstico molecular no coincide con el diagnóstico tradicional. Los métodos tradicionales diagnosticaron al aislado clínico 3262 como *Mycobacterium abscessus*. Y como se muestra en la figura 4.25, los patrones emitidos por PRA que representan a *Mycobacterium fortuitum* tipo 2, difieren con amplio rango a los patrones de *Mycobacterium abscessus*,

Cuadro 4.45 Patrones de restricción que presenta el PRASITE para *Mycobacterium abscessus* tipo 1 y 2

Organismo	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 1
BstEII patrón	235 / 210 / 0
HaeIII patrón	145 / 70 / 60 / 55
Organismo	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 2
BstEII patrón	235 / 210 / 0
HaeIII patrón	200 / 70 / 60 / 50
Fenotipo	Rápido / No pigmentado

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

En esta ocasión se solicitó al HVQ, volver a realizar la prueba de nitratos mediante la cual se diferencia por medios bioquímicos si se trata de *Mycobacterium fortuitum* o *Mycobacterium abscessus*. Si presenta nitratos positivo es *Mycobacterium fortuitum* y si presenta nitratos negativo es *Mycobacterium abscessus*; al repetir la prueba se determinó que era nitrato positivo, el problema radica que el reactivo de nitratos estaba caducado en la primera realización de la prueba.

Gracias a la repetición de la prueba bioquímica que confirma el diagnóstico emitido por PRA, se puede afirmar que el aislado clínico es *Mycobacterium fortuitum* tipo 2.

4.1.21. Aislado clínico 3344

Esta muestra presenta una particular peculiaridad, debido a que el HVQ, la diagnosticó como posible nocardia o especie del género *Mycobacterium*. No se tiene datos de las características de crecimiento y pigmentación, pero se analizó mediante el método molecular PRA.

Esta especie no tubo producto de amplificación del gen *hsp65*, por lo tanto no es una especie perteneciente al género *Mycobacterium*, ni inclusive es Nocardia. Debido a que los primers Tb11 y Tb12, cebadores utilizados en PRA; se caracterizan por identificar especies de la familia Mycobacteriaceae y Nocardiaceae del orden de los Actinomycetales, pero esta especie no produjo amplificación, por lo tanto se descarta que sea micobacteria y tampoco es nocardia. Para confirmar el resultado analizamos la calidad de ADN, el aislado 3344 posee una buena calidad de ADN, mayor al rango establecido de 1.5. Efectivamente tenemos una presencia de ADN de 1.64 y su concentración es de 307.7(ug/ml). Entonces descartamos la posibilidad de una mala extracción de ADN, y confirmamos el diagnóstico emitido por PRA.

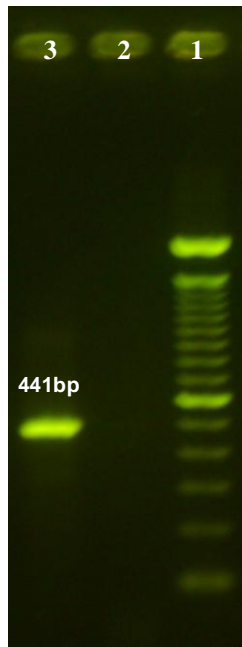


Figura 4.26 Digestión enzimática del aislado clínico 3344.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Producto de amplificación del gen *hsp65* Primers Tb11 y Tb12. Aislado clínico 3344. Línea 3: Producto de amplificación del gen *hsp65* Primers Tb11 y Tb12. (Control positivo. *M. avium* ATCC 25291)I,

4.1.22. Aislado clínico 223

Esta especie no se logró determinar por PRA, porque posiblemente en el cultivo se encontraban 2 especies del mismo fenotipo por ello al digerir el producto de amplificación del gen *hsp65* de 441pb, se emiten patrones de restricción superiores a 441bp (De Waard, 2006).

Tabla 4.22 Identificación por PRA, del aislado clínico 223.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
223 BstE II	450/250/130/120	No concuerda ningún patrón	<i>No identificable</i>
223 HAE III	150/130/60		

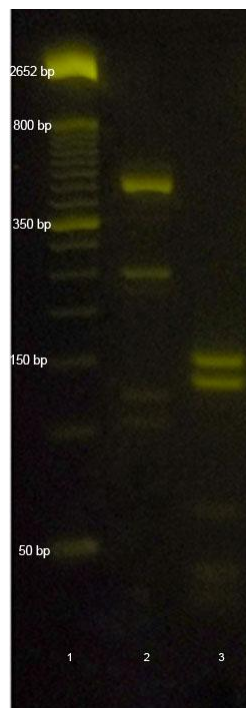


Figura 4.27 Digestión enzimática del aislado clínico 223.

Línea 1: Marcador Molecular de 25bp a 500bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

El problema no se enfoca en una posible mala digestión de la enzima BstEII, porque se comprobó en 3 ocasiones los mismos patrones de restricción, los cuales se realizaron sin variación de condiciones tanto de temperatura como de asepsia. La suma de los fragmentos de restricción para este caso es de 950bp para BstE II, este valor implica que existen 2 especies del mismo tipo y con características fenotípicas iguales, que no presentaron rasgos de diferencia en el cultivo y por ello se subestimó que era una especie pura (De Waard, 2006).

En relación a los patrones de HAE III, presenta los patrones de restricción válidos para el proceso digestivo, pero sin la concordancia de los patrones emitidos por las 2 enzimas no se logra dar un diagnóstico correcto y en vista a la contaminación del cultivo no se puede llevar a cabo la técnica molecular PRA.

Lo adecuado sería realizar otra extracción de ADN, pero no se puede realizarla, porque es la única cepa que se disponía y está contaminada.

4.1.23. Aislado clínico 523

Las herramientas estándares microbiológicas caracterizaron el aislado clínico 523 como *Mycobacterium gordonae*. Estas herramientas emitieron características de crecimiento rápido y su característica de pigmentación: no pigmentada (Anexo B)

Los patrones de restricción emitidos por PRA, generaron patrones entre 320bp a 55p cuyo análisis determinó que se la cepa es *Mycobacterium mucogenicum* tipo 2.

Tabla 4.23 Identificación por PRA, del aislado clínico 523.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
523 BstE II	320/120	320 / 115 / 0	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> tipo 2
523 HAE III	145/65/60	145 / 65 / 60 / 0	

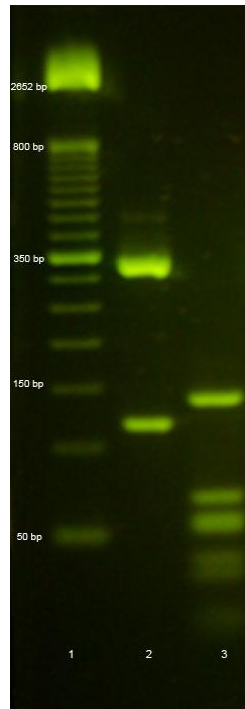


Figura 4.28 Digestión enzimática del aislado clínico 523.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Cuadro 4.46 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 523.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>6</u>	<i>Mycobacterium arupense tipo 1</i>	320/115/0	145/75/60	7
<u>109</u>	<i>Mycobacterium mucogenicum tipo 2</i>	320/115/0	145/65/60	7
<u>131</u>	<i>Mycobacterium phocaicum tipo 1</i>	320/115/0	145/65/60	7

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

El análisis radica en diferenciar las 3 especies que presentan el mismo score, pero difieren en las características fenotípicas. *Mycobacterium arupense* tipo 1 es de lento crecimiento y no pigmentada; *Mycobacterium mucogenicum* tipo 2 es de rápido crecimiento y no pigmentada y *Mycobacterium phocaicum* tipo 1 es de rápido crecimiento y no pigmentada.

Según las características fenotípicas se elimina automáticamente *Mycobacterium arupense* tipo 1. Y se adopta *Mycobacterium mucogenicum* tipo 2

debido al criterio de patogenicidad del aislado clínico, *Mycobacterium mucogenicum* puede ser aislado de infecciones en la piel, de catéteres y aislados respiratorios de pacientes portadores de VHI (Leão, 2004). El aislado clínico 523 provino de un aislado de piel. Los métodos tradicionales emitieron un diagnóstico no concordante con el método molecular debido a que son pocas las pruebas bioquímicas se realizan para la identificación de *M. mucogenicum*, y algunas de ellas en el algoritmo de identificación de las pruebas bioquímicas no presentan datos.

4.1.24. Aislado clínico 555

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium chelonae*. Además como datos adicionales se reportaron la velocidad de crecimiento de la cepa y la pigmentación. Para el presente caso la velocidad de crecimiento fue rápida. La característica de pigmentación fue escotocromógena. Y fue aislada de líquido cefaloraquídeo LCR.

Según el método molecular PRA, el aislado clínico 555 generó patrones entre 235bp y 60p.

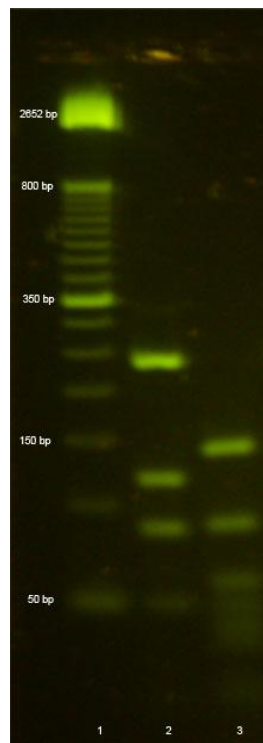


Figura 4.29 Digestión enzimática del aislado clínico 555.
Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3:
Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.24 Identificación por PRA, del aislado clínico 555.

AISLADO CLÍNICO	IDENTIFICACIÓN PRA	IDENTIFICACIÓN PRASITE	CEPA IDENTIFICADA
555 BstE II	235/125/85	235 / 130 / 85	<i>Mycobacterium hodleri tipo 1</i>
555 HAE III	145/90/60	140 / 80 / 60 / 0	

Los fragmentos de restricción generados para el aislado clínico 555, muestran que se trata de 3 especies diferentes, con mínimas diferencias entre los score. La especie que muestra el patrón mas cercano a la adopción de un diagnóstico certero es *Mycobacterium murale* tipo 1 que presenta un score de 15 y con solo 1 punto de diferencia se encuentra *Mycobacterium hodleri* tipo 1, con un score de 16. Como se puede apreciar las 2 especies presentan fragmentos restrictivos semejantes, por lo tanto para tomar una decisión correcta revisamos las características de pigmentación y velocidad de crecimiento, establecidas por el HVQ.

Mycobacterium murale tipo 1 es una bacteria de rápido crecimiento y su tipo de pigmentación es no pigmentada, por lo tanto descartamos que sea esta especie, de igual forma prescindimos de *Mycobacterium alvei* tipo 1, porque es una bacteria de rápido crecimiento y su tipo de pigmentación es no pigmentada, mientras que *Mycobacterium hodleri* tipo 1 es una bacteria de rápido crecimiento y escotocromógena, concordando con las características que enunciaron los técnicos del HVQ. El estudiar su patogenicidad se dice que esta micobacteria ha sido asociada con infecciones oportunistas de pacientes que presentan artritis reumatoide, dato que fue establecido por la revista “ayudando a doctores ha tomar la mejor decisión”.

Cuadro 4.47 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 555.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>111</u>	<i>Mycobacterium murale</i> tipo 1	235/130/85	145/80/60	15
<u>73</u>	<i>Mycobacterium hodleri</i> tipo 1	235/130/85	140/80/60	16
<u>5</u>	<i>Mycobacterium alvei</i> tipo 1	235/130/85	145/100/50	18

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Pero la identificación realizada por el método PRA, no coincide con los métodos tradicionales que designan al aislado clínico 555 como *M. chelonae*

Cuadro 4.48 Patrones de restricción de *Mycobacterium haemophilum* tipo 1

Organismo	<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1
BstEII patrón	320 / 130 / 0
HaeIII patrón	200 / 60 / 55 / 50
Fenotipo	Rápida y no pigmentada

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

La explicación que validamos a la diferencia del diagnóstico se debe principalmente a que PRA, cuenta con 175 patrones que permiten la comparación de resultados entre la diversidad de especies, subespecies y tipos de especies del género *Mycobacterium*, mientras que los algoritmos de las pruebas bioquímicas, específicamente el algoritmo que utiliza el HVQ, identifica únicamente a 42 especies del género *Mycobacterium*, no pudiendo identificar los tipos de estas especies.

Además de presentar una limitación en la identificación de la diversidad de especies, los métodos tradicionales presentan dificultades en determinar nuevas especies, tal es el caso de *Mycobacterium hodleri*, que fue aislada en 1996.

4.1.25. Aislado clínico 386

Según los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología y cultivo); fue caracterizado como *Mycobacterium avium intracellulare*. Además como datos adicionales se reportaron la velocidad de crecimiento de la cepa y la pigmentación. Para el presente caso la velocidad de crecimiento fue rápida. La característica de pigmentación fue no fotocromógena.

Según el método molecular PRA, el aislado clínico 386 generó patrones entre 445bp y 170bp.

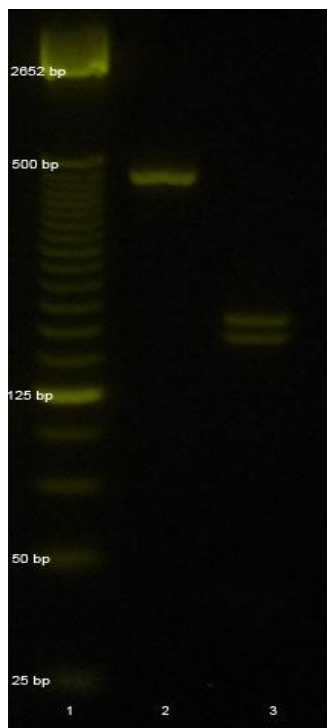


Figura 4.30 Digestión enzimática del aislado clínico 386.

Línea 1: Marcador Molecular de 50bp a 800bp, Línea 2: Digestión enzimática con BstEII, Línea 3: Digestión enzimática con HAEIII.

Tabla 4.25 Identificación por PRA, del aislado clínico 386.

 AISLADO CLÍNICO 	 IDENTIFICACIÓN PRA 	 IDENTIFICACIÓN PRASITE 	 CEPA IDENTIFICADA
386 BstE II	440/0 /0	No identificable	<i>No identificada</i>
386 HAE III	185/170		

Los fragmentos de restricción generados para el aislado clínico 386, muestran que se trata de 3 especies diferentes, con amplias diferencias entre los score. La especie que muestra el patrón mas cercano a la adopción de un diagnóstico certero es *Mycobacterium gilvum tipo 1*, que presenta un score de 25. Pero a pesar de que esta especie sea el resultado que adopta el PRASITE, no concuerda con los patrones obtenidos en nuestra investigación, concuerda en el patrón de BstE II, pero no en los de HAE III, por lo tanto no se puede afirmar que el aislado clínico 386 presente

Mycobacterium gilvum tipo 1. A pesar de que su fenotipo concuerde con la cepa 386. La diferencia entre los patrones del PRA es de 35bp, y esta distancia no se encuentra aceptada para la emisión de un diagnóstico certero.

Cuadro 4.49 Diferentes scores que presenta el PRASITE para el aislado clínico 386.

ID	Especies	BstE II	Hae III	Score
<u>57</u>	<i>Mycobacterium gilvum</i> tipo 1	440/0/0	180/145/0	25
<u>162</u>	<i>Mycobacterium triviale</i> tipo 1	440/0/0	170/130/0	43
<u>46</u>	<i>Mycobacterium florentinum</i> tipo 1	440/0/0	145/130/0	57

Fuente: PRASITE. (<http://app.chuv.ch/Prasite/index.html>)

Una de las posibles respuestas a la interrogante de esta cepa clínica era, que la digestión de HAE III, fue parcial, premisa que fue negada al realizar por 3 ocasiones todo el proceso obteniéndose el mismo resultado, negamos una posible contaminación del cultivo porque no presentamos fragmentos de restricción que evidencien la presencia de las de una especie micobacteriana, y afirmamos que es una especie no identificada por el método molecular PRA, por lo tanto se debe mandar el aislado clínico 386 a ser analizado por secuenciación.

4.2. DISCUSIONES GENERALES

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) adquieren cada día mayor importancia en la patología humana. La incidencia de brotes e infecciones asociadas con MNT ha aumentado dramáticamente durante el último decenio. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha registrado un significativo aumento del porcentaje de infecciones por micobacterias no tuberculosas (Mondragón, 2000). Por las razones expuestas, mejores métodos diagnósticos son indispensables para la detección e identificación de estos patógenos. Debido a esto en la presente investigación se ha realizado una comparación entre los métodos bioquímicos convencionales y un algoritmo de diagnóstico molecular basado en PRA. En el presente trabajo se encontró que el poder discriminatorio de PRA es cualitativamente superior para la detección de micobacterias.

Tradicionalmente, la identificación de micobacterias a nivel de especie se ha basado en pruebas bioquímicas que requieren de tres a seis semanas para obtener resultados. Estos métodos pueden ofrecer una identificación errónea de la especie, incluso si los realiza un experto en laboratorio microbiológico. Las debilidades de las pruebas bioquímicas son: poco reproducibles, reportan fenotipos que no son absoluta propiedad de la especie, pero pueden mostrar una variabilidad sustancial en la diferenciación de la especie este factor sería la causa potencial de las discrepancias encontradas en los casos evaluados en el presente estudio. (Valdez & Cid, 2004).

Estas diferencias también han sido demostradas por estudios realizados por laboratorios de referencia de micobacterias. Entre las principales publicaciones y laboratorios debemos mencionar a Chimara et al., 2008 del Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil; Arayala et al., 2006 del Instituto de Salud Pública de Chile. Unidad de Desarrollo y Sección de micobacterias; De Waard, 2006 del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Caracas, Venezuela; Leaô et al, 2005 del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; Da silva et al, 2001 del Departamento de Microbiología, Inmunología e Parasitología - Universidade Federal de São Paulo, Brazil; Mondragón et al., 2000 del Departamento de Biología Molecular y Departamento de Micobacterias, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México, D.F., México; Oliveira et al., 2000 del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología,

Universidade Federal de São Paulo y Springer et al., 1996 del Instituto de Medicina y Microbiología de Hannover, Alemania. Todos estos autores coinciden que el método PRA, es un método más específico y sensible, ya que identifica correctamente más del 90% de aislados clínicos, incluidos aislados clínicos de nuevas cepas que surgen por el advenimiento de la pandemia del SIDA (Chimara et al., 2008).

El análisis de la restricción enzimática de los productos de PCR del género *Mycobacterium* es específico para la especie gracias al polimorfismo del gen *hsp65*. PRA, presenta un amplio poder discriminatorio, poder que es utilizado para diagnóstico de evaluaciones taxonómicas y caracterización de cepas de características novel, PRA ha logrado identificar hasta el momento 96 especies (Oliveira, 2000). La técnica molecular PRA es un método rápido de tan solo 2 días, que reduce el tiempo para la identificación de micobacterias no tuberculosas. Existen métodos alternativos como la cromatografía en capa fina, cromatografía gas- líquido, cromatografía líquida de alta resolución y secuenciamiento del gen 16S ARNr, herramientas útiles y poderosas que han identificado varias especies de micobacterias. Sin embargo, su uso está limitado por el excesivo costo de los equipos, por esta razón es importante el desarrollo del método PRA, debido a que proporciona resultados óptimos atendiendo un valor económico no costoso (Devallois et al., 2002). El análisis de patrones de restricción es un método alternativo, simple y económico, que puede ser implementado en forma rutinaria en los laboratorios de referencia de micobacterias (Araya, 2006).

La viabilidad y certeza de los estudios que afirman que PRA es más específico que los métodos tradicionales ha sido demostrada por otra herramienta molecular, hablamos de la secuenciación del gen *hsp65*. Un estudio realizado recientemente por Chimara et al., estudio en el que se compara PRA vs secuenciación. Se analizaron 434 muestras de las cuales solo 4 patrones no coincidían con la secuenciación, esto se debe a que PRA, no reporta variantes alélicas. PRA, presenta un margen de error en el diagnóstico de tan solo 1.2% en comparación con métodos de secuenciación (Chimara et al., 2008). Este estudio demuestra entonces que PRA, es un método de diagnóstico confiable para la identificación de micobacterias a nivel de especie, capaz de ser utilizado por todo laboratorio clínico, bacteriológico y microbiológico.

Conuerdo con Springer et al., 1996, que otra de falencias de las pruebas tradicionales es que se limita a caracterizar especies comunes, más no posee pruebas

que discreticen las especies actualmente descubiertas, este es el caso del aislado clínico 555 que presenta *Mycobacterium holderi* tipo 1. En respuesta a estas limitaciones, se ha adoptado PRA como método de identificación, aunque no es el único método de identificación, también se destacan otros métodos como análisis de lípidos, sondas de ácido nucleico, análisis de los genes de choque térmico, secuencia de ADN y análisis de los genes rRNA (Covert, 1999).

Otro punto que se debe analizar son las razones por las cuales existió discrepancias diagnósticas entre el método molecular y tradicional, una de ellas, se atribuye a la presencia de más de una especie micobacteriana en el cultivo original, hablamos de 2 especies que presentan el mismo fenotipo, esta presencia múltiple, se verá reflejada al momento de analizar los patrones de restricción, puesto que tendremos más de 455bp procedentes de las 2 especies o más que se hayan encontrado en el cultivo. Estas investigaciones han sido publicadas con anterioridad por Hafner et al, 2004 y se lo discutió con el aislado clínico 223. Este aislado clínico, en el cual PRA determinó que se trata de una posible contaminación de dos especies del mismo fenotipo, resultado que no puede ser detectado por una prueba bioquímica ni morfológica y es absolutamente comprobado que ofrecerán diagnósticos erróneos.

En el presente estudio se tuvieron patrones concordantes con el banco de patrones emitido por el PRASITE, sin embargo en algunos casos se presentaban tamaños de fragmentos con un margen de diferencia entre 5 y 10bp, mínima diferencia aceptada para la emisión de resultados según Devallos et al. Experiencias similares fueron reportadas por varios autores que utilizaron este método, todos establecen que la diferencia puede atribuirse a la forma de medición según la disponibilidad del laboratorio, laboratorios con alta tecnología utilizan un analizador de fluorescencia, (Molecular Dynamics, Inc, Sunnyvale), con ImageQuant que posee programas de ordenador (versión 4,2; Molecular Dynamics); versus la práctica comunicada por Telenti et al., quien emitió sus resultados en base a la distancia visual y redondeo en el tamaño más cercano, pero estableciendo un margen de redondeo de máximo 5 pb. Este método visual se adoptó en mi investigación debido a la falta de disponibilidad del equipo, pero los resultados fueron comparados con el PRASITE, obteniendo resultados concordantes.

Concuerdo también que estas mínimas diferencias se establecen porque no se ha logrado uniformidad a nivel mundial en el margen exacto de la presentación de resultados de PRA, debido a la diversidad de protocolos establecidos (condiciones de corrida electroforética y porcentaje de agarosa usada, variables que no han sido estandarizadas en el uso de PRA); pero, cabe destacar que a pesar de la no estandarización de protocolos, todas las investigaciones concuerdan con un límite de 10bp de diferencia para la emisión de resultados (Yzquierdo et al, 2007).

Los resultados obtenidos en este estudio son confiables, comprobándose la estandarización del método y la viabilidad del mismo en cepas ATCC, presentando una concordancia total (100%) en la emisión de resultados, tanto por el método molecular PRA como por los métodos tradicionales, métodos en los cuales las baterías bioquímicas, análisis morfológico a través de cultivo, pigmentación y velocidad de crecimiento, son la base de la metodología diagnóstica tradicional.

A diferencia de la concordancia diagnóstica para controles ATCC, los aislados clínicos presentaron únicamente el 27,58% de concordancia total, valores establecidos al comparar el método molecular PRA y los métodos tradicionales, motivo por el cual realicé una discusión deductiva y particular para cada aislado clínico, presentando los argumentos específicos que demuestren el proceso para la toma de decisión en la adopción diagnóstica de los mismos, evaluando el resultado emitido por los métodos tradicionales y el resultado emitido por el método molecular PRA. Destaco también que para confirmar mis resultados y descartar toda posibilidad de duda, se realizaron 3 repeticiones de todo el proceso investigativo, obteniendo el mismo resultado en cada uno de los aislados clínicos.

Finalmente, la optimización del método molecular PCR- Restriction Enzyme Análisis (PRA) se sustentó en establecer un solo protocolo que abarca tres procesos diferentes: extracción de ADN, amplificación del gen *hsp65* y digestión enzimática; con la finalidad de atender la disponibilidad de costo-beneficio, debido a que nuestro medio investigativo es limitado, principalmente en la adquisición de enzimas de restricción. De igual forma se consideró la disponibilidad de eficiencia de tiempo, intervalo que es importante principalmente en el proceso de digestión enzimática (De Waard, 2006).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Este estudio determinó que el poder discriminatorio de PCR Restriction Enzyme Análisis (PRA) es cualitativamente superior para la detección de micobacterias. Además la técnica molecular es más específica, rápida y eficaz en comparación con métodos clásicos: morfológicos y bioquímicos, de identificación micobacteriana.

Los resultados indican que las baterías de reacciones bioquímicas y el análisis morfológico, herramientas tradicionales para la identificación de MNT, pueden subestimar la complejidad del género *Mycobacterium*, debido a la homogeneidad del fenotipo de las especies y a las secuencias homólogas que se presentan entre las especies, reportando resultados no certeros.

PRA es un método específico basado en el análisis polimórfico del gel *hsp65*, método eficiente y asequible que debe ser considerado por cualquier laboratorio de microbiología clínica para la identificación de especies MNT.

PRA es una técnica molecular implementada como alternativa diagnóstica debido a la ausencia de medios de diagnósticos rápidos, sencillos y precisos. PRA presenta resultados en solo 2 días a diferencia de los métodos tradicionales que presentan resultados de 3 a 6 semanas.

PRA, gracias a su poder discriminativo, ofrece la oportunidad de identificar género, especie, sub especie y tipo de cepa, a diferencia de los métodos tradicionales que identifican género y especie.

PRA, tiene la ventaja de discretizar especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* de micobacterias no tuberculosas (MNT), gracias al análisis de patrones de restricción. Pero, PRA presenta la desventaja de no identificar la especie del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Sobre la base de mi experiencia práctica, ratifico que dado que el diagnóstico de MNT sigue siendo un desafío para la administración de la terapia adecuada, la técnica de diagnóstico molecular PCR Restriction Enzyme Análisis (PRA), tiene el

potencial de proporcionar al personal médico resultados más exactos y en menor tiempo para la adopción de un tratamiento óptimo para el paciente.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

- Siendo las micobacterias atípicas, patógenos causantes de enfermedades infecciosas emergentes, es importante que el Ecuador considere al método molecular PRA, como alternativa diagnóstica confiable, rápida y eficaz. Se recomienda a los laboratorios clínicos a nivel general implementar esta certera técnica y más aún, a los laboratorios de referencia de micobacterias.
- Es importante en un futuro realizar un estudio epidemiológico privadas con el fin de determinar la prevalencia real de micobacterias atípicas en el país. Recomiendo que para este estudio se derribe barreras entre instituciones públicas y privadas. Para ello es recomendable que el Ministerio de Salud realice una cláusula obligatoria de reporte de casos de micobacteriosis en el país. Debido a que en nuestros días es normal no evidenciar los casos atípicos en el Ecuador.
- Es necesario dar continuidad a este tipo de investigaciones pioneras en nuestro país y de gran interés social y científico. El vasto campo de la investigación, presenta grandes desafíos para los laboratorios tradicionalistas que no ven más allá de pruebas caducas e ineficientes. Las herramientas moleculares son poderosas armas que han transformado nuestra capacidad de diagnosticar a los agentes infecciosos, es importante que el Ecuador se una a esta ola del advenimiento del diagnóstico molecular.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Alcaide, F., Richter C., Bernasconi B., Springer, C., Hagenau, R., Schulze-Robbecke E., Tortoli, R., Martin, E., Bottger, C., & Telenti, A. (1997).

Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. J Clin Microbiol 35, 1959 – 1964.

American Thoracic Society. (2002). Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons. Recommendations of the US Public Health Service and the Infectious Disease Society of America. [Electronic Version], 51, 1-46.

American Thoracic Society. (1997). Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. J. Respir. Crti Care Med Dis. [Electronic Version], 156, 1-25.

Arasteh, K., Cordes, C., Ewers, & M., et al. (2000). HIV-related nontuberculous mycobacterial infection: incidence, survival analysis and associated risk factors. Eur J Med Res, 5, 424-430.

Arayala, P., Velasco M., & Fernández J. (2006). Identificación Rápida de micobacterias mediante análisis de patrones de restricción. Rev. Med. Chile, 132, (7), 1-9.

Bartralot, R., García-Patos, V., Sítjas, D., Rodriguez Cano, L., Mollet, J., Martín-Casanova, N., Coll, P., Castells, A., & Pujol, R.M. (2005). Clinical patrons of cutaneous. Br J Dermatol, 152, 727-734.

Bartralot, R., Pujol, R.M., García-Patos, V., Sítjas, D., Martín- Casanona, N., Coll P., Alomar, A., & Castells, A. (2000). Cutaneous Infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal host. J Cutan Pathol, *27*, 124-127.

Brunello, F., Ligozzi, M., Cristelli, E., Bonora, S., Tortoli, E., & Fontana, R. (2001). Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp 65 gene. J Clin Microbiol, *39*, 2799-806.

Caminero, JA., Medina, M.V., Rodríguez de Castro, & F., Cabrera, P. (1998). Manual de Neumología y Cirugía Torácica. Madrid: Editores Médicos SA. Capítulo 83. (pp. 1389).

Casal Manuel, Casal María. (2000). Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. Centro de Referencias de Micobacterias Facultad de Medicina Universidad de Córdoba Enf Emerg, *2*, (4), 220-230

Castro, C., Puerto, G., García, L., Orjuela, D., Llerena, C., Garzón, M., & Ribón W., (2007). Molecular Identification of non-tuberculous mycobacteria. Biomédica, *27*, (3), 439-446.

Chimara, E., Ferrazoli L., Yoko, L., Conceição, M., Mitchel, A., Arbeit, R., & Leão, S. (2008). 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* patróns. BMC Microbiology .8, 1-12.

Covert, T., Rodgers, M., Reyes A., Gerald D., & Stelma, G. (1999). Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples. National Exposure Research Laboratory, U.S.,65,(6), 2492–2496.

Coyle, M., Carlson, L., Wallis K., Leonard, R., Raisys, J., Kilburn M., Samadpour, M., & Bottger, C. (1992). Laboratory aspects of *Mycobacterium genavense* a proposed species isolated from AIDS patients. J Clin Microbiol, 30, 3206 -32012.

Da Silva, C., Yoko, S., Cássia Pires D. & Leão, S. (2001). *hsp65* PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 43, (1), 25-28

De Beenhouwer, H., Z. Liang, P., De Rijk, C., Van Eekeren, & F. Portaels, (1995). Detection and identification of mycobacteria by ADN amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridation. J Clin Microbiol 33, 2994-8

Devallois, A., Seng, K., & Rasogi, N. (2002). Rapid identification of *Mycobacterium* to Species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp 65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 Mycobacterial Species. J Clin Microbiol, 35, 2969-73.

De Waard, Jacobus (2006). Protocolo para la identificación de micobacterias atípicas por PRA del Instituto de Biomedicina del Laboratorio de Tuberculosis de la Universidad Central de Caracas, Venezuela.

Eisenach, K.D., Cave, M.D., & Crawford, J.T. (1993). PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 191–196

Ferreira, R., Saad, M., & Da Silva, C. (2002). Non-tuberculous micobacteria I: One year clinical isolates identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, In Pre Highly Active Antiretroviral Therapy Era. Mem Inst Oswaldo Cruz, 97, 725-729.

Fiss, E., Chehab, H., & Brooks, G. (1992). DNA amplification and reverse dot blot hybridation for deletion and identification of micobacteria to the Especies level in the clinical laboratory. J Clin Microbiol, 30, 1220-1224.

García, J., Palacios J., & Sánchez A. (2005). Respiratory Infections Caused by Environmental Mycobacteria. Arch Bronconeumol, 41, 206 – 219.

Gómez de Cámara, A. (2004). Caracterización de pruebas diagnósticas. Neurología, 19,(1), 31-38.

Gorocica P., Jiménez MC., Garfias J., Sada, I., & Lascurain, R., (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis, Inst Nal Enf Resp Mex ,18,142-153.

Gruft, H., Falkinjam, J., & Parker, J. (1981). Recient experience in the epidemiology of disease by atypical micobacteria. Rev. Infect Dis, 3, 990-996.

Hafner, B., Haag, H., Geiss, K., & Nolte, O. (2004). Different molecular methods for the identification of rarely isoleted non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patróns. Mol Cell Probes, 18, 59-65.

Hale, Y M, Pfyffer G. E., & Salfinger, M. (2001). Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. Clin Infect Dis, 33, 834-846.

Hong, K., Sun-Hyun, K., Tae-Sun, S., Mina, K., Gill-Han, B., & Young-Gil, P. (2005). PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644pb heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. J Microbiol Meth, 62,199-209.

Huard, R., Oliveira Lazzarini, L., Butler, W., Van Soolingen, D., & Ho, J., (2003). PCR Based Method to Differentiate the SubEspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the Basis of Genomic Deletions. Journal of Clinical Microbiology, 41, (4), 1637-1650.

Katoch, V. (2004). Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res, 10, 290-304.

Klinger, J., Rangel, L., Vargas, R., Cañola, E., Rodríguez, E., & Bastidas, A. (2006). Detección y cuantificación de niveles de ADN circulante en suero humano utilizando espectrofotometría uv-visible, Revista de la Sociedad Colombiana de Física, 38 (2), 946-949.

Konig, I., Tammer, Ina., Sollich Veronika., & Wolfgang, K. (2005). Intra- and Interpatient Variability of the *hsp65* and 16S-23S Intergenic Gene Region in *Mycobacterium abscessus* Strains from Patients with Cystic Fibrosis. Journal Of Clinical Microbiology, 43, (7), 3500–3503.

Kulski, J. K., Khinsoe, T., Pryce, C., & Christianse, K. (1995). Use of a Multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. J. Clin Microbiol, 33, 668-74.

Leão, S., Bernardelli, A., Cataldi, A., Zumarraga, M., Robledo, J., & Realpe, T. (2005). Multicenter evaluation of mycobacterium identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. Journal of Microbiological Methods, 61, 193-199.

Leão, S., Martín, A., Mejía, G., Palomino, J.C., Robledo, J., Telles, M., & Portaels, F. (2004). Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Sao Paulo, Brasil, Volumen 1, Edición 1. pp. 113-140.

Lofland, J. (1993). Theory-bashing and answer-improving in the study of social movements. The American Sociologist, 24, (2), 37-58.

McNabb, A., Eisler, K., Adie, M. Amos, M. Rodrigues, G, Stephens, W. A. Black, & Isaac-Renton. (2004). Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. J. Clin. Microbiol, 42, 3000-3011.

Medina, M.V., Sauret, J., & Caminero, J.A. (1999). Enfermedades producidas por micobacterias ambientales. Med Clin, 113, 621-630.

Meissner, P., & Falkinham, J.P. (1986), Plasmid DNA profile as epidemiologic markers for clinical and environmental isolates *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, J. Infect Dis, 153, 325 -331.

Mijs, W., Haas, p., Rossau, R., Van der Laan, T., Rigoust, L., Portaels F., & Van Soolingen D., (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium subs. avium* for bird type isolate and *Mycobacterium avium subsp. Hominissuis* for the human porcine type of *Mycobacterium avium*. Int. J Syst Evol Microbiol, 52, 1505- 1518.

Mondragón, M., Vázquez, C., Barrón, C., Acosta P., Kenneth, C., Balandrano, S., & Olivera, M. (2000). Comparison among three methods for mycobacteria identification. Salud pública de México, 42, (6), 484- 489.

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2005). Microbiología Médica, México D.C: Quinta edición, p. 307.

O'Brien, DP., Currie, BJ., & Krause, VL. (2000). Nontuberculous mycobacterial disease in northern Australia: a case series and review of the literature. Clin Infect Dis,31, 958-967.

Oliveira, R. S., Sircili, S., Ueki, I., Telles, B., Schnabel, M., Briones, S., & Leão, S. (2000). PCR-restriction enzyme analysis of a bone marrow isolate from a human immunodeficiency virus-positive patient discloses polyclonal infection with two *Mycobacterium avium* strains. J. Clin. Microbiol,38, 4643-4645

Palomino, J.C., Martin, A., & Portaels, F. (2002). New methods for the diagnosis and drug resistance detection in mycobacteria. Recent Res Devel Microbiol ,2, 297-318.

Pfyfer, G.E., Brown-Elliott, B.A., & Wallace, R.J. (2003). Mycobacterium: General characteristics, isolation, and staining procedures. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC: Murray P.R., editor. (pp.559).

PRASITE: Identification of Mycobacteria [<http://app.chuv.ch/Prasite>].

Prisco, J., Palma, N. & Bocanegra-García, V. (2007) Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. Valencia: Murray P.R (p.154).

Ramos, M., & De Castro, R. (2003). Mycobacterial infections. Dermatology. Med Clin North Am, 13, 1145-1164.

Ruiz Manzano, J., Manterota, J.M., Auxina, V., & Sauret, J. (1998). Nomenclatura y clasificación de las micobacterias. Rev. Arch Bronconeumol, 34, 154-157.

Runyon EH. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am, 43, 273-290.

Schweickert, B., Goldenberg, O., Richter, E., Göbel, U., Petrich, A., Buchholz, P., & Moler A., (2008). Occurrence and Clinical Relevance of *Mycobacterium chimaera* sp. nov., Germany. EID Journal Home, 14, 11443-1446.

Shinnick, T.M. (1987). The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 169, 1080-1088.

Smole, S., McAleese, F., Ngampasutadol, J., Von Reyn, C., & Arbeit, R., (2002). Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of *hsp65*. J Clin Microbiol, 40, 3374 -3380.

Sompolinsky, D., Lagziel, D., & Naveh, D. (1978). *Mycobacterium haemophilum* sp. Nov., a new pathogen of humans. Int. J. Syst. Bacteriol, 28, 67-75

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2005). Procedimientos en Microbiología Clínica .Micobacterias: Autor. Alcaide, Fernandez de la Vega., Moreno J., González J., Palacios J, Editor. Emilia Cercenado.

Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, GD., & Bottger. (1996) Two laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbiol, 34 , (2), 296-303.

Surzycki, S. (2000). Basic Techniques in Molecular Biology. 2da. Edición. McGraw Hill Interamericana. Editorial S.A. México.

Takewaki, S. K, Okuzumi, H., Ishiko, K. , Ankara, A. , Ohkubo, & R. Nagai. (1993). Denus- specific polymerase Chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and Especies-specific oligonucleotide probes. J. Clin Microbiol, 31, 446-450.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, F., Bally, E., Böttger, E., & Bodmer. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the Especies level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Micribiol , 31, 175-178.

Valdés F. & Cid, A. (2004). Micobacterias atípicas, Actas Dermo-Sifiliográficas, 95, 331-57.

Tortoli E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev, 16, 319-354.

Wong, D.A., Yip, P., Cheung, D., & Kam, K. (2001). Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium complex* species, and other commonly isolated mycobacteria. J Clin Microbiol, 39, 3768-3771.

Zhibang, Y., Bixia, Z., Qishan, L., Lihao, C., Xiangquan, L., & Huaping, L. (2002). Large scale outbreak of infection with *Mycobacterium chelonae* after penicillin injection. J Clin Microbiol, 40, 2626-2628.

ANEXOS

Anexo A. Ficha de análisis clínico para los diferentes aislados clínicos del Hospital Vozandes de Quito.

LABORATORIO DE TUBERCULOSIS

NOMBRE DEL PACIENTE:

DIRECCION

CIUDAD

TELEFONO

No DE PEDIDO

EDAD

SEXO M F H. CLINICA

SALA:

ENTREGA RESULTADOS A.....

MEDICO QUE SOLICITA

MUESTRA DE.

ESPUTO

INDUCIDO

LCR

ASPIRADO GASTRICO

ORINA

OTROS (ESPECIFIQUE)

FECHA DE SIEMBRA	RESULTADO	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD
BAAR		KRASNOW
AURAMINA		CONTROL
MORFOLOGIA DE LA COLONIA	Lisa <input type="checkbox"/> Rugosa <input type="checkbox"/>	INH 1
TEMPERATURA DE CRECIMIENTO	17 <input type="checkbox"/> 22 <input type="checkbox"/> 30 <input type="checkbox"/> 35 <input type="checkbox"/>	INH 5
CRECIMIENTO	RAPIDO <input type="checkbox"/> LENTO <input type="checkbox"/>	SM 10
PIGMENTO	FOTO <input type="checkbox"/> SCOTO <input type="checkbox"/> NOFOTO <input type="checkbox"/>	SM 50
ARYSULFATASA 3 DIAS		RIF 5
ARYSULFATASA 2 SEMANAS		RIF 25
CITRATO DE SODIO		EMB 25
INSITOL		EMB 50
MANITOL		PAS 10
CATALASA SEMICUANTITATIVA >45		PAS 50
CATALASA TERMO ESTABLE (68°C)		ETA 25
HIERRO "UPTAKE"		CIP 5
CRECIMIENTO EN MACCONKEY		AMIK
NIACINA		KAMA
REDUCCION DE LOS NITRITOS		
PYRAZINAMIDAS		
CRECIMIENTO EN CINa AL 5%		MGIT
REDUCCION DE TELURITO		(C.crecimiento)
CRECIMIENTO EN TCH		S
HIDROLISIS DEL TWEEN + 10 DIAS		I
OPACIDAD DEL TWEEN (1 SEMANA)		R
UREASA		E
SIEMBRA EN LOWENSTEIN		
SIEMBRA EN KUDOH		
SIEMBRA EN MGIT		(C.crecimiento)
SIEMBRA EN CAPA DELGADA		PZA
CULTIVO SE CONTAMINA	REPETIR MUESTRA	
CANTIDAD INSUFICIENTE		
DERRAMADA DURANTE EL TRANS.		
REPORTE PRELIMINAR:		
REPORTE FINAL		

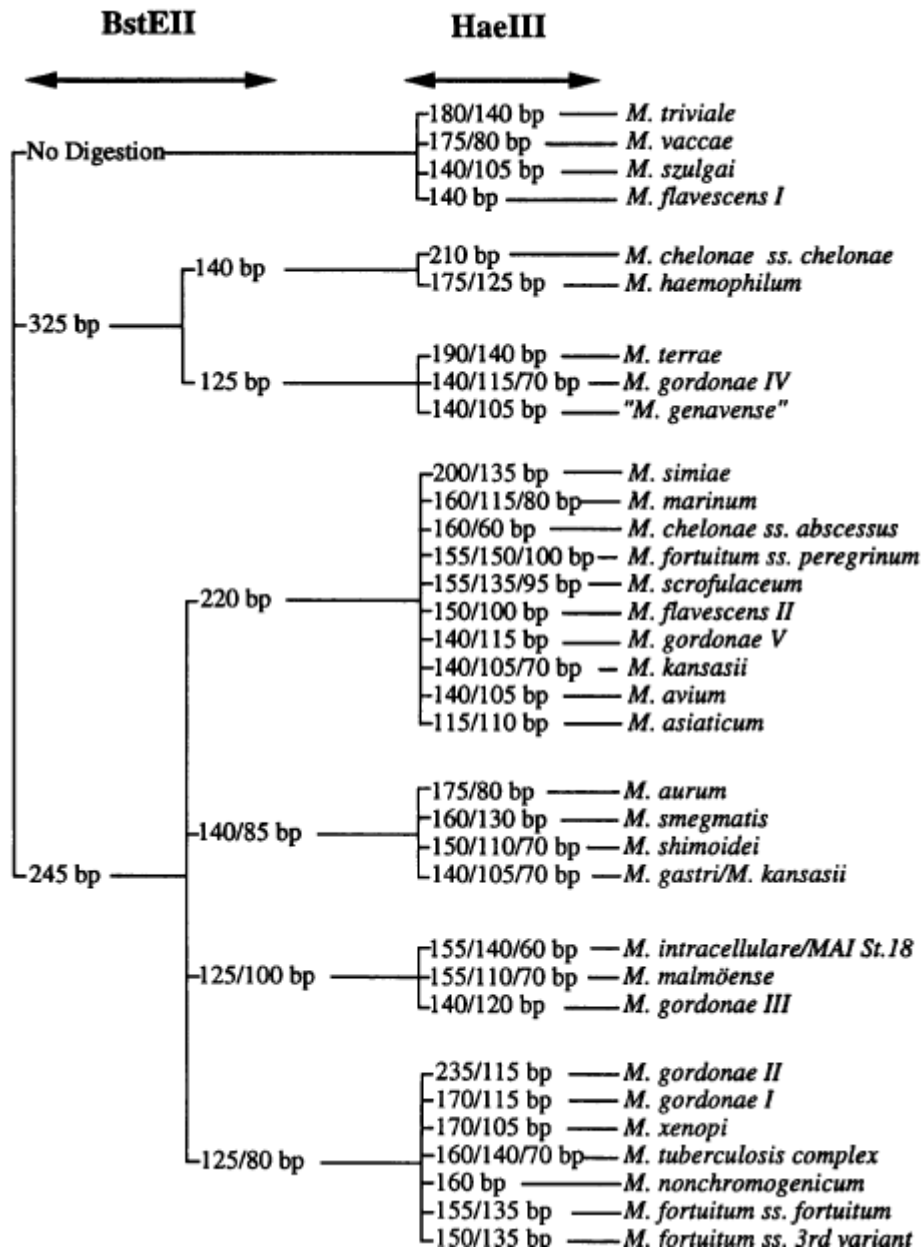
Anexo B. Evaluación de las características de pigmentación y velocidad de crecimiento de los aislados clínicos del Hospital Vozandes de Quito

CEPA		DESCRIPCIÓN INICIAL	DESCRIPCIÓN DE CEPA ACTUAL	REVISIÓN DE CRECIMIENTO							
N° de aislado clínico HVAQ	Siembra en leche			4 días	7 días	15 días	OBSERVACIONES				
							PIGMENT	NO PIGMENT	INDUCCIÓN		T°
					L	O					
1471	406	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(-)	(-)	(+)					35°C
1969	513	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 04/04/08	(-)	(-)	(+)					35°C
1968	501	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(-)	(+)	(+)	X			X	35°C
824	223	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(+)	(+)	(+)		X			35°C
1982	510	Cepa MGIT. Sembrada 26/04/07	Sembrada 04/04/08	(-)	(-)	(+)		X			35°C
1079	291	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(-)	(-)	(+)		X			35°C
807	213	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(-)	(-)	(+)		X			35°C
3205	3205	Cepa descongelada. Sembrada 03/06/08	Sembrada 03/04/08	(+)	(+)	(+)		X			35°C
1856	506	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 07/04/08	(-)	(-)	(+)		X			35°C
1480	408	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(-)	(-)	(+)	X			X	35°C

CEPA		DESCRIPCIÓN INICIAL	DESCRIPCIÓN DE CEPA ACTUAL	REVISIÓN DE CRECIMIENTO								
				4 días	7 días	15 días	OBSERVACIONES					
							PIGMENT	NO PIGMENT	INDUCCIÓN		T°	
N° de Aislado clínico	Siembra en leche					Luz			O.			
1979	523	Pase de cepa congelada 26/04 / 07	Sembrada 03/04/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
1454	386	Cepa Leche descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 04/04/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
1975	519	Cepa descongelada Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(-)	(-)	(+)	X			X		35°C
2573	620	Pase de cepa congelada 05 / 07	Sembrada 07/04/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
3262	3262	Sembrada 05/07/08	Sembrada 05/07/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
2800	663	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(-)	(-)	(+)		X				35°C
2095	532	Cepa descongelada. Sembrada 5/06/07	Sembrada 03/04/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
2101	543	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
2214	563	Descongelada.OK Sembrada 26/04/07	Sembrada 07/04/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
3348	3348	Sembrada 05/07/08	Sembrada 05/07/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C
3344	3344	Sembrada 05/07/08	Sembrada 05/07/08	(+)	(+)	(+)		X				35°C

PACIENTE		DESCRIPCIÓN INICIAL	DESCRIPCIÓN DE CEPA ACTUAL	REVISIÓN DE CRECIMIENTO							
N° de aislado clínico	Siembra en leche			4 días	7 días	15 días	OBSERVACIONES				
							PIGMENT	NO PIGMENT	INDUCCIÓN		T°
		Luz	O.								
2216	565	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 07/04/08	(-)	(-)	(+)		X			35°C
2178	576	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 04/04/08	(-)	(-)	(-)		X			35°C
2859	580	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 07/04/08	(+)	(+)	(+)		X			35°C
2450	609	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 07/04/08	(+)	(+)	(+)		X			35°C
2636	622	Cepa descongelada. Sembrada 26/04/07	Sembrada 04/04/08	(-)	(-)	(+)	X			X	35°C
2852	2852	MGIT. Sembrado 6/06/07	Sembrada 03/04/08	(+)	(+)	(+)		X			35°C
2142	555	LCR. sembrada 26/04/07	Sembrada 03/04/08	(+)	(+)	(+)	X			X	35°C
694	2987	Sembrada 15/08/07	Sembrada 07/04/08	(+)	(+)	(+)		X			35°C

Anexo C. Algoritmo para la identificación de especies del género *Mycobacterium* de origen clínico. Autor Telenti et al., 1993



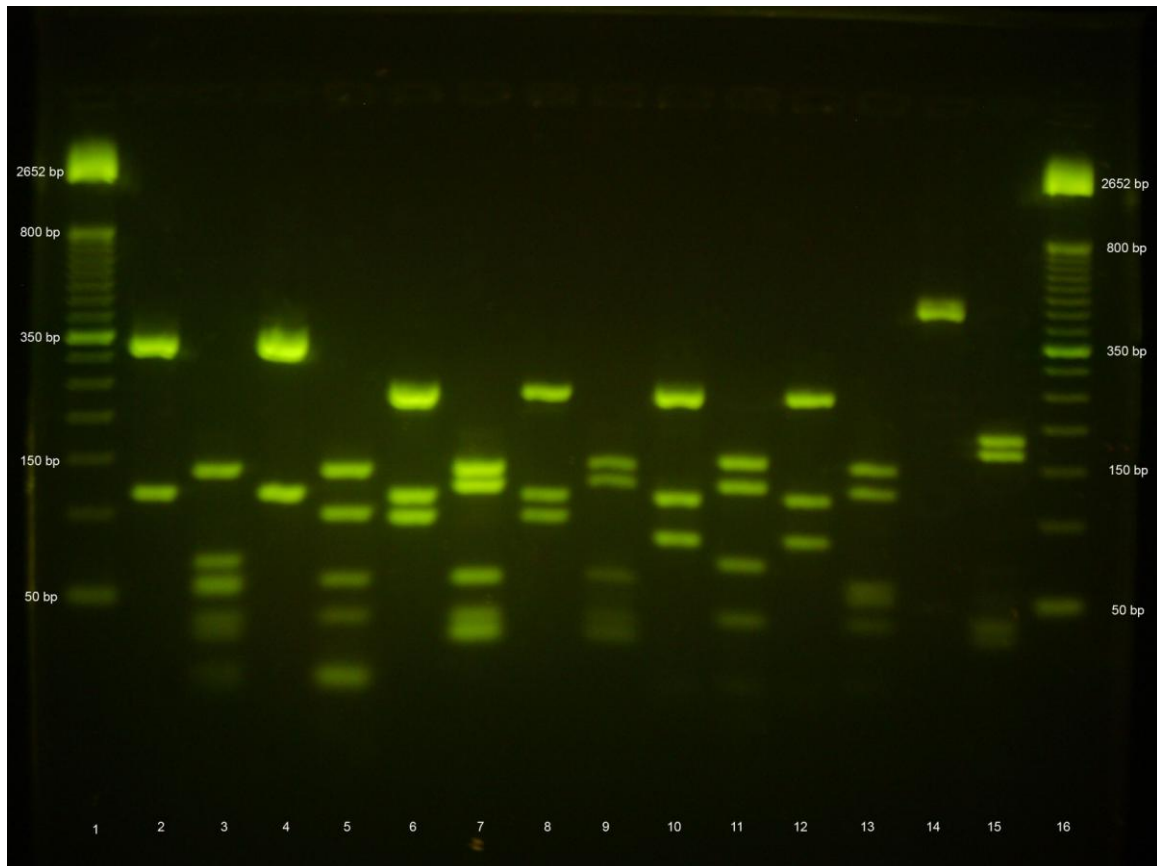
Anexo D. Algoritmo para la identificación de micobacterias de origen clínico a nivel de especie. Autor Brunello et al., 1993

<i>Bst</i> EII fragment length (bp) ^a	<i>Hae</i> III fragment lengths (bp) ^b	Species ^c	
No digestion	198 (197), 92 (87), 50 (58), 33 (40)	<i>M. confluentis</i>	
	187 (184), 106 (107), 43 (NF), 38 (34)	<i>M. gilvum</i>	
	177 (171), 91 (87), 74 (NF) 49 (45), 33 (36)	<i>M. usciae</i>	
	174 (181), 132 (126), 30 (42), 26 (36)	<i>M. triviale</i>	
	146 (145), 69 (69), 58 (58), 55 (54)	<i>M. brumae</i>	
	145 (139), 99 (98), 60 (58), 53 (51), 39 (36)	<i>M. pulveris</i>	
	136 (135), 129 (128), 64 (65), 47 (46), 20 (35)	<i>M. duvalii</i>	
	131 (128), 106 (103), 75 (70), 44 (42), 38 (36), 21 (22)	<i>M. szulgai</i>	
	93 (87), 53 (59), 39 (36), 23 (22)	<i>M. gadium</i>	
	313 ± 10 [325]	130 ± 2 [140]	200 (198), 60 (60), 55 (59)
178 (186), 69 (65), 58 (58)			<i>M. mucogenicum</i>
163 (160), 108 (112), 106 (111)			<i>M. haemophilum</i>
117 ± 3 [125 or 120]		204 (196), 72 (69), 60 (58), 56 (54), 43 (41)	<i>M. aichiense</i>
		187 (181), 132 (126), 42 (38), 36 (34)	<i>M. tenae</i>
		170 (172), 137 (139), 58 (56)	<i>M. neoaurum</i>
		167 (161), 128 (123), 59 (58), 42 (40), 38 (36)	<i>M. rhodesiae</i>
		151 (147), 142 (141), 60 (58), 42 (46)	<i>M. diernhoferi</i>
		147 (139), 84 (87), 58 (58)	<i>M. chitae</i>
		145 (139), 91 (94), 50 (58)	<i>M. nonchromogenicum</i> type II
130 (127), 111 (112), 71 (70), 59 (59)	<i>M. gordonae</i> type IV ^d		
127 (127), 108 (103), 43 (42)	<i>M. genavense</i>		
234 ± 3 [245]	211 ± 4	191 (188), 135 (126), 66 (NF)	<i>M. simiae</i> type I
		184 (179), 141 (137), 74 (72)	<i>M. thermoresistibile</i>
		176 (174), 141 (149), 91 (95), 50 (51)	<i>M. sphagni</i>
		167 (162), 96 (94), 53 (51), 46 (45), 42 (40), 37 (36)	<i>M. poriferae</i>
		155 (145), 136 (127), 45 (42), 39 (40)	<i>M. interjectum</i>
		150 (145), 127 (127), 100 (95)	<i>M. scrofulaceum</i>
		146 (145), 102 (106), 81 (78)	<i>M. marinum</i> ^d
		145 (146), 138 (140), 95 (98), 54 (52)	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>peregrinum</i>
		144 (139), 128 (123), 98 (101), 53 (52)	<i>M. porcinum</i>
		144 (145), 74 (69), 62 (58), 55 (52)	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i> ^d
143 (139), 86 (87), 58 (58), 40 (37)	<i>M. obuense</i>		
141 (140), 85 (81), 51 (54), 33 (36)	<i>M. phlei</i>		
132 (140), 104 (106), 80 (76) 41 (41) 37 (36)	<i>M. branderi</i>		
128 (127), 105 (103), 82 (78)	<i>M. kansasii</i> type I ^d		
127 (127), 104 (103), 51 (59)	<i>M. avium/paratuberculosis</i>		
113 (112), 104 (106)	<i>M. asiaticum</i>		
131 ± 5 85 ± 3 [140/85 or 80]	117 ± 2 99 ± 4 [125 or 120/100]	160 (161), 142 (145), 61 (59)	<i>M. agri</i>
		154 (154), 129 (123), 63 (58), 45 (40), 41 (36)	<i>M. smegmatis</i>
		151 (146), 99 (100), 53 (52)	<i>M. alvei</i>
		141 (150), 120 (124), 50 (58), 40 (43), 30 (36)	<i>M. yokaiense</i>
		140 (139), 130 (130), 73 (79), 43 (40)	<i>M. shimoidae</i>
		137 (139), 117 (123), 58 (59)	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>
		133 (126), 104 (103), 73 (69)	
		152 (145), 131 (127), 63 (57), 44 (39)	<i>M. gastri/kansasii</i>
		147 (145), 109 (105), 81 (78)	<i>M. intracellulare</i>
		145 (140), NF (106), 59 (40) 49 (36), 42 (33), 35 (23)	<i>M. malmoense</i>
130 (127), 111 (112), 43 (40), 39 (35)	<i>M. hiberniae</i>		
117 ± 2 84 ± 5 [125 or 120/80]		214 (210), 111 (115)	<i>M. gordonae</i> type II ^d
		166 (161), 103 (104), 56 (59), 44 (42), 39 (36)	<i>M. xenopi</i>
		158 (161), 111 (112), 54 (57)	<i>M. gordonae</i> type I ^d
		157 (152), 131 (127), 71 (69)	<i>M. tuberculosis</i> complex ^d
		145 (139), NF (123), 64 (58), 39 (32)	<i>M. senegalense</i>
142 (141), 124 (123), 61 (58), 54 (52), 43 (43)	<i>M. farcinogenes</i>		

Anexo F. Cuantificación de ADN de los aislados clínicos y cepas ATCC del HVQ.

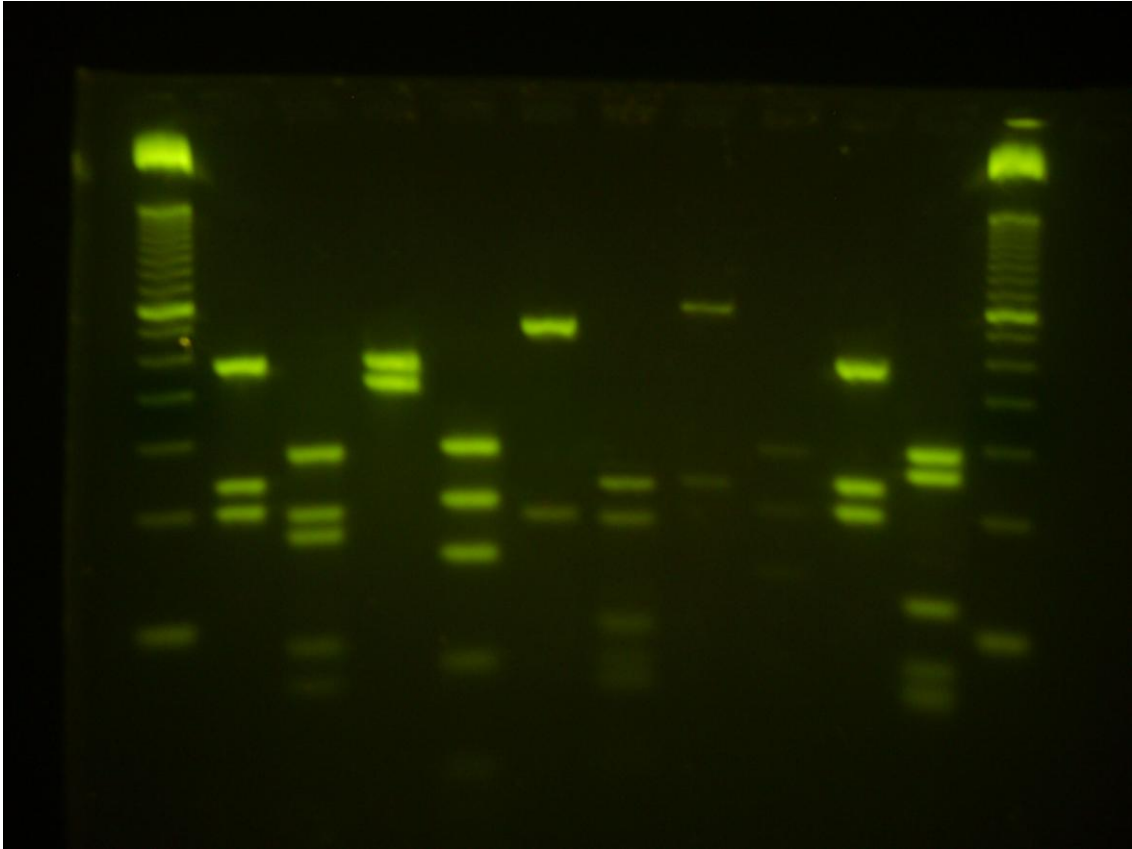
Aislado clínico	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	A₂₆₀ / A₂₈₀	Concentración ADN (ug/ml)
406	0.0051	0.0044	1.15	108.7
609	0.0058	0.0031	1.87	169.5
291	0.0045	0.0024	1.87	131.6
510	0.0091	0.0077	1.18	197.7
408	0.0138	0.0121	1.14	289.6
543	0.0041	0.0023	1.78	117.2
576	0.0124	0.0060	2.06	377.4
580	0.0080	0.0050	1.60	216.4
501	0.0036	0.0032	1.12	74.5
565	0.0042	0.0023	1.82	121.4
513	0.0041	0.0024	1.70	114.8
563	0.0053	0.0030	1.76	150.9
2852	0.0075	0.0048	1.56	200.1
519	0.0036	0.0024	1.50	93.8
620	0.0042	0.0024	1.75	119.0
3262	0.0047	0.0026	1.80	135.2
3344	0.0112	0.0068	1.64	307.7
223	0.0021	0.0015	1.40	52.3
523	0.0109	0.0064	1.70	304.7
555	0.0027	0.0015	1.80	77.5
386	0.0151	0.0096	1.57	404.5
3348	0.0061	0.0035	1.74	172.5
213	0.0044	0.0024	1.83	127.4
663	0.0064	0.0039	1.64	175.5
506	0.0063	0.0032	1.96	188.1
622	0.0033	0.0018	1.83	95.6
694	0.0024	0.0016	1.50	62.5
3205	0.0081	0.0053	1.52	204.9
532	0.0092	0.0063	1.46	235.6
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	0.0092	0.0055	1.67	254.8
<i>M. smegmatis</i> ATCC 35796	0.0065	0.0036	1.80	186.9
<i>M. intracellulare</i> tipo 1 ATCC 13950	0.0097	0.0053	1.83	280.7
<i>M. avium</i> s. <i>avium</i> tipo 1 ATCC 25291	0.0069	0.0038	1.81	198.9
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	0.0050	0.0027	1.85	145.4
<i>M. bovis</i>	0.0068	0.0037	1.83	197.1

Anexo G. Ejemplo de digestión enzimática de aislados clínicos 523, 663, 291,506, 576, 580, 386. Gel al 3%. Agarosa L.E. (PROMEGA). Cámara Labnet 16 pocillos a 70 V. Sybr Safe 8µl (directo).



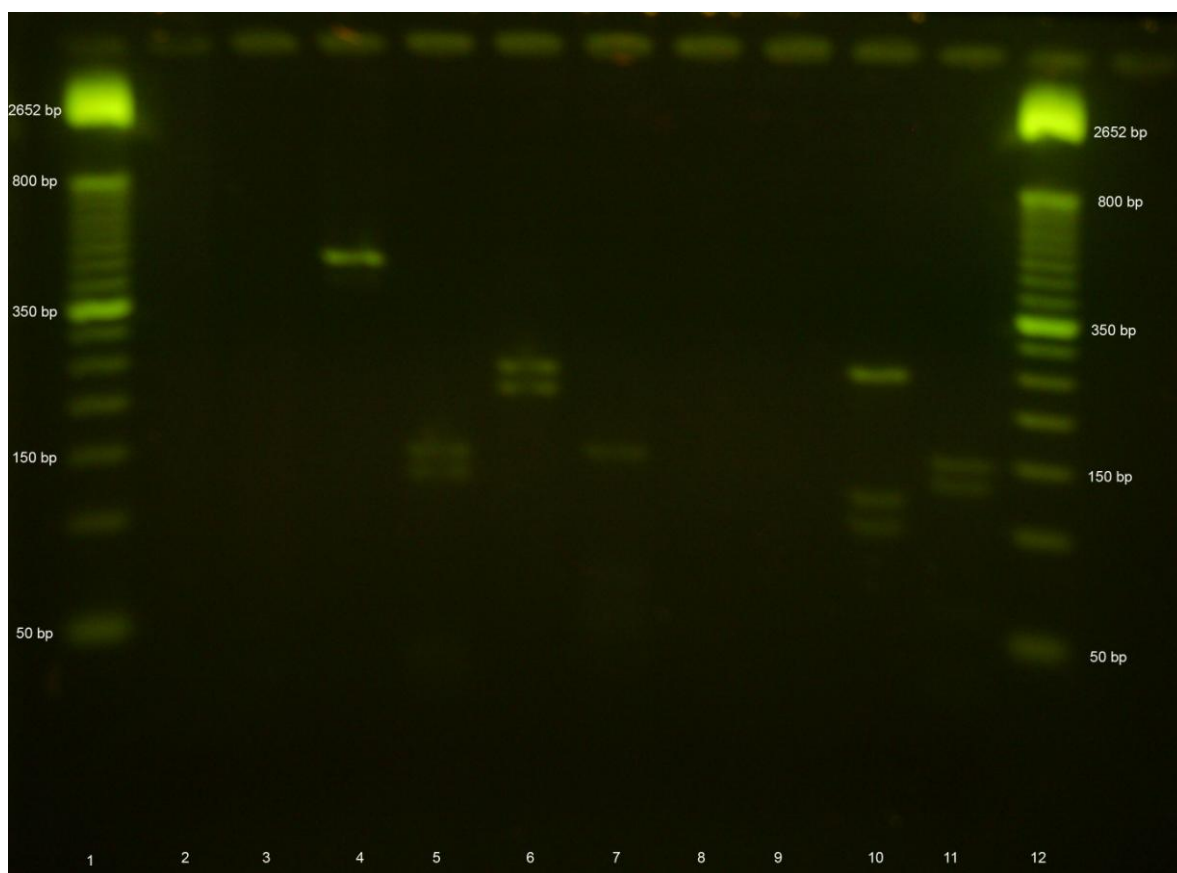
Línea 1 y 16: Marcador molecular de 50bp a 800bp, **Línea 2:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 523, *Mycobacterium mucogenicum type 2*. **Línea 3:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 523, *Mycobacterium mucogenicum type 2*. **Línea 4:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 663, *Mycobacterium nonchromogenicum type 2*. **Línea 5:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 663. *Mycobacterium nonchromogenicum type 2*. **Línea 6:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 291, *Mycobacterium intracellulare tipo 1*. **Línea 7:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 291. *Mycobacterium intracellulare tipo 1*. **Línea 8:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 506, *Mycobacterium intracellulare tipo 1*. **Línea 9:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 506 *Mycobacterium intracellulare tipo 1*. **Línea 10:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 576, *Mycobacterium tuberculosis complex tipo 1*. **Línea 11:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 576. *Mycobacterium tuberculosis complex tipo 1*. **Línea 12:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 580, *Mycobacterium fortuitum tipo 1*. **Línea 13:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 580 *Mycobacterium fortuitum tipo 1*. **Línea 14:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 386, *Mycobacterium no identificado*. **Línea 15:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 576. *Mycobacterium no identificado*.

Anexo H. Ejemplo de digestión enzimática de aislados clínicos 513, 213, 622, 565, 291. Gel al 3%. Agarosa L.E. (PROMEGA). Cámara Labnet 13 pocillos. Voltaje: 70 V. Sybr Safe 8µl (directo).



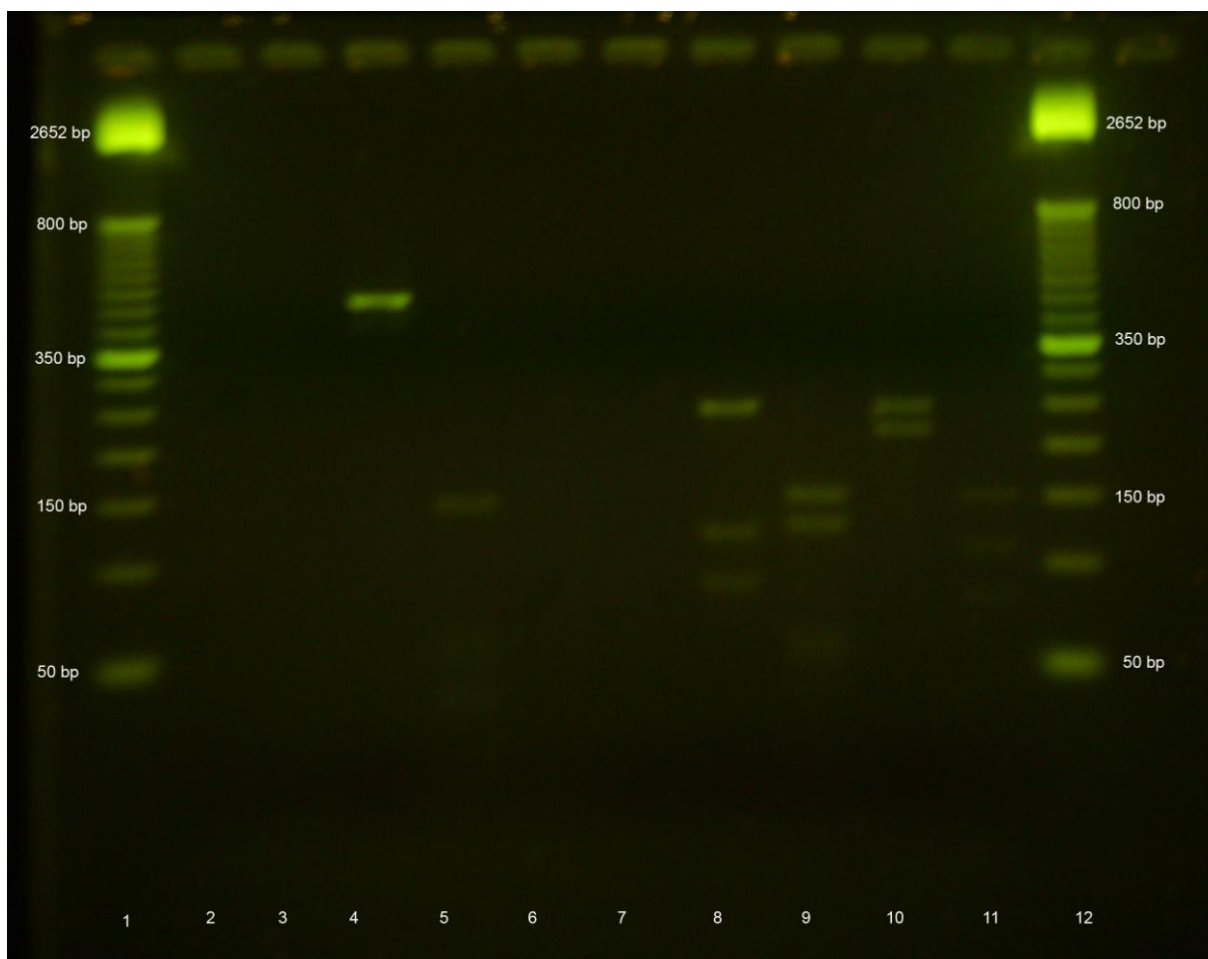
Línea 1 y 12: Marcador molecular de 50bp a 800bp, **Línea 2:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 513, *Mycobacterium malmoense type 1*. **Línea 3:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 513, *Mycobacterium malmoense type 1*. **Línea 4:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 213, *Mycobacterium ulcerans type 1*. **Línea 5:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 213, *Mycobacterium ulcerans type 1*. **Línea 6:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 622, *Mycobacterium gordonae tipo 4*. **Línea 7:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 622. *Mycobacterium gordonae tipo 4*. **Línea 8:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 565, *Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2*. **Línea 9:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 565. *Mycobacterium nonchromogenicum tipo 2*. **Línea 10:** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 291, *Mycobacterium intracellulare tipo 1*. **Línea 11:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 291. *Mycobacterium intracellulare tipo 1*.

Anexo I. Ejemplo de digestión enzimática de aislados clínicos 406, 609 y 291. Gel al 3%. Agarosa L.E. (PROMEGA). Cámara Labnet 13 pocillos. Voltaje: 70 V. Sybr Safe 5µl (directo).



Línea 1 y 12: Marcador molecular de 50bp a 800bp, **Línea 2:** Control negativo para la enzima BstEII. **Línea 3:** Control negativo para la enzima HAEIII. **Línea 4.** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 406, *Mycobacterium simiae type 5*. **Línea 5:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 406. *Mycobacterium simiae type 5*. **Línea 6.** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 609, *Mycobacterium abscessus tipo 1*. **Línea 7:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 609. *Mycobacterium abscessus tipo 1*. **Línea 8:** Control negativo para el Buffer de BstEII. **Línea 9:** Control negativo párale buffer de HAEIII. **Línea 10.** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 291, *Mycobacterium intracellulare type 1*. **Línea 11:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 291. *Mycobacterium intracellulare type 1*.

Anexo J. Ejemplo de digestión enzimática de aislados clínicos 501, 620 y 213. Gel al 3%. Agarosa L.E. (PROMEGA). Cámara Labnet de 13 pocillos. Voltaje: 70V. Sybr Safe 5µl.



Línea 1 y 12: Marcador molecular de 50bp a 800bp, **Línea 2:** Control negativo para la enzima BstEII. **Línea 3:** Control negativo para la enzima HAEIII. **Línea 4.** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 501, *Mycobacterium flavescens tipo 1*. **Línea 5:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 501. *Mycobacterium flavescens tipo 1*. **Línea 6:** Control negativo para el Buffer de BstEII. **Línea 7:** Control negativo párale buffer de HAEIII. **Línea 8.** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 620, *Mycobacterium fortuitum tipo 1*. **Línea 9:** Digestión enzimática con HAEIII del aislado clínico 620. *Mycobacterium fortuitum tipo 1*. **Línea 10.** Digestión enzimática con BstEII del aislado clínico 213, *Mycobacterium ulcerans t ipo 1*. **Línea 11:** Digestión enzimática con HAEIII del aislador clínico 213 *Mycobacterium ulcerans t ipo 1*.

NOTA: El objetivo de la visualización (ANEXOS G, H, I, J) es mostrar la confirmación del diagnóstico. Para ello se realizó 3 repeticiones de cada aislado clínico. En esta ocasión solo se muestra las repeticiones del aislado clínico 291.

