

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos

Naturales



**“TIPIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS A PARTIR DE CEPAS
INACTIVADAS MEDIANTE ANÁLISIS DE PATRONES DE RESTRICCIÓN
(PRA)”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

MARGARITA ESPERANZA LEÓN BENÍTEZ

Guayaquil – Ecuador

2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios,

A mis amados Padres, Miryam y Yury,

A mi familia, tíos, tías, primos,

A mis amigos y compañeros,

A Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI,

A Subproceso de Micobacterias,

A Dra. Greta Franco M.Sc.,

A mis espléndidos maestros,

A mi Tribunal y Director,

A mi querido Carlos Rodolfo.

DEDICATORIA

A los progresos en Ciencia y Tecnología del Ecuador.

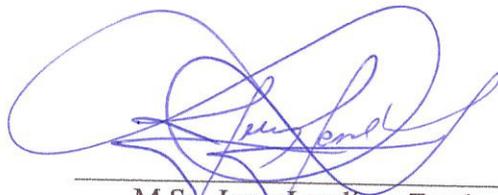
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ph.D. Ana Tirape Bajaña
PRESIDENTE



M.Sc. César Bedoya Piloza
DIRECTOR DE TESIS

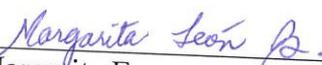


M.Sc. Jerry Landívar Zambrano
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Margarita Esperanza León Benítez

RESUMEN

Las herramientas y técnicas utilizadas convencionalmente, se han desarrollado de manera que los pacientes sintomáticos positivos ingresen rápidamente al tratamiento médico antituberculoso. Debido a ello, existe un incorrecto manejo y tratamiento de casos en enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas. Por ello se implementó el método de identificación de micobacterias Análisis de Patrones de Restricción, a fin de contribuir en el diagnóstico y tratamiento médico correcto al paciente. Se analizaron 60 muestras aleatorias del banco de cepas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de Guayaquil, se realizó PBT y se aplicó el método PRA. El método PRA se basa en la escisión del gen *hsp65* con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, lo cual genera varios fragmentos de diferentes tamaños; dichos fragmentos se comparan con patrones de referencia del sitio web <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>, de esta manera se conoce la especie. Por PBT se identificaron 4 especies y 2 complejos. Por PRA se identificaron 7 especies y 1 complejo. Se compararon los resultados encontrando, 1 muestra no identificada por PRA, 1 muestra discordante. Estos resultados se ven soportados por los antecedentes del paciente, por lo que se requiere de un manejo de la información claro y completo para este tipo de estudios. Finalmente se concluye que PRA es un método rápido, accesible e idóneo para la identificación de MNT. Se recomienda incrementar esfuerzos en estudios moleculares de micobacterias a nivel nacional.

Palabras claves: Tuberculosis, PBT, PRA, MNT.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XVIII
INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1	6
ANTECEDENTES	6
1.1 Generalidades	6
1.2 Clasificación de las Micobacterias	10
1.3 Mecanismo de Infección	14
1.4 Epidemiología.....	21
1.4.1 Tuberculosis en el Mundo	21
1.4.1.1 Situación de la tuberculosis en Ecuador	22
1.4.2 Micobacterias No Tuberculosas en el Mundo	25
1.4.3 Control Mundial de Infecciones Causadas por Micobacterias	27
1.4.3.1 Control de Tuberculosis en Ecuador	27
1.4.3.2 Migración y TB	29
1.5 Micobacterias No Tuberculosas	30
1.5.1 Origen de las Infecciones por Micobacterias No Tuberculosas	33

1.6	Tratamiento Médico.....	34
1.7	Resistencia.....	38
1.8	Métodos de Identificación/Diagnóstico	41
1.8.1	Identificación Fenotípica	43
1.8.2	Métodos Bioquímicos de Identificación.....	45
1.9	Diagnóstico Molecular.....	47
1.9.1	Enzimas de Restricción o Endonucleasas.....	47
1.9.2	Gen hsp65	48
1.9.3	Métodos de extracción.....	51
1.9.4	Análisis de Patrones de Restricción (PRA)	53
1.9.5	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)	53
	Capítulo 2	54
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.1	Lugar de realización.....	54
2.2	Cepas.....	54
2.3	Descripción de Cepas.....	58
2.4	Pruebas Bioquímicas de Tipificación	58
2.4.1	Producción de niacina (20, 75).....	58
2.4.2	Prueba de Nitrato Reducción (20, 70, 75).....	60
2.4.3	Inhibición de Catalasa a 68°C (20, 39, 75)	61
2.4.4	Toma de Hierro (70)	63
2.4.5	Hidrólisis de Tween (70).....	64

2.4.6	Ureasa (70)	65
2.5	Inactivación de cepas	65
2.6	Técnicas Moleculares.....	66
2.6.1	Extracción del ADN.....	66
2.6.2	Amplificación de ADN – PCR (8)	68
2.6.3	Digestión de las muestras con enzimas de restricción.....	69
2.6.4	Diagnóstico e Identificación de micobacterias.....	70
2.6.5	Análisis de Resultados	74
	Capítulo 3	76
	RESULTADOS	76
3.1	Identificación de TB y Micobacterias No Tuberculosas.....	76
3.1.1	Identificación por Métodos Bioquímicos de Tipificación	76
3.2	Análisis de Métodos de Extracción	83
3.3	Identificación por Análisis de Patrones de Restricción (PRA)	83
3.4	Comparación de Resultados	92
3.5	Características de las Cepas Identificadas.....	96
	Capítulo 4	100
	DISCUSIÓN.....	100
	CONCLUSIONES	105
	RECOMENDACIONES	108

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
AT	Antes Tratados
baar	Bacilo Acido Alcohol Resistente
BK	Baciloscopía
C	Carbono
°C	Grado Celsius
CD4	Cluster of Cuadruple Differentiation
CMTB	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DDHH	Derechos Humanos
DOTS	Tratamiento Directamente Observado
DX	Diagnóstico
E	Etambutol
H	Isoniacida
HSP	Heat-Shock Protein
INF γ	Interferón Gamma
IUATLD	International Union Against Tuberculosis and Lungs Diseases
kHz	Kilohercio
LAM	Lipoarabinomananos
MA	Micobacterias Ambientales
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>

MAI	<i>Mycobacterium avium intracellulare</i>
MCR	Micobacterias de Crecimiento Rápido
MCL	Micobacterias de Crecimiento Lento
MDR	Multidrogo Resistente
MNT	Micobacterias No Tuberculosas
MSP	Ministerio de Salud Pública
ODM	Objetivo de Desarrollo del Milenio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de Bases
PBT	Pruebas Bioquímicas de Tipificación
PCT	Programa de Control de la Tuberculosis
PRA	Análisis de Patrones de Restricción
PSD	Prueba de Sensibilidad a Drogas
R	Rifampicina
RFLP	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción
S	Streptomycin
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNS	Sistema Nacional de Salud
SR	Sintomático Respiratorio
T°	Temperatura
TB	Tuberculosis
TBEP	Tuberculosis Extra Pulmonar

TBP	Tuberculosis Pulmonar
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WHO	World Health Organization
XDR	Drogo Resistencia Extendida
Z	Pirazinamida

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la pared y membrana celular de las micobacterias (16).	7
Figura 2.	Mecanismo Principal de Activación de Linfocitos-T o destrucción de macrófagos por antígenos micobacterianos (32).	16
Figura 3.	Balance entre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y el sistema inmune del hospedero (33).	17
Figura 4.	Tasas de casos nuevos en todas sus formas e incidencia TBP BK (+). Ecuador, 1993-2007 (41).	23
Figura 5.	Tasa Estimada de Incidencia de Tuberculosis, 2013 (4).	24
Figura 6.	Tasa Estimada de Incidencia de Tuberculosis, 2011 (6).	25
Figura 7.	Tasa Estimada de Incidencia de Tuberculosis, 2010 (40).	25
Figura 8.	Porcentaje de casos nuevos MDR-TB (4).	40
Figura 9.	Porcentajes de MDR-TB tratados previamente (6).	40
Figura 10.	Pacientes con confirmación de laboratorio que empezaron el tratamiento XDR-TB (4).	41
Figura 11.	Clasificación de las Micobacterias Atípicas según Runyon (24, 28).45	
Figura 12.	Alineamiento de una secuencia parcial de hsp65 de cepas tipo de MCR. <i>M. tuberculosis</i> es usada como referencia; los nucleótido mostrados indican las diferencias en las secuencias comparadas con MTB. El primer nucleótido corresponde a la posición 416 de la secuencia publicada de MTB (12).	50
Figura 13.	Origen de muestras con sospecha de Tuberculosis.	56
Figura 14.	Tipo de muestra.	57

Figura 15.	Sitio de internet para identificación de Micobacterias.	71
Figura 16.	Menú para identificación de especies.....	71
Figura 17.	Selección de sitios patrones de restricción de endonucleasas.	72
Figura 18.	Menú desplegado para selección de patrones de restricción de enzima <i>BstEII</i>	72
Figura 19.	Menú desplegado para selección de patrones de restricción de enzima <i>HaeIII</i>	73
Figura 20.	Forma simplificada de búsqueda.	73
Figura 21.	Botón de selección para probar la mezcla de fragmentos de restricción obtenidos.	74
Figura 22.	Lista de especies con perfiles cercanos a los propuestos.	74
Figura 23.	Porcentaje de micobacterias identificadas.....	77
Figura 24.	Micobacterias identificadas por PBT.	77
Figura 25.	Micobacterias Identificadas por Pruebas Bioquímicas de Tipificación.....	78
Figura 26.	Extracción por método PRA.	83
Figura 27.	Extracción por método RFLP.	83
Figura 28.	Producto de PCR digerido con enzima <i>BstEII</i>	84
Figura 29.	Patrones de restricción con enzima <i>HaeIII</i>	85
Figura 30.	Micobacteria No Tuberculosas Identificadas por PRA.	88
Figura 31.	Micobacterias identificadas por PRA.....	88
Figura 32.	Proporción de Micobacterias Identificadas mediante PRA.....	89

Figura 33.	Características de la cepa <i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1.....	96
Figura 34.	Características de la cepa <i>Mycobacterium abscessus</i> tipo2.....	96
Figura 35.	Características de la cepa <i>Mycobacterium avium</i> s. <i>avium</i> tipo 1....	97
Figura 36.	Características de la cepa <i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1.....	97
Figura 37.	Características de la cepa <i>Mycobacterium flavescens</i> tipo 1.	98
Figura 38.	Características de la cepa <i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1.	98
Figura 39.	Características de la cepa <i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1.	99
Figura 40.	Características de la cepa <i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 5.	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de las Micobacterias – Adaptado de Ramos e Silva (25, 27, 28).....	11
Tabla II. Clasificación de las Micobacterias por las enfermedades que producen (17).....	12
Tabla III. Esquema de clasificación clínica de Micobacterias No Tuberculosas propuesto por Woods y Washington (29, 30).....	13
Tabla IV. Clasificación de Micobacterias que comúnmente causan enfermedades en humanos (29).	14
Tabla V. Factores de Riesgo que aumentan la probabilidad de contraer Tuberculosis (25).....	18
Tabla VI. Categorías de tratamiento antituberculoso en Ecuador (41)	36
Tabla VII. Procedencia de Muestras.....	55
Tabla VIII. Tipo de origen de muestra.	57
Tabla IX. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Tipificación en Micobacterias No Tuberculosas.	80
Tabla X. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Tipificación.....	81
Tabla XI. Patrones de Restricción observados en el gel comparados con los mostrados en PRASITE.	86
Tabla XII. Resultados obtenidos en base a la lectura de los fragmentos de restricción. 90	

Tabla XIII.	Cuantificación de Micobacterias Identificadas por Pruebas Moleculares.	92
Tabla XIV.	Comparación de resultados de identificación de Micobacterias No Tuberculosas obtenidos por Pruebas Bioquímicas de Tipificación y Análisis de Patrones de Restricción.	93
Tabla XV.	Comparación de resultados de identificación de Micobacterias Tuberculosas obtenidos por Pruebas Bioquímicas de Tipificación y Análisis de Patrones de Restricción.	94
Tabla XVI.	Discordancias encontradas en los resultados.	95

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A - AGENTES ANTIMICOBACTERIANOS A CONSIDERAR PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (107).....	110
ANEXO B - TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES PULMONARES ASOCIADAS A MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO (108).	111
ANEXO C - BASES DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE TIPIFICACIÓN...	112
ANEXO D - ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ÚTILES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE MICOBACTERIAS (70, 109).....	117
ANEXO E - DESCRIPCIÓN DE CEPAS: ANTECEDENTES Y CLÍNICA DE PACIENTES.....	118
ANEXO F - REACTIVO DE GRIESS: SOLUCIÓN A y SOLUCIÓN B (70).	121
ANEXO G - REACTIVOS PARA PREPARAR LA MASTER MIX POR MUESTRA (8).	122
ANEXO H - PROGRAMA EN QUE SE REALIZA LA PCR (8).	123
ANEXO I - PREPARACIÓN DE LA MEZCLA PARA RESTRICCIÓN DE GENES (8).....	124
ANEXO J - PALÍNDROME DE RECONOCIMIENTO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (110, 111).	125
ANEXO K - ALGORITMO DE PATRONES PRA PARA 34 ESPECIES LA DIFERENCIACIÓN DE MICOBACTERIAS A NIVEL ESPECIE PROPUESTO POR TELENTI (10).....	126

ANEXO L - ALGORITMO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE MICOBACTERIAS
DE IMPORTANCIA CLÍNICA Y DE LABORATORIO A NIVEL DE ESPECIE
PROPUESTO POR DEVALLOIS (47).....127

INTRODUCCIÓN

La familia Mycobacteriaceae teniendo como único miembro al género *Mycobacterium*, consta de patógenos de alta relevancia a nivel mundial en la salud humana: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (y recientemente descubierta *Mycobacterium lepromatosis* (1, 2)), causantes de dos enfermedades de alto impacto en la población, Tuberculosis (TB) y lepra, respectivamente.

El género *Mycobacterium* comprende cerca de 100 especies, muchas de ellas son patógenas para el hombre y los animales y es bien conocido que la mayoría de las que afectan la salud humana pertenecen al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB).

La lepra es una enfermedad poco contagiosa, considerada una enfermedad infecciosa crónica, que puede ser transmitida por estrecho contacto con personas enfermas no tratadas. En las personas infectadas no tratadas, “la lepra puede causar lesiones progresivas y permanentes en la piel, los nervios, las extremidades y los ojos” (3). Según cifras oficiales de la OMS (3), en el 2012 había una prevalencia de 189.018

casos reportados por 115 países, y se notificaron 232.857 casos nuevos para el mismo año. Al ser una bacteria no cultivable en medio sólido, no se han obtenido muestras de este organismo. Por ello, esta micobacteria no será tratada a fondo en el presente estudio.

La tuberculosis es una enfermedad prevenible y curable, pero debido al abandono de tratamientos y aparición de nuevas cepas circundantes, altamente patógenas naturalmente resistentes, el número de casos nuevos y prevalentes no disminuye en la tasa esperada. Adicional a ello, a medida que aumentan las personas infectadas con VIH, los casos de coinfección TB-VIH aumentan. En el 2013 produjo 9 millones de casos nuevos, y 1.5 millones de muertes, entre ellos 80 mil niños y 360 mil casos TB-VIH a nivel mundial (4).

Los datos mostrados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante más de una década, demuestran el constante esfuerzo en busca de nuevos métodos de detección y posibles curas de la TB. Sumado a esto se han desarrollado programas de medicación y estrictos controles en la toma de los mismos. Aún con tantos esfuerzos, las cifras de nuevos casos y mortalidad, siguen siendo altas.

En 2005 y 2006 se reportaron 9.1 y 9.2 millones de casos nuevos respectivamente a nivel mundial. Para el año 2007, la OMS (5) reportó 5.6 millones de casos nuevos, con un estimado de 1.32 millones de muertes, entre ellos 456 mil eran VIH positivos. Para el año 2008 la incidencia global de casos nuevos de tuberculosis fue de 9.4

millones, la mayoría de estos casos se presentaron en Asia (54,2%) y África (29,8%), África tiene las tasas de muerte más altas.

En el 2011 (6) se reportaron 9 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes, 430 mil correspondía a personas VIH positivas.

Las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) incluyen todas las especies del género *Mycobacterium* que no se encuentran dentro del CMTB, conocidas antiguamente como Atípicas, debido a que no eran asociadas directamente con la Tuberculosis (TB) porque se creía no eran micobacterias tuberculosas (7). Es preciso mencionar que muchos autores se refieren a ellas también como Micobacterias Ambientales (MA), ya que se considera que, a diferencia de la TB que es transmitida persona a persona a través de la tos, estas son adquiridas del ambiente. Las infecciones por MNT se encuentran mayormente asociadas a personas con el sistema inmunológico extremadamente debilitado, como en niños o personas con SIDA, pero no se asocian directamente como causa de muerte de estos pacientes.

Los casos reportados de Multidrogo Resistencia (MDR) no son solo casos de recaídas, en los últimos 5 años se ha podido identificar casos de pacientes contagiados por cepas resistentes provenientes de contactos cercanos. Los casos de drogo resistencia extendida (XDR), no han aumentado alarmantemente, ya que los individuos afectados, se encuentran bajo control y observación continua.

Actualmente existen técnicas y equipos que en pocos pasos pueden darnos acceso a un resultado, que pueden indicar desde la presencia de bacilos en una muestra, hasta

la detección de resistencia a los fármacos que se utilizan para combatir la tuberculosis. Sin embargo, las necesidades observadas por la alta prevalencia y persistencia de la TB, el aparecimiento de cepas resistentes MDR y XDR, la alta demanda de resultados rápidos y confiables sobre todo en países de escasos desarrollo (pocos recursos), no se ha podido satisfacer por completo, por la falta de acceso a estas tecnologías y equipamientos.

Adicionalmente, en los últimos años, se ha observado una prevalencia y creciente tasa de casos de infección por Micobacterias No Tuberculosas (MNT), las que son más difíciles de tratar, poco curables, y en muchos casos, tardíamente detectables. A pesar de ser de baja carga en la población, al ser bacterias oportunistas, altamente patógenas distribuidas en el ambiente representan un potencial riesgo, sobre todo para pacientes inmunodeprimidos.

Conociendo la necesidad de generación de herramientas que den resultados rápidos y confiables para un correcto diagnóstico y tratamiento de la enfermedad; se ha aplicado una técnica útil para la identificación de Micobacterias, considerando el hecho de su importancia e interés en la salud pública. En base a las necesidades observadas, para esta investigación se consideró la aplicación de la técnica Análisis de Patrones de Restricción (PRA) (8, 9) (8) para la identificación rápida de Micobacterias No Tuberculosas de crecimiento rápido y crecimiento lento, basándose en la técnica de Telenti (8, 10, 11), que involucra la amplificación del gen hsp 65 (12), un gen presente en todas las micobacterias, y el uso de enzimas de restricción

que generan segmentos con diferentes pesos moleculares, a estos segmentos se los denomina patrones de restricción. Estos patrones son comparados en una base de datos emitida por investigadores especialistas en el Micobacterias. Cabe mencionar que los patrones generados son específicos para cada organismo.

Este proyecto de investigación fue establecido basándose en los siguientes objetivos:

Objetivo General

- ✓ Tipificar micobacterias a partir de cepas inactivadas usando análisis de Patrones de Restricción mediante endonucleasas del tipo II.

Objetivos Específicos

- Implementar el procedimiento de análisis de Patrones de Restricción para la tipificación de Micobacterias a partir de cepas inactivadas como herramienta de diagnóstico para el Centro de Referencia Nacional de Tuberculosis y Otras Micobacterias.
- Analizar los resultados obtenidos de las cepas ecuatorianas mediante la metodología del análisis de Patrones de Restricción con el banco internacional de perfiles de restricción de micobacterias residente en el sitio web <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>.
- Comparar los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas convencionales.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades

La familia Mycobacteriaceae pertenece al orden *Actinomycetales* al igual que *Corinebacteria* y *Nocardiae* (13, 14). Se diferencia de estas dos últimas, por la propiedad de ser bacterias ácido-alcohol resistente y por el alto contenido de ácidos micólicos en su pared celular.

Las micobacterias son muy parecidas a las bacterias Gram positivas, aunque frente a la tinción de Gram son débilmente Gram positivas o no se tiñen, aunque ambos poseen peptidoglicano, en las micobacterias las moléculas unidas o asociadas a este polímero son de naturaleza lipídica en lugar de proteínas y lipopolisacáridos, como en otras bacterias (14, 15).

Presentan membrana plasmática y pared celular (16). La pared celular (Figura 1) está constituida por tres capas:

- Capa interna: compuesta por peptidoglicano, su estructura es similar a la de otras bacterias.
- Capa media: compuesta por polisacárido arabinogalactano, en sus extremos distales se encuentra esterificado con ácidos grasos de alto peso molecular, ácidos micólicos (60-90 átomos de C).
- Capa externa: no se conoce su composición exacta, pero se la relaciona con una estructura glucolipídica.

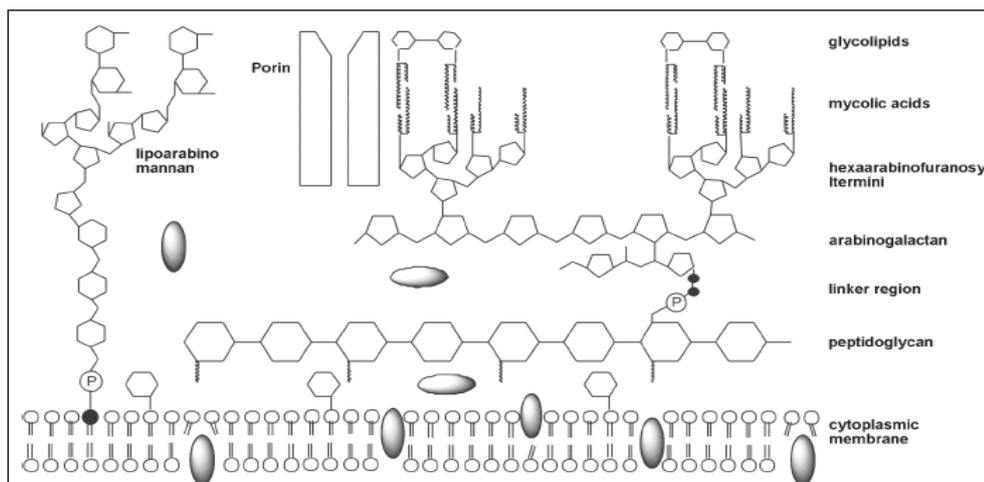


Figura 1. Esquema de la pared y membrana celular de las micobacterias (16).

La membrana plasmática de las micobacterias es una membrana biológica trilaminar clásica. Tiene características como la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomananos y fosfatidil-inositol-manósidos (14, 15).

A la compleja estructura de membrana se atribuye:

- Resistencia a fármacos

- Impermeabilidad a colorantes
- Resistencia a compuestos ácidos y alcalinos.
- Supervivencia dentro de macrófagos

La familia Mycobacteriaceae teniendo como único miembro al género *Mycobacterium*, consta de patógenos de alta relevancia a nivel mundial en la salud humana: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (y recientemente descubierta *Mycobacterium lepromatosis* (1, 2)), causantes de dos enfermedades de alto impacto en la población, Tuberculosis (TB) y lepra, respectivamente.

El género *Mycobacterium* comprende cerca de 100 especies, entre ellas patógenos primarios, oportunistas y saprofitas (14, 17), se caracterizan por ser bacilos de 3 a 5 μm de longitud, algunos ligeramente curvos en un extremo; inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, poseen alta resistencia a colorantes comunes, pero una vez teñidos, son resistentes a la decoloración con alcohol ácido. Algunos son aerobios y otros microaerófilos. En su estructura contienen entre 20-60% de lípidos y alto contenido de citosina-guanina en la composición del ADN, 60-72 moles (14, 15).

Las micobacterias tienen un metabolismo muy variable. Pueden ser cultivadas en medios sólidos y medios líquidos. Las micobacterias de crecimiento rápido (MCR) crecen alrededor de los 3 primeros días de cultivo en medios simples. Algunas micobacterias de crecimiento lento (MCL) necesitan medios enriquecidos. *M. leprae* aún no ha podido ser cultivada in vitro.

Después del descubrimiento de Koch en 1882, fueron identificadas múltiples micobacterias, pero eran comúnmente relacionadas con contaminación o colonización transitoria. No fue hasta 1950 cuando se relacionó al complejo MAC con enfermedad pulmonar y diseminada en pacientes con SIDA (14, 17, 18).

Muchas de las micobacterias son patógenas para el hombre y los animales y es bien conocido que la mayoría de las que afectan la salud humana pertenecen al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). La denominación de Tuberculosis (TB) comprende a la producida por el CMTB integrado por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti* (19–22).

Existen casos pulmonares en donde derivan el diagnóstico (por técnicas microbiológicas o de microscopía) a Tuberculosis (TB), por ser la principal micobacteria asociada a enfermedades pulmonares, haciendo a un lado la infección por micobacterias no tuberculosas (MNT). Esto sucede a menudo en países donde la carga de TB, es considerada de gran importancia sobre otras infecciones (23).

Las micobacteriosis no asociadas con TB, pueden ser confundidas en algunos casos, por la clínica o sintomatología muy parecida con TB resistente, o viceversa. Incluso, las pruebas para detección de baar son sensibles pero poco específicas, ya que se limitan a la detección del microorganismo pero no llegan a su identificación por la morfología.

El cultivo es sensible, pero también muy generalizado. En este tipo de técnica, se visualizan las colonias de micobacterias, pero solo se puede diferenciar si se trata de MCR (crecimiento de 3 a 10 días) o MCL (crecimiento en más de 10 días).

La principal técnica involucrada en el tratamiento adecuado de la TB ha sido la prueba de sensibilidad a drogas (PSD). Estos resultados son utilizados para proveer del tratamiento médico correcto a los pacientes dependiendo de las drogas a las que es sensible y resistente. Al presentarse un resultado de PSD con resistencia a más de tres drogas de primera línea, se suele sospechar de la presencia de una MNT. Si nos encontramos con casos como estos, las cepas o cultivos, son derivados a la práctica de técnicas bioquímicas de tipificación (PBT).

Los tratamientos para TB son largos y constan de diversas drogas, lo que provoca abandono de tratamientos, y son estos casos, a excepción de casos aislados (ej: VIH, Diabetes), los que involucran fracasos a los tratamientos y el apareamiento de cepas drogo resistentes.

1.2 Clasificación de las Micobacterias

Clasificación de las Micobacterias (24, 25). La clasificación de las Micobacterias ha sufrido una serie de cambios y adaptaciones ligados al tipo de parámetros considerados para su identificación. Timpe y Runyon en 1954 (13, 14, 17, 24–26) clasificaron en cuatro grupos a las Micobacterias (Tabla I) en base a la velocidad, producción de pigmento en presencia o ausencia de luz, y características coloniales.

Tabla I. Clasificación de las Micobacterias – Adaptado de Ramos e Silva (25, 27, 28).

Grupo	Velocidad de crecimiento	Gérmenes
Crecimiento Lento		
Grupo I Fotocromógenos	2 – 3	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. asiaticum</i> .
(Pigmento amarillo con luz)	Semanas	
Grupo II Escotocromógenos	2 – 3	<i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens</i>
(Pigmento naranja amarillo sin luz)	Semanas	
Grupo III No Cromógenos	2 – 3	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. malho</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. haemofilum</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. paratuberculosis</i> .
(No producen pigmentos)	Semanas	
Crecimiento Rápido		
Grupo IV	3-5 días	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. immunoenum</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. goodi</i> , <i>M. wolinskyi</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. septicum</i> , <i>M. senegalense</i> .
No Cultivable		<i>M. leprae</i>

Caminero en el 2001 (17) , expone una clasificación en base a las enfermedades que ellas producen (0):

Tabla II. Clasificación de las Micobacterias por las enfermedades que producen (17).

Enfermedad	Especie común	Geografía	Morfología	Inusuales
Pulmonar	<i>M. avium complex</i>	Todo el mundo	Lento crecimiento no pigmentada	<i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. fortuitum</i>
	<i>M. kansasii</i>	USA, Europa	Pigmentada	<i>M. celatum</i> <i>M. asiaticum</i>
	<i>M. abscessus</i>	Todo el mundo, pero mayoría USA.	Crecimiento rápido	<i>M. shimodii</i> <i>M. haemophilum</i>
	<i>M. xenopi</i>	Europa, Canadá	No pigmentada	<i>M. smegmatis</i>
	<i>M. malmoense</i>	Norte de Europa, Inglaterra	Lento crecimiento Pigmentada	
Linfadenitis	<i>M. avium complex</i>	Todo el mundo	Lento crecimiento no pigmentada	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. haemophilum</i>
	<i>M. scrofulaceum</i>	Todo el mundo	Por lo general no pigmentada	
	<i>M. malmoense</i>	Norte de Europa, Inglaterra	Pigmentada	
Cutánea	<i>M. marinum</i>	Todo el mundo	Lento crecimiento	<i>M. avium complex</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. haemophilum</i>
	<i>M. fortuitum</i>	Todo el mundo, aunque mayoría USA.	Fotocromógena, bajas temperaturas	
	<i>M. chelonae</i>	USA	Rápido crecimiento, no pigmentada	
	<i>M. abscessus</i>	Australia, trópicos	Crecimiento rápido	
	<i>M. ulcerans</i>	África, Asia	Crecimiento lento, pigmentada	
Diseminada	<i>M. avium complex</i>	Todo el mundo	Cultivos de VIH pigmentadas	<i>M. abscessus</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. genavense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. marinum</i> <i>M. fortuitum</i>
	<i>M. kansasii</i>	USA	Fotocromógenas	
	<i>M. chelonae</i>	USA	No pigmentada	
	<i>M. haemophilum</i>	USA, Australia	No pigmentada, requiere hemina, bajas temperaturas y CO ₂	

Además de las clasificaciones ya conocidas, se han hecho otras propuestas (Tabla III y Tabla IV):

Tabla III. Esquema de clasificación clínica de Micobacterias No Tuberculosas propuesto por Woods y Washington (29, 30).

Especies potencialmente patógenas en humanos	
<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. genavense</i>
<i>M. fortuitum-chelonae complex</i>	<i>M. marinum</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. haemophilum</i>
<i>M. szulgai</i>	<i>M. celatum</i>
<i>M. malmoense</i>	
Micobacterias saprofitas que raramente causan enfermedad en humanos	Especies con tasa media de crecimiento
	<i>M. flavescens</i>
	Especies de crecimiento rápido
<i>M. gordonae</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. terrae-triviale complex</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. shimoidei</i>	<i>M. parafortuitum complex</i>
<i>M. gastri</i>	<i>M. plhei</i>
<i>M. nonchromogenicum</i>	
<i>M. paratuberculosis</i>	

Tabla IV. Clasificación de Micobacterias que comúnmente causan enfermedades en humanos (29).

Mycobacterium tuberculosis complex
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium africanum</i>
Mycobacterium leprae
Micobacterias de Crecimiento lento
<i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium marinum</i> <i>Mycobacterium avium complex</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium malmoense</i> <i>Mycobacterium simiae</i> <i>Mycobacterium ulcerans</i> <i>Mycobacterium xenopi</i>
Micobacterias de Crecimiento Rápido
<i>Mycobacterium fortuitum (grupo)</i> <i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium abscessus complex</i> <i>Mycobacterium mucogenicum</i>

1.3 Mecanismo de Infección

1.3.1 Mecanismo de Infección de la TB

Los bacilos de Koch son adquiridos del aire a través de pequeñas gotas de saliva (14, 17, 31) cargadas de bacilos, que expulsa la persona infectada con tuberculosis pulmonar (4). La probabilidad de enfermar, está mediada por la cantidad de bacilos contenida en las gotas y el grado de inmunidad del individuo expuesto.

Los bacilos de *M. tuberculosis* ingresan en la vía respiratoria y son arrastrados por las corrientes de aire al interior de los pulmones, pasan por los bronquios lobulares, los bronquios segmentados hasta llegar y asentarse en los alvéolos. Es aquí, en los alvéolos, donde son detectados por los macrófagos, células primarias del sistema inmune, y son endocitados en espera de que se activen los receptores responsables de la respuesta inmune.

El bacilo de la TB es difícilmente detectado debido a que disminuye la producción de interferón gamma ($\text{Inf } \gamma$), uno de los principales activadores de la fagocitosis, por lo tanto ellos se encuentran multiplicándose dentro de los macrófagos (Figura 2).

En el estado latente de la enfermedad, al fracasar la fagocitosis, macrófagos activados se fusionan a los macrófagos infectados para formar los granulomas. En ellos se encapsulan grandes cantidades de bacilos que, debido a que carecen de toxicidad primaria (14, 25) han sido inadvertidos dentro de los macrófagos y estos se han multiplicado a una velocidad de 1 cada 12 o 24 horas. Los granulomas son una respuesta del sistema inmunitario ante la presencia de un agente o cuerpo que no ha podido identificado y eliminado, por lo tanto solo se aísla. Aquí, continúan multiplicándose, pero no necesariamente el individuo enferma.

Mientras el sistema inmune del individuo se encuentre estable, este será lo suficientemente fuerte y hábil para mantener los bacilos en estado latente o dormido, una vez que las barreras inmunitarias se han debilitado, los bacilos contenidos en los granulomas provocan que este se rompa, y estos bacilos son liberados al sistema,

viajan por la sangre hasta la parte superior de los pulmones, incluso infectando otros órganos, entonces se produce la enfermedad (Figura 3).

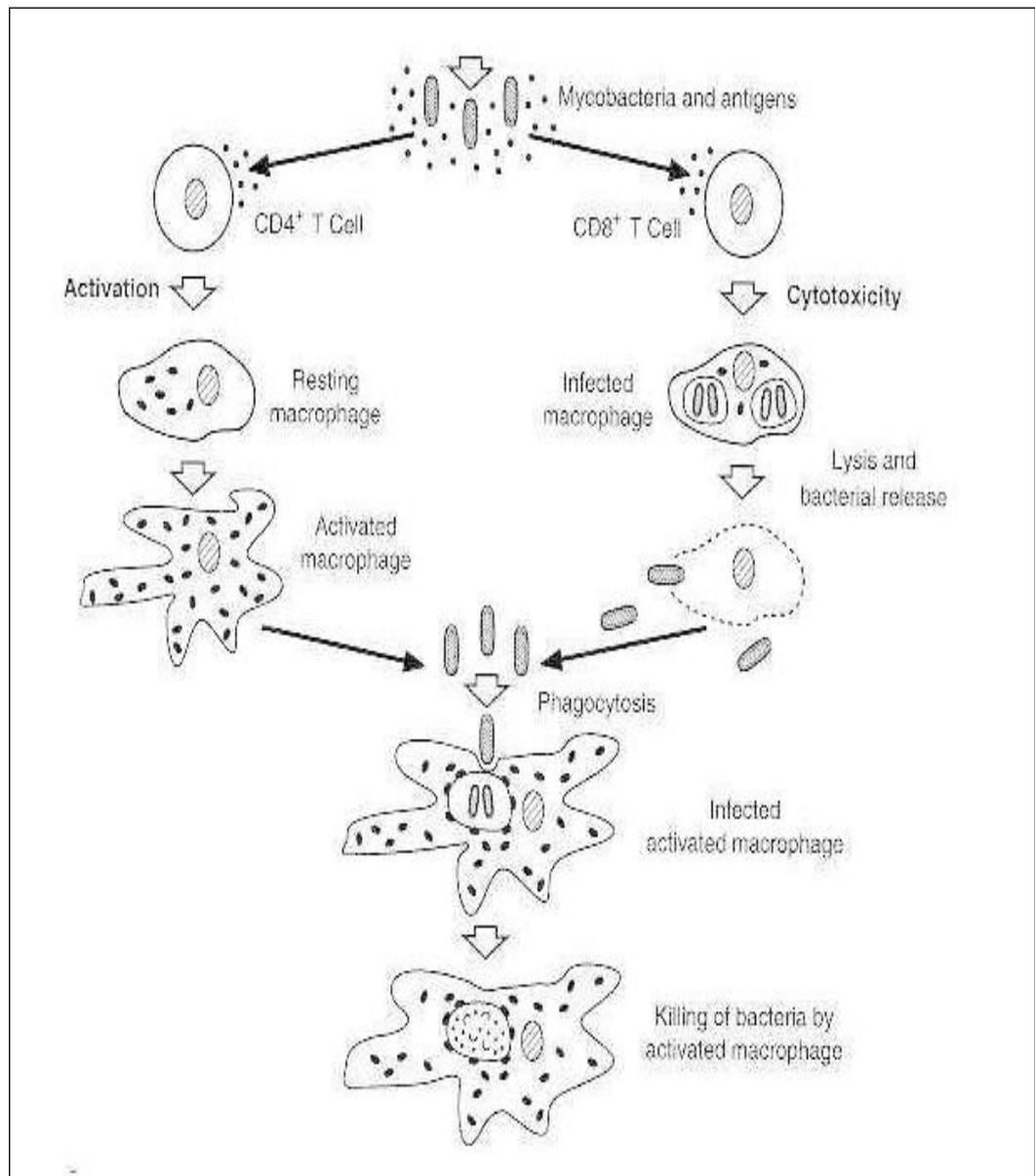


Figura 2. Mecanismo Principal de Activación de Linfocitos-T o destrucción de macrófagos por antígenos micobacterianos (32).

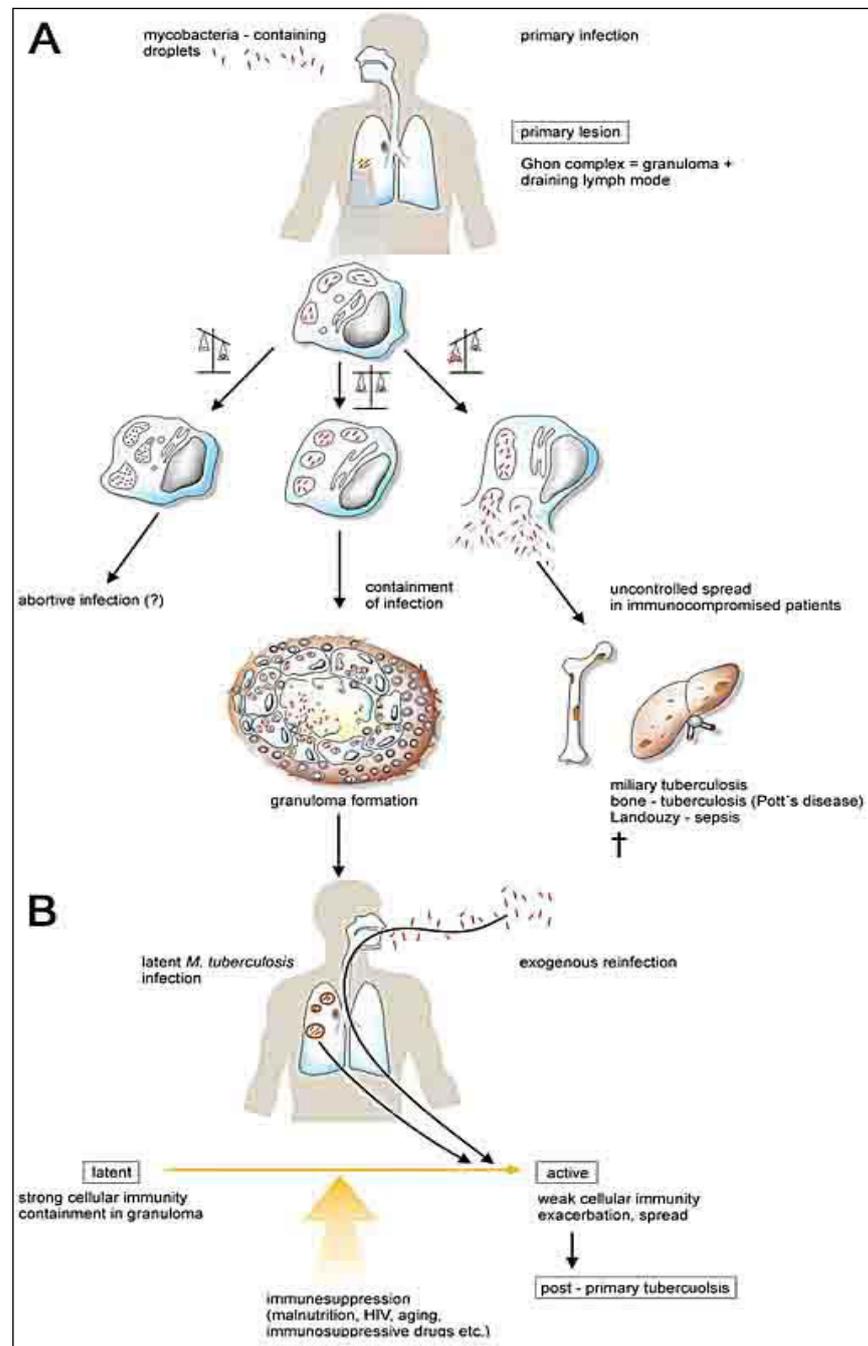


Figura 3. Balance entre *Mycobacterium tuberculosis* y el sistema inmune del hospedero (33).

Existen factores de riesgo (Tabla V) que aumentan la probabilidad de desarrollar tuberculosis después de una infección primaria, e incluso pueden hacerla más grave.

En general, todas las condiciones que involucren depresión del sistema inmunológico pueden ser factores de riesgo, como lo indican Farga y Caminero (17, 25) en el siguiente cuadro:

Tabla V. Factores de Riesgo que aumentan la probabilidad de contraer Tuberculosis (25).

FACTORES DE RIESGO DEMOSTRADOS
<p>Infección por VIH/SIDA</p> <p>Infecciones recientes</p> <p>Lesiones fibróticas pulmonares</p> <p>Silicosis</p> <p>Tratamientos con anti-TNF</p> <p>Insuficiencia renal, trasplante renal</p>
FACTORES DE RIESGO CON INSUFICIENTE EVIDENCIA O DE MENOR IMPACTO
<p>Resecciones gastrointestinales</p> <p>Enfermedades malignas del sistema linfático</p> <p>Diabetes</p> <p>Hemofilia</p> <p>Tratamientos prolongados con cortico esteroides y otros inmunosupresores</p> <p>Embarazo y puerperio</p> <p>Abuso de sustancias adictivas: tabaquismo, alcoholismo y otras</p> <p>Edades extremas</p> <p>Desnutrición proteica y peso inferior al normal</p> <p>Factores sociales</p> <p>Poblaciones especiales</p> <p>Factores genéticos</p> <p>Toda condición con severa depresión de la inmunidad celular</p> <p>Factores asociados a <i>M. tuberculosis</i></p>

La edad es un factor considerado importante durante una infección por *M. tuberculosis*; esto se relaciona a que en diferentes épocas de la vida el ser humano se encuentra en un constante desarrollo y madurez, sufre alteraciones y cambios en el sistema inmunológico (25). Por ejemplo, durante los primeros años de vida, el organismo se encuentra adaptándose al medio y reforzando un sistema inmunológico que se está formando, si ocurre una primoinfección en el lactante (25), pueden desarrollarse diseminaciones hematógenas lo que es muy grave (17, 25). Durante la pubertad, entre los 12 y 15 años, el desarrollo hormonal provoca cierto desbalance en el sistema inmunológico, si se da una infección es muy seguro que se desarrolle la enfermedad; y, durante la vejez, la infección se relaciona a menudo con reinfecciones, ya sea de tipo endógena o exógena.

La sintomatología pulmonar es por lo general variable e inespecífica. Esto dificulta un diagnóstico claro y conciso. Cuando el diagnóstico se deriva de una prueba radiológica sugestiva para TB y una BK positiva, se diagnostica como tuberculosis pulmonar (TBP) y el paciente es ingresado directamente al tratamiento con drogas antituberculosas.

1.3.2 Mecanismos de infección de Micobacterias No Tuberculosas

Si bien es cierto, un individuo enfermo es un reservorio de micobacterias, pero se sabe poco de infecciones causadas de persona a persona. El principal reservorio y medio de infección es el ambiente contaminado, ya sea el suelo, el agua o los alimentos (14, 17, 18).

El mecanismo de infección más aceptado ha sido el de dispersión de microorganismos en la afección respiratoria y su ingestión vía digestiva, común en casos de linfadenitis en niños y en las formas diseminadas de SIDA (colonización del tracto digestivo) (17). Esto es referente a la escasa evidencia de transmisión de la infección por personas infectadas por MNT. Aún se desconocen las diversas rutas de infección por MNT. Otro mecanismo de transmisión puede ser vía cutánea (25) al mantener contacto cercano con heridas expuestas altamente infecciosas. Aunque esto no necesariamente involucra una infección como en TB o lepra (14).

Las infecciones diseminadas por MNT son observadas comúnmente en pacientes cuyos Linfocitos T CD4+ decaen en los 50 ml ($CD4 < 50$) (17, 23, 34). Por ello se considera que en los países con altos endemismo de coinfección TB-VIH (18, 21, 35), los pacientes con SIDA usualmente mueren de TB u otra infección antes de que sus células CD4+ decaigan tanto como para permitir que haya una infección por MNT (23).

Pueden existir otros hechos no ligados a la infección con VIH que pueden provocar que el sistema inmunológico se debilite. Casos como transplantes, enfermedades de co-morbilidad (afecciones al sistema respiratorio), y otros casos asociados. Algunos autores reportan la importancia de la susceptibilidad genética frente a una infección por MNT, como sucede en una mutación múltiple en el gen receptor 1 al interferón-c (36), y con consanguinidad parental.

1.4 Epidemiología

1.4.1 Tuberculosis en el Mundo

Los principales parámetros que permiten analizar la situación de la Tuberculosis en un grupo humano son: las tasas de infección, de morbilidad y mortalidad (31).

La TB en el 2013 produjo 9 millones de casos nuevos, y 1.5 millones de muertes, entre ellos 80 mil niños y 360 mil casos TB-VIH a nivel mundial (4).

En 2005 y 2006 se reportaron 9.1 y 9.2 millones de casos nuevos respectivamente a nivel mundial. Para el año 2007, la OMS (37) reportó 5.6 millones de casos nuevos, con un estimado de 1.32 millones de muertes, entre ellos 456 mil eran VIH positivos.

La Organización Mundial de la Salud estimó que en el año 2008 la incidencia global de casos nuevos de tuberculosis fue de 9.4 millones; la mayoría de estos casos se presentaron en Asia (54,2%) y África (29,8%), con una menor proporción en las regiones del Mediterráneo Oriental (6,9%), Europa (4,6%) y las Américas (3%). India y China juntas reportan cerca del 40% de los casos de TB en el mundo. África tiene las tasas de muerte per cápita más altas (31).

En el 2011 (38) se reportaron 9 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes, 430 mil correspondía a personas VIH positivas.

La estimación de la carga de TB en niños (menores de 15 años) es difícil. Hubo un estimado de medio millón de casos y 64 mil muertes de niños en 2011. En este mismo año fueron notificados a los programas nacionales de control de la tuberculosis (PCT)

y reportados a la OMS 5.8 millones de casos nuevos diagnosticados; sobre 3.4 millones de casos notificados en 1995, pero estos datos corresponden tan solo a dos tercios del total estimado para el 2011: 8.7 millones de casos.

A nivel mundial, se estima que el 3,7% de los casos nuevos y el 20% de los casos antes tratados (AT) son Tuberculosis Multidrogo Resistente (TB-MDR). Las mayores proporciones de pacientes con TB-MDR se encuentran en Europa oriental y Asia central. India, China, la Federación de Rusia y Sudáfrica tienen casi el 60% de los casos mundiales de TB-MDR. Casi el 80% de los casos de tuberculosis con coinfección de VIH (TB-VIH) residen en África (38), estas cifras siguen aumentando.

1.4.1.1 Situación de la tuberculosis en Ecuador

Aunque el número de casos nuevos sigue en aumento, las tasas de incidencia empiezan a descender lentamente, alrededor del 1% por año en todas las regiones, exceptuando Europa, en donde las cifras son estables (31).

La tuberculosis aún en la actualidad es considerada un problema de Salud Pública en nuestro país (39, 40). Aunque el área de la Salud, encargada de notificar los avances a nivel nacional de los PCT, reporta una disminución en los indicadores epidemiológicos para los últimos 10 años, para el año 2006 se observa una prevalencia del 42% de casos de tuberculosis pulmonar con Baciloscopías Positivas (TBP BK+) (Figura 4) (41). A pesar de que para este año, aún no se había

implementado la Estrategia de tratamiento acortado directamente observado (por sus siglas en inglés DOTS) en todos los establecimientos del Ministerio de Salud (41).

Según datos del PCT, la tasa de éxito en el resultado del tratamiento fue de 85%, siendo afectado principalmente por los abandonos: 8%, aunque estos reportes solo corresponden a las Provincias en donde se implementó la técnica DOTS.

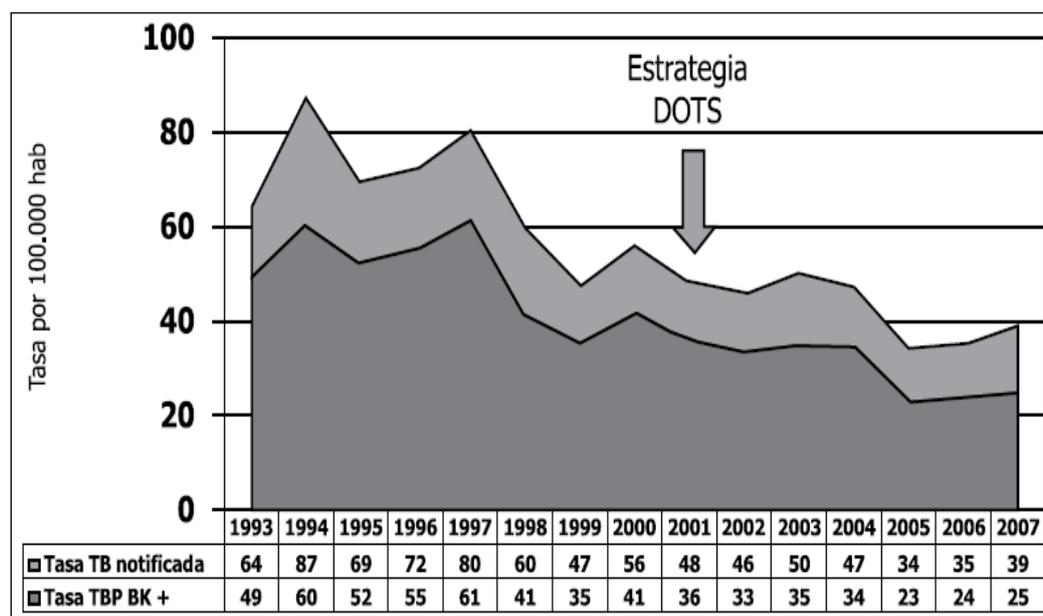


Figura 4. Tasas de casos nuevos en todas sus formas e incidencia TBP BK (+). Ecuador, 1993-2007 (41).

La OMS reporta que en el 2011 (6), 6,2 millones de casos TB fueron notificados a los PCT y OMS; 5,8 millones correspondían a casos nuevos y 0.4 millones a pacientes tratados previamente a los que se les habían cambiado el tratamiento.

Los casos de TB notificados se han estabilizado en los últimos años, en 2011 se encuentra representado por el 66% de los casos (rango de 64-69%) de la incidencia de casos estimados. Se necesita mayores esfuerzos para garantizar que todos los casos detectados sean notificados al PCT.

1.4.1.2 Incidencia de Casos de Tuberculosis a Nivel Mundial

La Tuberculosis continúa siendo una enfermedad de alto impacto, que afecta principalmente a poblaciones de bajos recursos, esto se debe a las condiciones de vida, estado inmunológico de los individuos expuestos, y la accesibilidad a la medicación **adecuada**.

En los años 2012 y 2013 no se reporta un alto impacto en la incidencia de casos (Figura 5). Estas cifras son estables. Pero es notable el cambio y el impacto entre los años 2010 al 2013 (Figura 6Figura 7). Se observa una disminución de casos nuevos en algunos países, pero en otros han aumentado. Esta disminución de casos nuevos, no necesariamente explica la ausencia de los mismos, puede deberse a la mala gestión de reporte de casos o a la difícil accesibilidad a estos datos.

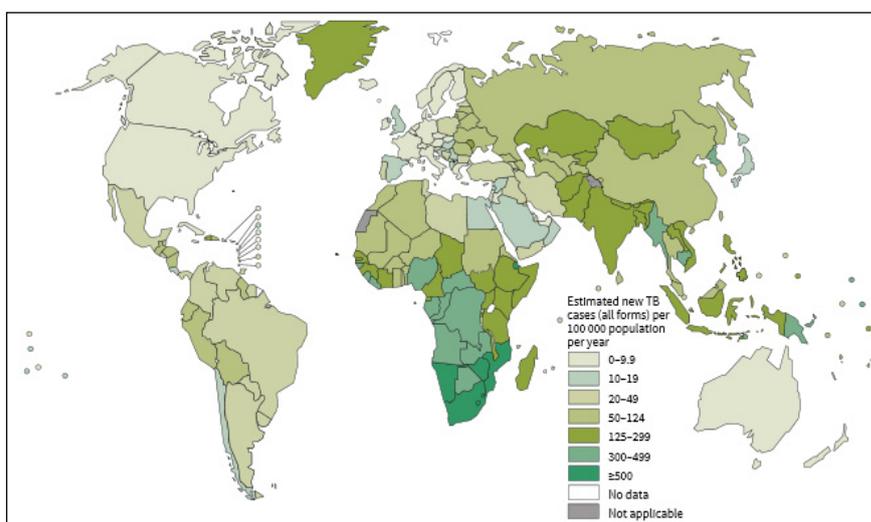


Figura 5. Tasa Estimada de Incidencia de Tuberculosis, 2013 (4).

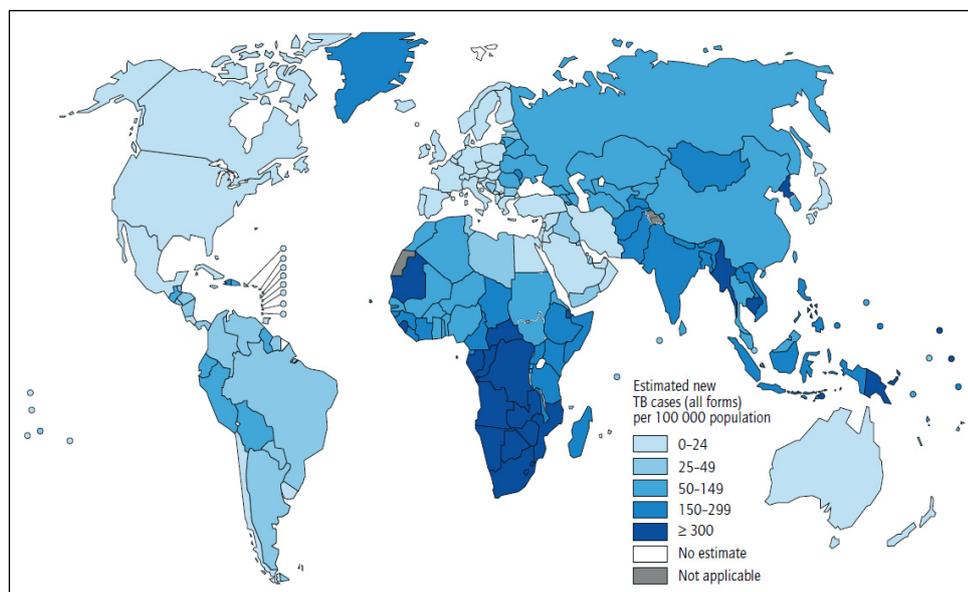


Figura 6. Tasa Estimada de Incidencia de Tuberculosis, 2011 (6).

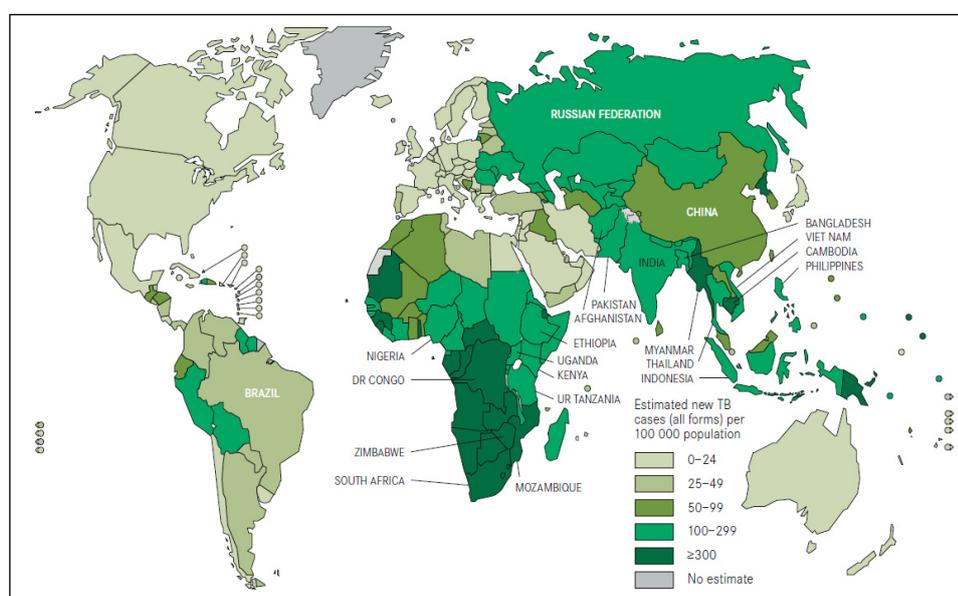


Figura 7. Tasa Estimada de Incidencia de Tuberculosis, 2010 (40).

1.4.2 Micobacterias No Tuberculosas en el Mundo

La mayoría de las infecciones clínicas (>90%) se encuentran relacionadas con MNT de crecimiento rápido, lideradas por *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscesus*,

comúnmente asociadas con infecciones de heridas quirúrgicas como en operaciones cardíacas, mamoplastias y otras cirugías estéticas (17).

M. abscesus y *M. fortuitum* están ligadas a alteraciones gastroesofágicas. *M. abscesus* reporta el 85% de casos de infecciones pulmonares, *M. avium* y *M. scrofulaceum* se encuentran presentes en niños con adenopatías periféricas.

La clínica más comúnmente observada, además de la ya mencionada, ha sido pulmonar, absceso en la piel y partes blandas, linfadenitis y osteomielitis; este último asociado con el complejo *M. avium* (MAC), *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. scrofulaceum* (17).

La Unión Internacional por las Enfermedades del Pulmón y la Tuberculosis (International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases IUATLD por sus siglas en inglés) revisó los datos de 14 países y se encontró que el MAC, fue la especie más frecuentemente aislada en los catorce países. Entre ellos se incluye China, Korea e India. Mientras que *M. fortuitum* fue descrita como más frecuente en Bélgica (2,1%), República Checa (17,5%), Dinamarca (5,3%), Finlandia (6,7%), Francia (6,5%), Alemania (12,2%), Italia (2,5%), Portugal (16,5%), España (10,8%), Suiza (17,5%), Turquía (33,9%) y el Reino Unido (6,0%) (23).

En Ecuador no existen reportes oficializados sobre infecciones causadas por MNT, ya que no son consideradas de alto impacto como es el caso de la TB. Algunas de ellas

se reportan dentro de las enfermedades desatendidas con mayor afluencia de infecciones causadas por el complejo MAC.

1.4.3 Control Mundial de Infecciones Causadas por Micobacterias

1.4.3.1 Control de Tuberculosis en Ecuador

En Ecuador existe el Programa de Control de la Tuberculosis (PCT) (39, 41, 42) es el sistema que brinda atención integral, y coordina con otros proveedores del sector de la salud, asegurando la detección, diagnóstico y tratamiento, con la finalidad de disminuir la morbilidad, mortalidad y evitar la reaparición de resistencia a drogas antituberculosas.

El PCT fue desarrollado para el cumplimiento de los objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM), Sistema Nacional de Salud (SNS) y Derechos Humanos (DDHH), con abordaje integral, sistemático y sostenido: lograr disminuir la morbilidad y mortalidad de tuberculosis en el país para el año 2015 (41, 43).

Su rol principal consiste en realizar un control de la tuberculosis mediante el acceso a un diagnóstico de calidad y el cumplimiento con el tratamiento directamente observado (DOTS) para reducir la carga socioeconómica sujeta a la TB, y proteger las poblaciones vulnerables contra la TB, la coinfección TB/VIH y el desarrollo de más casos de TB-MDR.

El PCT para garantizar el cumplimiento cabal de sus objetivos, se encuentra integrado por especialistas multidisciplinarios y expertos en la asistencia y control de la

Tuberculosis, como Médicos, Enfermeras, Laboratorista, Trabajadores Sociales, Psicólogos y otros.

El Ministerio de Salud Pública (MSP), a través de los centros de salud, Hospitales y áreas de salud, y todos los organismos que forman parte del PCT, se encargan de detectar casos nuevos y realizar el seguimiento cercano al progreso del paciente. La detección de casos es identificar precozmente a los enfermos de TBP mediante búsqueda y captación permanente de sintomáticos respiratorios (SR), que son las personas que presentan tos y flema por más de 15 días, ya que los paciente con TBP además de ser muy contagiosos, son los de mayor mortalidad. Al detectar un caso, se debe iniciar inmediatamente el tratamiento correspondiente de manera oportuna. Esto sirve para cortar la cadena de transmisión de la enfermedad y prevenir la muerte de los enfermos.

Un caso es toda persona diagnosticada con TB, con o sin confirmación bacteriológica (cultivo) y a quien se inicia un tratamiento antituberculoso. El tipo de caso se define por la localización de la enfermedad, el resultado de la baciloscopía (BK), y por los antecedentes del paciente, es decir si ha recibido tratamiento previo contra la TB.

Se puede considerar que una persona padece TBP cuando el resultado de una o más baciloscopías son positivos (TBPBK+); si se observa una o más BK- y un cultivo + (TBPBK-C+); o cuando el paciente presenta una o más BK- y un cultivo -, pero en base a criterios clínicos, epidemiológicos, inmunológicos o diagnóstico por imágenes (rayos X), el médico (solo el médico) lo considera un caso de TBPBK-C-.

Un caso de tuberculosis extra pulmonar (TBEP) se diagnostica en pacientes que tienen TB en otros órganos que no son los pulmones, y a los que se debe ingresar a tratamiento.

Los tipos de TBEP que se observan frecuentemente son: pleural, ganglionar, genitourinaria, osteoarticular, miliar, meníngea.

1.4.3.2 Migración y TB

Aunque se cree que por el hecho de haber controlado las tasas de Tuberculosis en los países industrializados y del primer mundo la enfermedad había desaparecido, en las últimas décadas se observa un notorio aumento de casos, esto se debe principalmente a la falta de control y apoyo a países subdesarrollados, quienes sustentan un alto número de casos de TB, y la migración de muchos casos no reportado o no controlados a estos países desarrollados.

Estos casos, no solo provocan aumento de estadísticas por los casos propiamente; adicionalmente expanden la enfermedad generando la aparición de nuevos casos en los habitantes originarios de ciertos sitios. Estos casos son más difíciles de captar debido a la poca cobertura y escaso control de pacientes migrantes.

En muchos países desarrollados, se puede observar una doble curva en la tendencia de casos de TB, una descendente, propia de enfermos nacidos en el país, y una ascendente, correspondiente a enfermos nacidos en otros países. En algunos casos, estas curvas ya se han cruzado. Son pocos los países que se han preocupado de llevar

un control para Tuberculosis durante el ingreso de migrantes, aunque en algunos casos estas medidas son poco eficaces.

Estos mecanismos de control incluyen una radiografía de tórax (que es un procedimiento muy generalizado) para descartar Tuberculosis pulmonar, o la prueba de la tuberculina, que se ha observado en algunos casos puede generar efectos secundarios; como en los casos reportados en Estados Unidos, donde pacientes con SIDA, a los que se les inyectó la PPD-B (7, 44), un antígeno preparado de una cepa de *M. intracellulare* (cepa catalogada dentro del complejo *M. avium*) reaccionaron adquiriendo una enfermedad por micobacterias no tuberculosas.

1.5 Micobacterias No Tuberculosas

El término Micobacterias Atípicas fue introducido por Timpe y Runyon en 1954 (13, 14, 17, 26), para diferenciarlas de MTB y *M. leprae*. Otro término utilizado es Micobacterias Ambientales (MA) debido a que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, y pueden ser aisladas de suelo, lagos, ríos, pantanos, piscinas, acuarios, polvo y vegetación, incluso de grifos y desagües, así como de algunos vertebrados de sangre fría como los batracios, serpientes y peces. En el ser humano se pueden aislar de saliva, piel y heces (10, 18, 25, 27, 45–47). En la actualidad se las denomina micobacterias no tuberculosas (MNT) ya que como su nombre lo indica, son bacterias consideradas fuera del complejo tuberculoso.

En las últimas décadas se ha observado una creciente tendencia en infecciones por MNT, son capaces de producir enfermedades y debido a ello, se han vuelto de interés

y alta importancia en diversos estudios que reportan y describen el rol de las micobacterias no tuberculosas en enfermedades humanas y animales (17, 48, 49).

En los últimos años se ha descrito un aumento de casos por MNT en países desarrollados, principalmente en personas con SIDA incluyendo niños. Antes del apareamiento de la epidemia de SIDA, las muertes causadas por micobacterias no tuberculosas eran pulmonares, confinadas a nódulos de linfomas cervicales, limitadas a la piel, aunque en raros casos, diseminadas al resto del cuerpo. Las enfermedades pulmonares eran encontradas predominantemente en personas de sexo masculino de aproximadamente 60 años.

Como resultado de diversos estudios se concluyó que el riesgo de infección depende del grado de inmunodepresión del paciente, estos casos se relacionan a procesos obstructivos pulmonares, en pacientes inmunodeprimidos, personas que reciben trasplantes, o en casos postquirúrgicos.

No existen datos o estudios concretos sobre la incidencia o prevalencia de infecciones por MNT. Los datos encontrados son sugestivos y aproximados, y se encuentran ligados a los emitidos por los laboratorios en base a identificación y aislamientos. Las infecciones por MNT más comunes incluyen enfermedades pulmonares, pero también se puede observar lesiones en la piel, tejidos blandos y linfáticos (49).

Se conoce poco acerca de un período de latencia de la infección causada por MNT; por su parte el agente causal de la infección se encuentra ligado a la zona geográfica en donde predominan, a esto se puede asociar el grado de inmunodepresión o la edad.

En ausencia de evidencia de transmisión persona-persona, se propuso que las personas eran infectadas a través de recursos ambientales vía aerosoles, es decir captadas del medio ambiente (7, 17, 50, 51). Las diferencias regionales en la frecuencia de personas que muestran evidencia de una infección predominantemente por micobacterias no tuberculosas, fueron consistentes con esta hipótesis (44) ya que se asegura que existe una variabilidad geográfica y estacional en la distribución de las MNT. También se propuso que, la infección por micobacterias no tuberculosas, podría proveer de cierto grado de inmunidad frente a una infección por *M. tuberculosis* (44, 52), esto no es un hecho.

Los mecanismos o rutas de infección se asocian a los reservorios para cada especie y en base a ello se estima el posible origen de brotes infecciosos. *M. avium complex* tiene su reservorio en los grifos de agua, evidenciadas en epidemias por transmisión a través de grifos de hospital. De igual manera, el reservorio para *M. kansasii* son los sistemas de conducción de agua y grifos. *M. xenopi* necesita temperatura mayor a 28 °C, comúnmente aislada de grifos con calefacción. *M. marinum* se transmite a través de agua salada, agua embalsada y piscinas, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscesus*, son aisladas principalmente de la tierra y el agua.

En España, *M. kansasii* es la MNT más frecuente en aislados de pacientes sin SIDA, *M. avium complex* es la segunda más frecuente. El escenario cambia para las personas con SIDA, quienes principalmente se encuentran infectadas con *M. avium complex*. Ciertos casos pueden estar asociados a factores de riesgo como tabaquismo,

existencia de patología pulmonar subyacente (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), silicosis, TB residual y bronquiectasias (17).

La Unión Internacional por la Enfermedades del Pulmón y la Tuberculosis (IUATLD por sus siglas en inglés) revisaron los datos de 14 países y encontraron que el complejo *M. avium* (MAC) fue la especie más frecuentemente aislada en los catorce países. Entre ellos se incluye China, Korea e India. Mientras que *M. fortuitum* fue descrita como más frecuente en Bélgica (2,1%), República Checa (17,5%), Dinamarca (5,3%), Finlandia (6,7%), Francia (6,5%), Alemania (12,2%), Italia (2,5%), Portugal (16,5%), España (10,8%), Suiza (17,5%), Turquía (33,9%) y el Reino Unido (6,0%), lo que sugiere que estos ambientes son el reservorio de estas MNT (23).

1.5.1 Origen de las Infecciones por Micobacterias No Tuberculosas

Las MNT, son consideradas microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza, por ello se sugiere que en pacientes con antecedentes de afecciones pulmonares, existe la posibilidad de contaminación o de infecciones transitorias, ya que en muestras de esputo han sido aislados muy pocos microorganismos, este cuadro clínico es la colonización, que se caracteriza por mínimos infiltrados pulmonares, estables, no cavitados y con aislamientos esporádicos de MNT en el esputo (17).

Se desconoce el apareamiento de muchas micobacterias, pero algunas han podido ser aisladas a partir de su posible origen. Por ejemplo: *M. chelonae* fue aislada de la tortuga en 1903, *M. fortuitum* (antiguamente *M. ranae*) fue aislado en 1905 de un sapo y en 1938 de una infección cutánea, *M. abscesus* fue aislada en 1953 de un absceso de rodilla (25).

1.5.2 Casos Micobacterias No Tuberculosas

En un estudio se encontró la relación entre personas de raza blanca con linfadenitis por MNT y personas no caucásicas se relacionan con TB (23, 53). Esto explica porque las poblaciones con altas tasa de TB presentan baja de tasa de infección por MNT (23).

En Tailandia (54), se encontró que cerca de la mitad (46%) de los casos asociados con infecciones por MNT VIH negativos, fueron asociados a granjeros.

Los órganos comúnmente asociados son los nódulos linfáticos (89%), seguidos por piel y tejidos blandos (26%). Las heridas generadas por las actividades agrícolas, expuestas a agua o suelo contaminadas con MNT invaden los tejidos causando una infección.

1.6 Tratamiento Médico

1.6.1 Tratamiento Médico para Tuberculosis

Se realizan controles mensuales del tratamiento, por técnica de baciloscopía. El resultado esperado, para un paciente sensible a todas las drogas de primera línea es que al segundo mes de tratamiento se encuentre negativizando. Si los controles resultan positivos, más del tiempo esperado, se solicita una Prueba de Sensibilidad (PSD) al Laboratorio Nacional. El resultado obtenido de la PSD guiará al médico en el seguimiento del caso.

La eficacia del Esquema Uno (Tabla VI) se basa en el cumplimiento total de las dosis más que en el número de meses de tratamiento, este esquema está indicado para todos los casos nuevos:

- Casos nuevos con TBP, BK+, BK-C+, BK-C-.
- Casos con TBEP
- Casos nuevos con coinfección TB-VIH.

El esquema dos (Tabla VI) está indicado para todos los casos pulmonares o extra pulmonares confirmados con baciloscopía y cultivo en cuyo antecedente se indica ser antes tratado (41):

- Recaídas
- Abandonos recuperados
- Fracazos al tratamiento

De no ser el tratamiento correcto, la infección puede empeorar, debido a ello es recomendable esperar el resultado de cultivo y posteriormente una prueba de sensibilidad (PSD) para conocer, en cierta forma, en un escenario más amplio el caso, con la finalidad de dar el diagnóstico correcto y el tratamiento adecuado.

Tabla VI. Categorías de tratamiento antituberculoso en Ecuador (41)

Categoría de Tratamiento Antituberculoso	Pacientes con Tuberculosis	Regímenes Terapéuticos	
		Fase Inicial	Fase de Continuación
Esquema I	Casos nuevos: TBPBK + TBPBK - C + TBPBK - C - TB extrapulmonar Comorbilidad TB/VIH	2HRZE	4H ₃ R ₃
Esquema II	Casos con tratamiento previo: Recaídas Abandono Recuperado Otros	2HRZES- 1HRZE	5H ₃ R ₃ E ₃
III (TB infantil menores de 7 años)	Caso de TB infantil < 7 años	2HRZ	4H ₃ R ₃
IV	En caso de resistencia a drogas de primera línea y/o segunda línea)	Regímenes estandarizado e individualizado para TB MDR.	

1.6.2 Tratamiento de Micobacterias No Tuberculosas

La mayoría de las MNT son resistentes a los fármacos antituberculosos de primera línea, aunque son sensibles a una parte de los antibióticos tradicionales (Anexo A y B). Existen características fisiológicas de las micobacterias no tuberculosas que sirven como impedimento para que se logre una terapia efectiva; estas dos características, la alta hidrofobicidad de la superficie celular y la barrera de permeabilidad, se cree son las que contribuyen en la resistencia a un amplio rango de antibióticos.

El tratamiento varía en relación a la MNT que se encuentra infectando al paciente y de la sensibilidad antimicrobiana. Aún existen dudas sobre el tiempo de tratamiento y las dosis; esto va a depender de factores como la especie, el estado inmunológico del paciente y la presentación clínica. En pacientes VIH (+) se debe tomar mayor atención, ya que los factores a analizar son más específicos, como la estabilidad de la enfermedad, la edad del paciente, los efectos secundarios, la tolerancia y la larga duración del tratamiento antibiótico.

El tiempo adecuado para un tratamiento a MNT se estima hasta de 12 meses después de la negativización del cultivo. Las mejoras se observan entre el tercer y sexto mes del inicio de tratamiento, en caso contrario, existe sospecha de resistencia o mala tolerancia al tratamiento antimicrobiano (17).

Se presume que la relativa hidrofobicidad de las micobacterias no tuberculosas restringen la actividad de la mayoría de las drogas hidrofílicas; esta observación ha motivado la síntesis de pruebas a derivados hidrofóbicos de drogas que delimitan la actividad anti-micobacteriana. Estos derivados hidrofóbicos han demostrado grandiosas actividades anti-micobacterianas; por ejemplo, Rifabutin, un derivado hidrofóbico de Rifampin, ha demostrado ser efectivo en la profilaxis y tratamiento para las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas. Con la posible excepción en micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido, se cree que, el mayor determinante para la resistencia de antibióticos, es la presencia de una pared celular asociada a barreras permeables (7, 55–57). Existe evidencia de la presencia de

baja permeabilidad en células de *M. chelonae* a moléculas hidrofílicas como penicilina, glucosa, glicerol, glicina y leucina (7, 58–60). Aquellos antibióticos para los que el objetivo es la pared celular: Etambutol, son usualmente combinados con otros con diferente objetivo, Estreptomina, Ciprofloxacina o Rifampin (61–66).

Existen numerosos lineamientos publicados para la profilaxis y tratamiento para la infección de micobacterias no tuberculosas, especialmente dirigidas alrededor de *M. avium*. El avance más importante ha sido la introducción de nuevos macrólidos al tratamiento. Los macrólidos como la claritromicina, son la pieza fundamental en el tratamiento de casos con *M. avium complex*. Rifabutina (quinolona derivado de la Rifampicina S) y claritromicina han demostrado ser fármacos efectivos. El tratamiento estándar se basa en la asociación de tres fármacos: Claritromicina o Azitromicina, Rifabutina o R y E. En pacientes de bajo peso o adultos mayores se puede utilizar quinolonas: Rifabutina, Clofazimina, Amikacina y S. En pacientes VIH se deben modificar las dosis, y esto queda a criterio de un experto.

1.7 Resistencia

Los organismos pueden resistir la actividad de los medicamentos antimicrobianos, lo que provoca que los tratamientos convencionales se vuelvan ineficaces y las infecciones persistan, esto incrementa el riesgo de propagación (67).

Las bacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Se conocen dos tipos de resistencia. La resistencia natural o intrínseca que se da en

bacterias que carecen de sitios de reconocimiento para un antibiótico específico, y la resistencia adquirida; que se puede dar por mutación o por mecanismos de transferencia genética (68).

El uso incorrecto de los medicamentos antimicrobianos acelera ese fenómeno natural. Las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de la resistencia a los antimicrobianos (67).

En los casos en que se ha aplicado el tratamiento antituberculoso y este no tiene el efecto esperado, se solicita una PSD. Por esta prueba se puede evidenciar diferentes tipos de resistencias a los medicamentos antituberculosos de primera o segunda línea, y pueden ser diagnosticados como casos de multidrogo resistencia (MDR), poli resistencia o drogo resistencia extendida (XDR) (41).

La resistencia a los medicamentos antituberculosos puede estar ligada a diferentes factores, ya sea por abandono de tratamiento, por el metabolismo del paciente, como en caso de Diabetes o VIH, o por resistencia natural de la cepa.

1.7.1 Multidrogo Resistencia – MDR

Multidrogo Resistencia o MDR (Figura 8), es un término o clasificación utilizado para indicar la resistencia de una cepa de tuberculosis a por lo menos los principales medicamentos de primera línea. Estos son Isoniacida (H) y Rifampicina (R) (4, 41).

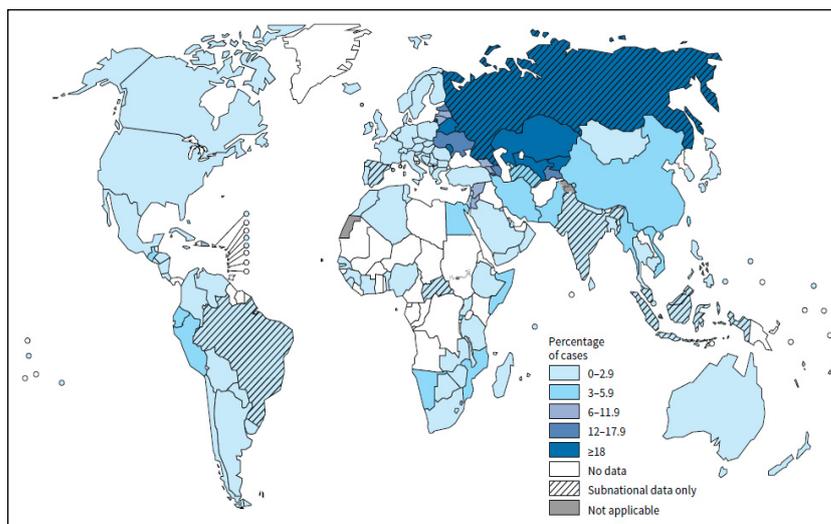


Figura 8. Porcentaje de casos nuevos MDR-TB (4).

A nivel mundial existen cifras muy altas de MDR. La proporción de casos nuevos detectados de MDR-TB para el 2013 fue de 3,5%; esto no ha cambiado con respecto a los últimos años; se estimó para este mismo año que 480 mil personas a nivel mundial tienen MDR-TB, estos datos involucran pacientes previamente tratados que corresponden al 20,5% del total de casos de TB (Figura 9) (4).

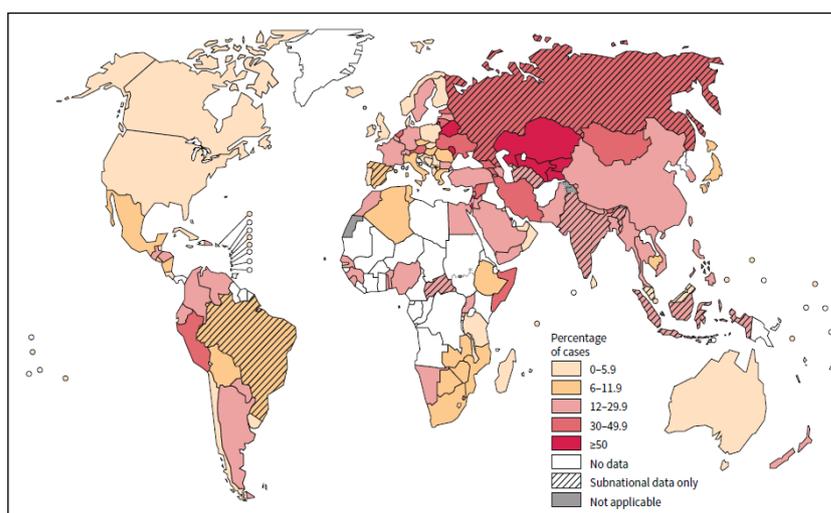


Figura 9. Porcentajes de MDR-TB tratados previamente (6).

1.7.2 Drogo Resistencia Extendida – XDR

Drogo Resistencia Extendida o XDR, es un término utilizado para referirse a los pacientes MDR que además han desarrollado resistencia a una quinolona y a uno o más inyectables de segunda línea: Kanamicina, Amikacina y Capreomicina (41).

Se estima que el 9,0% de los pacientes con MDR-TB han desarrollado TB con drogo resistencia extendida (XDR-TB) (4).

En 2013 se reportaron 3.232 casos de XDR-TB (Figura 10), correspondiente a 54 países. Estas cifras están cerca de duplicar los 1,852 casos reportados en 2012. Claramente se observa la necesidad de nuevas drogas y nuevos métodos para sobrellevar y controlar los casos XDR-TB.

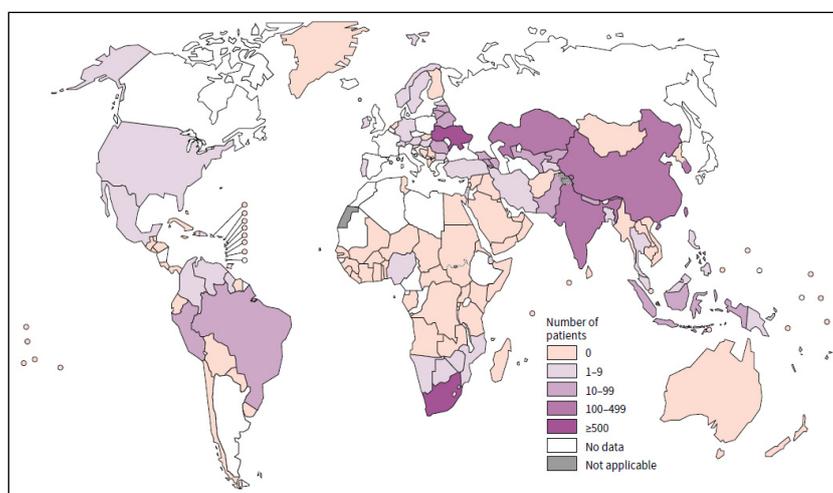


Figura 10. Pacientes con confirmación de laboratorio que empezaron el tratamiento XDR-TB (4).

1.8 Métodos de Identificación/Diagnóstico

A lo largo del tiempo se han desarrollado metodologías, técnicas, métodos y criterios para la identificación de las micobacterias.

Por muchos años, la identificación de micobacterias se encontraba ligada a los resultados fenotípicos y resultados de pruebas bioquímicos de especies aisladas en medios de cultivo (69, 70).

Los métodos convencionales utilizados para el diagnóstico de micobacterias toman mucho tiempo y en ocasiones pueden ser poco precisos.

Existen diferentes técnicas (31, 36, 37, 69) como cromatografía de capa delgada, cromatografía de gas líquido, cromatografía líquida de alta calidad e incluso secuenciación genética, amplificación de secuencias de ADN específicas, hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas (11, 19, 69, 71, 72), que son técnicas bastante adecuadas pero involucran una fuerte inversión para los laboratorios de referencia en técnicas que deben ser rutinarias.

Las técnicas más actuales como amplificación de una región específica se limitan a la identificación de una sola especie por prueba. Debido a ello, actualmente se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación del gen *hsp65* (8, 10, 73, 74); este gen es luego sometido a digestión por enzimas de restricción, que se refiere a la incisión de una secuencia reconocida (por la enzima) en un gen.

Otras metodologías basadas en la digestión simultánea de sitios de restricción dentro de este gen, involucran mayor tiempo en análisis de resultados debido a la

implementación de mayor número de enzimas de restricción comparadas con el método descrito para PRA hsp65 (69).

Una correcta identificación a nivel de especie es un paso crítico en el manejo, y tratamiento correcto del paciente. Estos resultados influyen en el tratamiento que se dará al paciente y en la evaluación de la necesidad de aislar al paciente.

1.8.1 Identificación Fenotípica

Es de suma importancia conocer cuál es el agente causal de la infección que presenta un paciente para tratarlo con los agentes terapéuticos apropiados, así como conocer los métodos en los cuales se basa la identificación microbiana (20, 70, 75, 76), pues no todos los microorganismos se identifican por las mismas técnicas.

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo.

La clasificación propuesta por Runyon en 1959 (Figura 11), está basada en características fenotípicas como la tasa de crecimiento o producción de pigmento en la oscuridad o por exposición a la luz (20, 24, 28, 70), esta clasificación se utiliza como complemento para la identificación de las micobacterias desde un nivel macroscópico.

Grupo I: Lento crecimiento –Fotocromógenas

Crecimiento abundante de los cultivos que producen pigmentos: cristales amarillos de

caroteno, por exposición a la luz, pero que no lo generan en la oscuridad. El desarrollo de las colonias se produce entre 2 a 6 semanas.

Grupo II: Lento crecimiento-Escotocromógenas

Los organismos desarrollan un pigmento amarillo brillante, en la luz y en la oscuridad. Algunas cepas de *M. scrofulaceum* intensifican su coloración por exposición a la luz. El desarrollo de las colonias se produce entre 2 a 6 semanas.

Grupo III: Lento crecimiento - No fotocromógenas

Incluye un número de especies que producen una pequeña cantidad de pigmento amarillo pálido. Expuestas a la luz brillante no intensifican su coloración. La mayoría presentan coloración crema. El crecimiento es sumamente lento.

Grupo IV: Rápido crecimiento

Mientras que un grupo de las especies producen pigmento amarillo, otras no lo poseen: *M. fortuitum* y *M. chelonae*. El desarrollo de las colonias se produce entre 2 a 7 días.

Figura 11. Clasificación de las Micobacterias Atípicas según Runyon (24, 28).

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS "ATÍPICAS" SEGÚN RUNYON	
GRUPO	DESCRIPCIÓN
I. Fotocromógenas	Crecimiento lento. Colonias no pigmentadas en la oscuridad, los cultivos jóvenes adquieren color amarillo al exponerlos a la luz.
II. Escotocromógenas	Crecimiento lento. Colonias pigmentadas, amarillentas o anaranjadas, aunque desarrollen en oscuridad.
III. No cromógenas	Crecimiento lento. Colonias no cromógenas generalmente. En algunos casos los cultivos viejos adquieren color amarillento.
IV. De crecimiento Rápido	Desarrollan colonias en los medios de cultivo en menos de una semana.

1.8.2 Métodos Bioquímicos de Identificación

Los métodos Bioquímicos y enzimáticos utilizados para la identificación de Micobacterias han sido implementados y adaptados por los laboratorios de referencia. Estos métodos se basan en una serie de reacciones presentes ante un estímulo, o procesos metabólicos interrumpidos que al ser comparados con su control positivo, indican la presencia o ausencia de una ruta metabólica; algunas técnicas involucran cambios de coloración, desarrollo o crecimiento en medios limitantes, e incluso

actividades enzimáticas degeneradas (39, 70, 77). Todos estos procedimientos son evaluados por el ojo técnico del laboratorista, y depende de su conocimiento y experiencia el interpretar correctamente lo observado.

La forma de proceder en el Laboratorio de Referencia del país para la identificación de Micobacterias, es en base a pruebas básicas y pruebas complementarias.

Pruebas básicas se denomina al conjunto de pruebas bioquímicas y enzimáticas utilizadas para la distinción de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) de las MNT. Se utilizan tres pruebas: Prueba de la Niacina, Prueba de la Catalasa a 68°C y Nitrato Reducción (39, 70, 77). Si una de estas pruebas no es compatible con MTB, se realizan las pruebas complementarias.

Las pruebas complementarias comprenden tres pruebas bioquímicas y enzimáticas, cuyos resultados, sumado a los resultados de las pruebas básicas, guiarán al técnico a la identificación de la Micobacteria No Tuberculosas que se encuentra infectando al paciente. Cabe mencionar que, para un diagnóstico más confiable se deben revisar las características fenotípicas que contempla Runyon.

Cuando el escenario es distinto, si la cepa de interés de antemano es considerada MNT, ya sea por su crecimiento, por la coloración de las colonias, o por los antecedentes del paciente facilitados por el laboratorio de procedencia, se parte con las técnicas fenotípicas a fin de obtener un mayor número de resultados para un diagnóstico más certero.

Las Pruebas Bioquímicas de Tipificación (20, 70, 75) utilizadas en el Laboratorio Nacional de Micobacterias son pruebas básicas (Anexo C y D), en otros laboratorios de investigación suelen utilizar más y diferente de pruebas.

1.9 Diagnóstico Molecular

En los últimos 20-30 años, con la necesidad creciente de identificar un gran número de especies, además de dar un temprano diagnóstico, se han desarrollado nuevos métodos rápidos y precisos para la identificación de especies de micobacterias (69).

Muchos de los equipos y técnicas descritas, se basan principal y únicamente en detectar la presencia del Bacilo de la Tuberculosis, dejando de lado, el gran número de Micobacterias Atípicas que en la actualidad forman parte de las estadísticas, y van en aumento.

Algunos casos reportados como tuberculosis no detectada indican ser negativos para tuberculosis, aunque estos resultados no contemplan la posibilidad de que el paciente se encuentre infectado con micobacterias atípicas. Debido a ello se ha observado un aumento en la tasa de casos nuevos de infección por Micobacterias atípicas, y las pocas medidas tomadas para controlarlo hacen que estas infecciones prevalezcan.

1.9.1 Enzimas de Restricción o Endonucleasas

Las endonucleasas (78) o enzimas de restricción, son enzimas de bacterias que degradan o cortan (hidrolizan) ADN en fragmentos definidos y reproducibles. Fueron descubiertas en 1969 en las bacterias (79), forman parte de los mecanismos de

defensa restricción-modificación contra DNA extraño, como en los bacteriófagos, evitando que se establezcan en la célula.

Existen dos tipos de endonucleasas (79):

- Tipo I: requieren varios cofactores, y carecen de una secuencia específica de corte.
- Tipo II: requieren Mg^{2+} como cofactor y son capaces de reconocer y cortar secuencias específicas. Son las herramientas básicas de clonación de genes.

1.9.2 Gen hsp65

Todos los organismos estudiados hasta la fecha responden a un aumento repentino de la temperatura (es decir, un choque térmico) mediante el aumento de la tasa de síntesis de un número limitado de proteínas altamente conservadas. Esta respuesta es llamada la respuesta de choque térmico, y las proteínas están denominadas proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein-HSP). Estas proteínas se dividen en familias basadas en el tamaño y la conservación de la secuencia (80).

La familia 60 kDa heat-shock protein compuesta por hsp 60 y hsp 65, debido a su ubicuidad y a su estructura primaria altamente conservada, han sido considerados como útiles marcadores filogenéticos para algunas eubacterias. (81). Se conoce que las bacterias tienen una copia única del gen hsp 60 o 65 en su genoma (82), significa que este gen no es transferido entre bacterias.

El gen *hsp65* (Figura 12) es un gen de copia única de 439 pb (10, 47, 81, 83, 84), el gen codifica para la proteína 65 kDa que se encuentra presente en todas las especies de micobacterias y contiene epitopos que son únicos y comunes para varias especies de micobacterias, tiene mayor variabilidad que el gen 16S ARNr, por ello es comúnmente utilizado para la identificación directa de especies de este género (12).

El método descrito en este estudio, amplifica un miembro de la familia hsp60, a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65). Entre las micobacterias, esta es una proteína bien conservada que lleva un número limitado de polimorfismos específicos de especie, y por lo tanto representa una diana particularmente útil para la identificación de especies (80).

1.9.3 Métodos de extracción

Aislar el DNA de las micobacterias resulta más difícil que en otros microorganismos, esto se debe a la gruesa membrana de peptidoglicano, característica propia de la pared celular de las micobacterias, lo que las hace resistentes a cierto número de buffers de lisis (85, 86).

Existen diferentes tipos de muestras en donde se puede encontrar micobacterias, entre ellas fluidos corporales, secreciones y excreciones como esputo, lavados alveolares y bronco-alveolares, aspirados: gástrico, laríngeo, abscesos y biopsias, leche, sangre, fluidos cerebrospinales (87, 88). Hosek (85) describe ampliamente la comparación entre las diferentes propuestas de métodos y mecanismos para la extracción de ADN a partir de aislados microbiológicos derivados de diferentes fluidos corporales, e incluso de la misma cepa, considerando su origen. Demostrando según los resultados de varios estudios, los más apropiados para cada tipo.

Existen diferentes mecanismos para extraer el material genético de una cepa de micobacterias aislada:

- Métodos Físicos: Basados en exposición del material aislado al calor. Las altas temperaturas rompen la membrana, lo que facilita el acceso al material genético. Este proceso puede ser reemplazado por el uso de perlas de vidrio en el proceso de sonicación (20 kHz).
- Métodos Químicos: Estos métodos se basan principalmente en el uso de reactivos que rompen membranas, precipitan proteínas, purifican y precipitan el ADN, reactivos para lavados y finalmente para diluir y almacenar el material genético.

El método de extracción utilizado en este estudio ha sido tomado del “Procedimiento de tipificación de *Mycobacterium tuberculosis* mediante RFLP” propuesto por el Instituto de Salud Pública de Chile (89), basado en el método de Araya (90, 91).

Para el proceso de extracción y purificación de ADN se utiliza un método que combina y simplifica métodos físicos y químicos en una asada de colonias resuspendidas e inactivadas en agua destilada estéril. La Proteinasa K (PK) y el Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) actúan sobre la pared celular. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) y el Hidroxido de Sodio (NaOH) precipitan proteínas. El ADN es purificado y extraído con cloroformo alcohol isoamílico 24:1. Finalmente el ADN es precipitado con Isopropanol frío. El pellet de ADN es lavado con etanol y disuelto en agua destilada.

1.9.4 Análisis de Patrones de Restricción (PRA)

El análisis de patrones de restricción se basa en la amplificación de un gen y su posterior restricción con endonucleasas. Los patrones de las bandas obtenidas son interpretados por la comparación de tablas publicadas y patrones disponibles en un sitio web basado en los descubrimientos de (8, 10, 47).

1.9.5 Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Una enzima de restricción no corta siempre en el mismo punto una molécula de ADN en dos individuos. Como consecuencia, se obtendrán fragmentos de diferente tamaño en dos individuos procesados. Los fragmentos desiguales viajarán a diferentes tasas en el gel y las bandas formadas. Seguidos de hibridación y radiografía, se localizarán en diferentes posiciones en la película. De esta manera se prueba el Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (79, 89, 92).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de realización

Las muestras fueron tomadas en diferentes centros de salud de siete provincias del país. Los procedimientos se realizaron en el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación de Guayaquil (INSPI Guayaquil) en el área de contención tres y el laboratorio de Biotecnología Molecular del Subproceso de Micobacterias.

2.2 Cepas

Se procesó 60 cepas de pacientes (Anexo E) con sospecha de Tuberculosis pulmonar (TBP) y extra pulmonar (TBEP), procedentes de siete provincias del país (Tabla VII) (0). Las cepas fueron tomadas de manera aleatoria del banco de cepas del INSPI Guayaquil. El 21,6% (13/60) de los pacientes son de sexo femenino, y el 78,4% (47/60) son de sexo masculino. Los pacientes se encuentran entre los 4 y 96 años de

edad. El 6,7% (4/60) de los pacientes son menores de edad, y el 15% (9/60) son pacientes adultos mayores.

Tabla VII. Procedencia de Muestras.

PROVINCIA	CANTIDAD DE CEPAS
EL ORO	23
ESMERALDAS	1
GUAYAS	29
LOS RIOS	1
SUCUMBIOS	1
MORONA SANTIAGO	4
AZUAY	1

Distribución de Cepas a Nivel Nacional

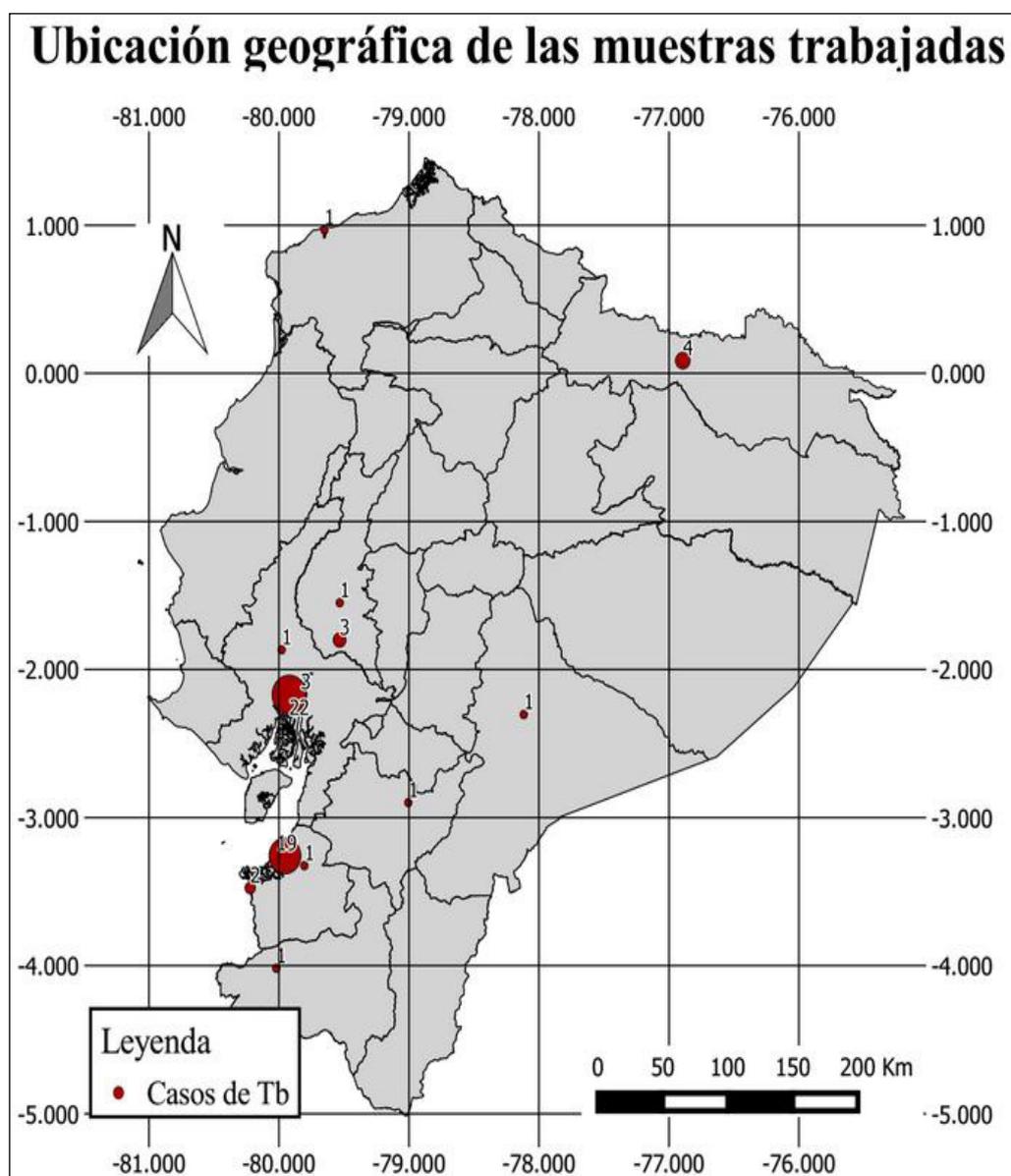


Figura 13. Origen de muestras con sospecha de Tuberculosis.

El 90% de las muestras son consideradas muestras pulmonares, el 10% restante corresponde a muestras extra pulmonares (Figura 14) (Tabla VIII).

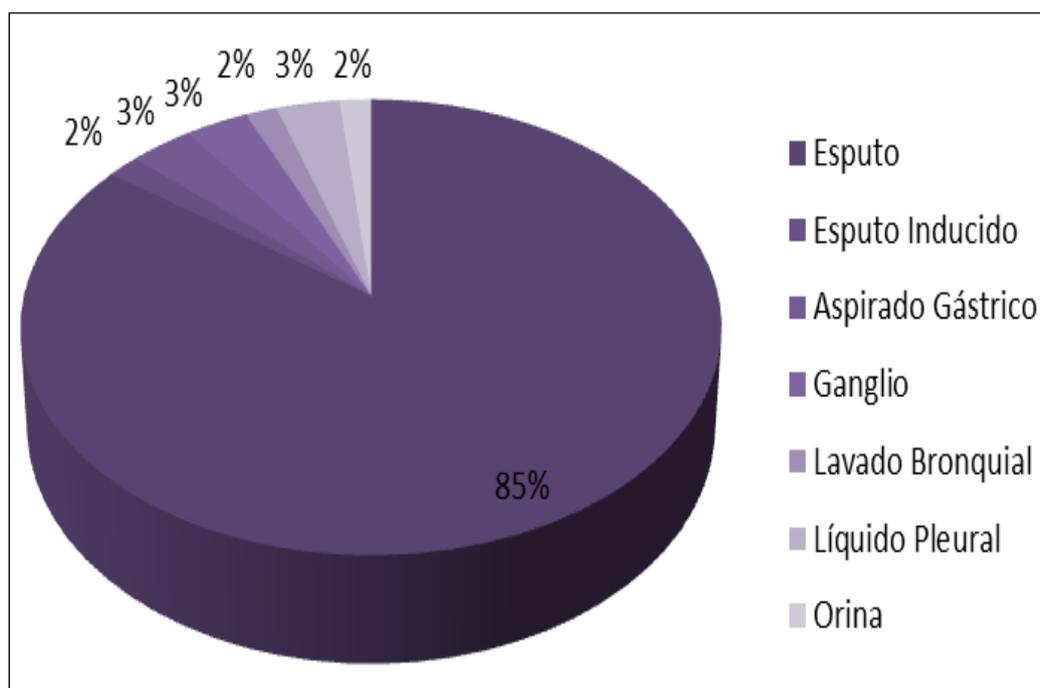


Figura 14. Tipo de muestra.

Tabla VIII. Tipo de origen de muestra.

MUESTRAS PULMONARES	ESPUTO	51
	ESPUTO INDUCIDO	1
	ASPIRADO GASTRICO	2
MUESTRAS EXTRA PULMONARES	GANGLIO	2
	LAVADO BRONQUIAL	1
	LIQUIDO PLEURAL	2
	ORINA	1

El cultivo fue realizado por el método del escobillón (39, 77) en medio Ogawa Kudoh, específico para micobacterias, usando Hidróxido de Sodio (SODA) al 4%, para descontaminación. En algunos de los casos, el cultivo se obtuvo por método de Petroff modificado (39, 77), que utiliza N-acetil cisteína como mucolítico, sembrando 0,2 ul de esta suspensión en dos medios Lowenstein Jensen.

La presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en los diferentes tipos de muestra fue determinada por baciloscopía por la técnica de fijación Ziehl-Neelsen.

2.3 Descripción de Cepas

Para un correcto diagnóstico, se evalúan principalmente los antecedentes del paciente y las características macroscópicas de la cepa. Una vez que estas observaciones indiquen la necesidad de la identificación de las micobacterias, se realiza el proceso de tipificación por pruebas bioquímicas.

2.4 Pruebas Bioquímicas de Tipificación

Las pruebas bioquímicas (Anexo C y D) se realizan en una cámara de flujo laminar clase II tipo A2, previamente esterilizada. En la cabina se coloca una base para trabajar de algodón embebido con desinfectante (Vesphene 1%) para micobacterias.

2.4.1 Producción de niacina (20, 75)

Materiales y Reactivos

- Tiras de papel reactivas comercial (BBLTM Taxo TM).

- Agua destilada estéril
- Pipetas estériles
- Tubos tapa rosca de vidrio de 125x16
- Control positivo: cepa de referencia H37Rv
- Control negativo: discos de control.

Técnica

1. Cortar la superficie del medio con una espátula para extraer la niacina.
2. Agregar 1,5 ml de agua destilada estéril a cada tubo.
3. Colocar los tubos en forma horizontal para que la superficie del mismo esté en contacto con el agua.
4. Incubar de 15 a 30 minutos a 37°C. Aflojar las tapas durante el período de incubación. Es muy importante la aireación para la formación de niacina.
5. Colocar el tubo en posición vertical durante 5 minutos para permitir que el fluido se ubique en el fondo del tubo.
6. Vaciar el contenido del mismo y colocar en un tubo limpio con tapa correctamente rotulado.
7. Ubicar la tira de prueba como indica el fabricante, cerrar inmediatamente el tubo.
8. Dejar a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos.
9. Ocasionalmente agitar. Observar el color del líquido en el fondo del tubo contra una base blanca, descartar si la tira tiene cambio de color, ello puede ocurrir por oxidación química especialmente en la parte superior de la tira.

10. Neutralizar las tiras con hidróxido de sodio al 10%.

Interpretación de resultados

Positivo: color amarillo

Negativo: no se observa cambio de coloración

2.4.2 Prueba de Nitrato Reducción (20, 70, 75)

Materiales y Reactivos

- Esta técnica se efectúa en cultivos de menos de un mes.
- Solución acuosa 0,01 M de nitrato de sodio (0,085%)
- Reactivo de Griess (Anexo F):
 - Solución A
 - Solución B

Conservar ambas soluciones en frascos ámbar, en refrigeración.

- Tubos tapa rosca de vidrio 125x16
- Agua destilada estéril
- Pipetas estériles
- Control positivo: Cepa de referencia H37Rv
- Control negativo: mezcla de reactivos sin colonias.

Técnica

1. Rotular los tubos con los códigos correspondientes.
2. Agregar 4 o 5 gotas de agua destilada estéril a cada tubo.

3. Agregar 1 o dos asadas de masa bacilar, a criterio del técnico, se homogeniza la mezcla.
4. Agregar 2 ml de la solución de Nitrato de Sodio.
5. Incubar por dos horas a 37°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Se agrega 0,2 ml de la solución A del reactivo de Griess.
7. Se agrega 0,2 ml de la solución B del reactivo de Griess.
8. Se agita suavemente. Se procede a la lectura.

Interpretación de los resultados

Reacción positiva: coloración roja

Reacción débil o dudosa: coloración rosada

Reacción negativa: no se observa reacción (solución transparente) o color rosa pálido

2.4.3 Inhibición de Catalasa a 68°C (20, 39, 75)

Materiales y Reactivos

- Tubos de tapa rosca de 125x16
- Pipetas
- Agua Oxigenada 110 volúmenes (Solución dde peróxido de hidrógeno al 30%). Debe ser conservada en refrigeración.
- Solución acuosa de Tween 80 al 10%. Conservar en refrigeración.
- Solución reguladora de fosfatos M/15, pH 7
- Control positivo: H37Rv
- Control Negativo: reactivos sin colonias

Técnica

1. Utilizar aislamientos jóvenes, de hasta tres semanas de desarrollo.
2. Agregar 0,5 ml de buffer fosfato pH 6,8 a cada tubo que debe estar correctamente rotulado, dos por cada cepa incluidos los controles. Uno a temperatura ambiente y otro a 68°C.
3. Transferir una asada abundante de cada cultivo a cada uno de los tubos (revisar el rótulo de cada tubo).
4. Los tubos rotulados a temperatura ambiente se quedan en la cabina de bioseguridad, mientras que los tubos rotulados a 68°C, se los lleva a baño maría por 20 minutos.
5. Se deja enfriar a temperatura ambiente los tubos incubados. Una vez fríos, se ubican en pares los tubos junto a sus correspondientes en T° ambiente.
6. Agregar a cada uno de los tubos 0,5 ml de una mezcla preparada en el momento con partes iguales de la solución acuosa de Tween 80 al 10% y agua oxigenada 100 volúmenes (30%). Ajustar bien las tapas.
7. Observar si se desprenden burbujas desde la masa bacilar. Evitar agitar o mover bruscamente los tubos, lo que puede generar confusión.
8. Observar nuevamente los tubos negativos luego de 20 minutos.
9. Registrar resultados.

Interpretación de los Resultados

Reacción positiva: formación de burbujas en la parte superior de la solución.

Reacción negativa: inhibición de la formación de burbujas.

2.4.4 Toma de Hierro (70)

Materiales y Reactivos

- Solución acuosa de citrato de hierro amoniacal al 4%, esterilizada en autoclave.
- Pipetas
- Control positivo: Cepa de control H37Rv con reactivo
- Control negativo: Cepa de control H37Rv con agua destilada estéril

Técnica

1. Rotular correctamente los tubos de control.
2. Registrar las cepas que se trabajan.
3. Colocar los tubos verticalmente y agregar 1 ml de solución evitando el contacto directo con la superficie del medio (se agrega por la pared interna del tubo), incluido el control positivo.
4. Agregar agua destilada estéril al tubo de control negativo.
5. Incubar a 37°C por tres semanas.
6. Observar resultados y registrarlos.

Interpretación de Resultados

Reacción positiva: entre la primera y tercera semana de incubación, se observa un color marrón que se extiende a las colonias por encima del nivel del líquido.

Reacción negativa: No se observa reacción.

2.4.5 Hidrólisis de Tween (70)

Materiales y Reactivos

- Caldo de cultivo Bacto Neutral Red
- Pipetas
- Control positivo: Medio inoculado con Cepa de control H37Rv
- Control negativo: Medio sin inóculo

Técnica

1. Agregar una asada de colonias en el medio de cultivo.
2. Incubar sin contacto con la luz a 37°C.
3. Revisar la prueba a los 5 y a los 10 días, de ser el caso.
4. Observar cada tubo a los cinco días comparando con el control positivo y registrar los resultados. Si el resultado es negativo, seguir incubando hasta los 10 días.
5. Los resultados se informan positivo a los cinco o diez días, y negativo a los diez días.

Interpretación de resultados

Reacción positiva: las colonias se observan color rosa salmón.

Reacción negativa: no se observa cambio de coloración.

2.4.6 Ureasa (70)

Materiales y Reactivos

- Medio de cultivo Christensen Difco
- Asa
- Control positivo: Medio inoculado con Cepa de control H37Rv
- Control negativo: Medio sin inóculo

Técnica

1. Agregar una asada de colonias en el medio de cultivo.
2. Incubar sin contacto con la luz a 37°C.
3. Revisar la prueba a las 72 horas.
4. Observar y registrar los resultados.

Interpretación de resultados

Reacción positiva: el medio se observa color fucsia, o rosa intenso, incluso rosa tenue puede ser interpretado como positivo dependiendo de la edad y calidad de la cepa inoculada.

Reacción negativa: no se observa cambio de coloración, o es de color naranja

2.5 Inactivación de cepas

Las cepas trabajadas fueron inactivadas en el laboratorio Nacional de Referencia para Tuberculosis (Subproceso de Micobacterias) en base a lo indicado en las

metodologías PRA (8) y RFLP propuestas por el Instituto de Salud Pública de Chile, a este proceso se le realizó una modificación.

Las cepas son inactivadas a 80°C por 30 min en 2 ml de agua destilada estéril, luego son llevadas a refrigeración por 48 horas y después pasan a la nevera a -20°C para almacenamiento hasta ser utilizadas.

2.6 Técnicas Moleculares

Las mezclas de reacción se realizan en una sala limpia dentro de una cabina de bioseguridad o cámara de flujo laminar clase II tipo A2, previamente esterilizada.

2.6.1 Extracción del ADN

El procedimiento se realiza en una cámara de flujo laminar clase II tipo A2, previamente esterilizada.

Aislamiento de ADN de Micobacterias por método RFLP (89)

1. Transferir 400 µl de las cepas inactivadas a un tubo estéril con tapa de 2.0 ml.
2. Agregar 50 µl de 10 mg/ml lisozima, mezclar manualmente e incubar por 1 hora o más a 37° C (se recomienda toda la noche).
3. Agregar 75 µl de SDS/Proteinasa K (5 µl PK 10mg/ml + 70µl SDS 10%) mezclar, agitar brevemente e incubar por 15 minutos a 65° C.
4. Agregar 100 µl de 5 M NaCl

5. Agregar 100 μ l de solución CTAB/NaCl; esta debe ser previamente incubada a 65° C por 5 minutos. Agitar hasta que en el tubo se observe un líquido blanco (como leche). Incubar por 10 minutos a 65° C.
6. Agregar 750 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar por 10 segundos, y centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm.
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante, fase acuosa (sin tocar la capa intermedia), a un nuevo tubo. Si se mueve el tubo o si el sobrenadante es turbio, hacer una nueva extracción desde el cloroformo/alcohol isoamílico. (Rotularlos con su número en tapa y en tubo ya que a veces se borra de la tapa).
8. Agregar 450 μ l de Isopropanol (2-propanol) mezclar muy suave, observar si aparece hebra de ADN en forma de ovillo y centrifugar por 15min a 12.000 rpm. Si no se observa hebra de ADN colocar en hielo por 15min antes de centrifugar.
9. Retirar cuidadosamente el sobrenadante. Invertir los tubos sobre papel absorbente y dejar por 24 horas.
10. Lavar con 1ml de etanol al 70% frío. Centrifugar por 5min a 12.000 rpm.
11. Decantar el sobrenadante y secar los tubos, invirtiéndolos sobre papel absorbente, hasta que estén secos.
12. Resuspender el pellet de ADN según lo estimado (20 μ l si no se ve nada, 40 μ l si se ve indicio de pellet y 80 μ l si se ve pellet u ovillo) en TE 1X.

13. Guardar los tubos en refrigerador a 4°C si se va a trabajar con ellos eventualmente.
14. Conservar en cadena de frío primero a -20°C por dos semanas y luego a -80°C.
15. Chequear en gel de agarosa al 1% a 100V por 40min. previamente calentados a 37° C por 1 hora.

Aislamiento de ADN de Micobacterias por método PRA (8)

1. Incubar por 10 minutos a 100 °C
2. Congelar por 10 minutos -70°C
3. Repetir los pasos anteriores 3 veces
4. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos
5. Dejar en hielo hasta su uso

2.6.2 Amplificación de ADN – PCR (8)

La metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la descrita por el Instituto de Salud Pública de Chile adaptada, basadas en la investigación de Telenti (10).

La mezcla de PCR utiliza dos primers, TB11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) y TB12 (5'CTTGTCGAACCGCATACCCT), que amplifican un segmento de 439 pb entre las posiciones 398 y 836 de la secuencia conocida (10, 19, 47, 93).

1. Para una mezcla de 10 reacciones se coloca en un tubo de 2 ml 50 µl de Buffer PCR sin Magnesio (Mg²⁺) en concentración 10 X, 20 µl de Cloruro de Magnesio

(MgCl) concentrado 50 mM, 10 µl de deoxinucleótidos (dNTP) en una concentración de 2 mM, 10 µl de primers TB 11 y TB 12 concentrados 20 pmoles cada uno, 57 µl de Betaina al 10%, 2 µl de Taq polimerasa, y 292 µl de agua, se obtiene una mezcla final de 450 µl (Anexo G).

2. Rotular correctamente 10 tubos para PCR (0,5 µl).
3. Se distribuyen 45 µl de la mezcla de PCR, y se agregan 5 µl de muestra a cada tubo.
4. Las mezclas de reacción son colocadas en un termociclador BioRad C1000, con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de tres pasos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y una la extensión final a 72°C (Anexo H).
5. Chequear 2µl del producto amplificado si se cuenta con suficiente material, en un gel de agarosa grado Biología Molecular tipo II al 2% preparado con 7 µl de Syber Safe gel stain, 4 µl de estándar de 100 bp DNA ladder en los extremos.

2.6.3 Digestión de las muestras con enzimas de restricción

La metodología de digestión con enzimas de restricción se basa en la descrita por el Instituto de Salud Pública de Chile adaptada, basadas en la investigación de Telenti (10, 47, 81, 84, 94, 95).

1. Digerir (Anexo I) 15 µl del producto de PCR con 1 µl (5U) de la enzima de restricción *BstEII* (Anexo J), 2,5 µl buffer específico para la enzima 10X ajustar

con agua a un volumen final de 25 μ l, incubar a la temperatura indicada por el fabricante durante 3 horas o toda la noche.

2. Digerir (Anexo I) 15 μ l del producto de PCR con 1 μ l (5U) enzima de restricción *HaeIII* (Anexo J), 2,5 μ l de buffer específico para la enzima ajustar con agua a un volumen final de 25 μ l, incubar a la temperatura indicada por el fabricante durante 3 horas o toda la noche.
3. Chequear la digestión en un gel de agarosa ultra pura o grado Biología Molecular al 4% con Sybr Safe gel stain, agregar estándar de peso molecular de 100 pb en los extremos del gel y 50 pb en el centro del gel. Los geles son corridos por 90 minutos a 80 volt. La agarosa se prepara cada vez que se va utilizar.
4. Los patrones de las bandas obtenidas son documentados y editados con el equipo de documentación de geles Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System de BIORAD.

2.6.4 Diagnóstico e Identificación de micobacterias

Los perfiles de cada muestra generados por los patrones de restricción, deben ser comparados con los algoritmos (Anexo K y L) (10, 47) diseñados para la identificación a nivel de especie. Los fragmentos de digestión son interpretados por la comparación de tablas publicadas y patrones disponibles en el sitio de Internet <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> (Figura 15).



Figura 15. Sitio de internet para identificación de Micobacterias.

El método de identificación se basa en registrar el número de bandas que han sido generados durante la digestión del producto de PCR, y el peso correcto de cada banda. Estos datos son ingresados a la página web, como se muestra a continuación: Seleccionar la opción PRA pattern del menú Query Forms (Figura 16).

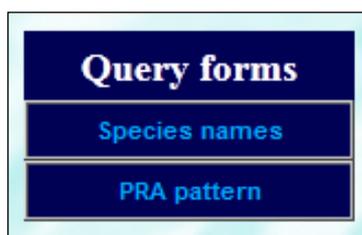


Figura 16. Menú para identificación de especies.

Se presenta la siguiente pantalla (Figura 17):

QUERY PRA DATABASE (Simplified Query Form)

Choose one of the patterns proposed in the list for each enzyme

BstEII fragments

HaeIII fragments

Submit

To enter your own values of the length of the digested fragments press "Form"

Form

PRASITE

Help

Method

Query forms

Species names

PRA patterns

Recent results

Submission and Contact

Copyright notice

Credits

Figura 17. Selección de sitios patrones de restricción de endonucleasas.

1. Seleccionar la pestaña desplegable de una de las enzimas de restricción, la cual muestra un listado con los posibles fragmentos de restricción (Figura 18). Repetir con la otra enzima (Figura 19).

QUERY PRA DATABASE (Simplified Query Form)

Choose one of the patterns proposed in the list for each enzyme

BstEII fragments

HaeIII fragments

Submit

To enter your own values of the length of the digested fragments press "Form"

Form

PRASITE

Help

Method

Query forms

Species names

PRA patterns

Recent results

Submission and Contact

Copyright notice

Credits

440 / 0 / 0

320 / 130 / 0

320 / 115 / 0

240 / 120 / 100

235 / 210 / 0

235 / 130 / 85

235 / 120 / 100

235 / 120 / 85

Subst 230 / 130 / 80

Figura 18. Menú desplegado para selección de patrones de restricción de enzima *BstEII*.

QUERY PRA DATABASE (Simplified Query Form)

Choose one of the patterns proposed in the list for each enzyme

BstEII fragments 235 / 130 / 85

HaeIII fragments

- 265 / 130 / 0
- 245 / 140 / 0
- 225 / 110 / 0
- Subj 215 / 110 / 0
- 200 / 90 / 60
- 200 / 70 / 60
- 200 / 60 / 55
- 195 / 90 / 60
- 195 / 70 / 60
- For 190 / 105 / 80
- 185 / 145 / 0
- 185 / 140 / 0
- 185 / 130 / 0
- 180 / 160 / 55
- 180 / 160 / 0
- 180 / 145 / 0
- 180 / 140 / 50
- 180 / 135 / 70
- 180 / 130 / 0

To enter your own values of the length of the digested fragments press "Form"

PRASITE

Help

Method

Query forms

Species names

PRA patterns

Recent results

Submission and Contact

Copyright notice

Credits

Figura 19. Menú desplegado para selección de patrones de restricción de enzima *HaeIII*.

2. Seleccionar la opción correspondiente a las bandas obtenidas en la digestión del gen (Figura 20).

QUERY PRA DATABASE (Simplified Query Form)

Choose one of the patterns proposed in the list for each enzyme

BstEII fragments 235 / 130 / 85

HaeIII fragments 150 / 130 / 70

Submit

To enter your own values of the length of the digested fragments press "Form"

Form

PRASITE

Help

Method

Query forms

Species names

PRA patterns

Recent results

Submission and Contact

Copyright notice

Credits

Figura 20. Forma simplificada de búsqueda.

3. Seleccionar la opción Submit (Figura 21). Aparecerá un listado de opciones acertadas y cercanas a los pesos de bandas seleccionados.



Figura 21. Botón de selección para probar la mezcla de fragmentos de restricción obtenidos.

4. En base a los antecedentes e historial de la cepa (y el paciente) se toma el resultado (Figura 22) más acertado para el caso.

Query	BstE II	Hae III
Your Query	235/130/85/150/130/70	

ID	Species	BstE II	Hae III	Score
163	Mycobacterium tuberculosis complex type 1	235/120/85	150/130/70	10
152	Mycobacterium smegmatis type 1	235/130/85	145/125/60	12
58	Mycobacterium goodii type 1	235/130/85	145/125/60	12
177	Mycobacterium fragae type 1	235/130/85	145/125/80	12
100	Mycobacterium mageritense type 1	235/130/85	145/125/60	12
140	Mycobacterium senegalense type 2	235/130/85	140/125/60	15
169	Mycobacterium wolinski type 1	235/130/85	140/125/60	15
113	Mycobacterium neworleanense type 1	235/120/85	140/125/60	18
75	Mycobacterium houstonense type 1	235/120/85	140/125/60	18
51	Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum type 1	235/120/85	145/120/60	18

Figura 22. Lista de especies con perfiles cercanos a los propuestos.

2.6.5 Análisis de Resultados

Datos relevantes a este estudio son el tiempo y tipo de tratamiento antituberculoso, como si el paciente se encuentra tomando el tratamiento por primera vez, de no ser el caso, es necesario conocer si abandonó el tratamiento o si recayó luego de haber sido

diagnosticado como curado. Se debe conocer también si tiene un contacto, y de ser posible, identificarlo.

Para fortalecer este diagnóstico, se revisaron los antecedentes de los pacientes, destacándose la co-infección con VIH y la sensibilidad a drogas antituberculosas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Identificación de TB y Micobacterias No Tuberculosas

3.1.1 Identificación por Métodos Bioquímicos de Tipificación

Las diferentes micobacterias fueron diagnosticadas por métodos Bioquímicos de tipificación: Niacina, Inhibición de Catalasa a 68°C y Nitrato Reducción, como pruebas complementarias: Toma de Hierro, Prueba de la Ureasa, Hidrólisis de Tween. Adicionalmente se pueden realizar dos técnicas fenotípicas: fotocromogenicidad y pigmentación en la oscuridad.

El 25% (15) de las cepas fueron diagnosticados mediante pruebas bioquímicas de tipificación convencionales como Micobacterias No Tuberculosas y 75% (45) fueron diagnosticados como *Mycobacterium tuberculosis* (0y Figura 24).

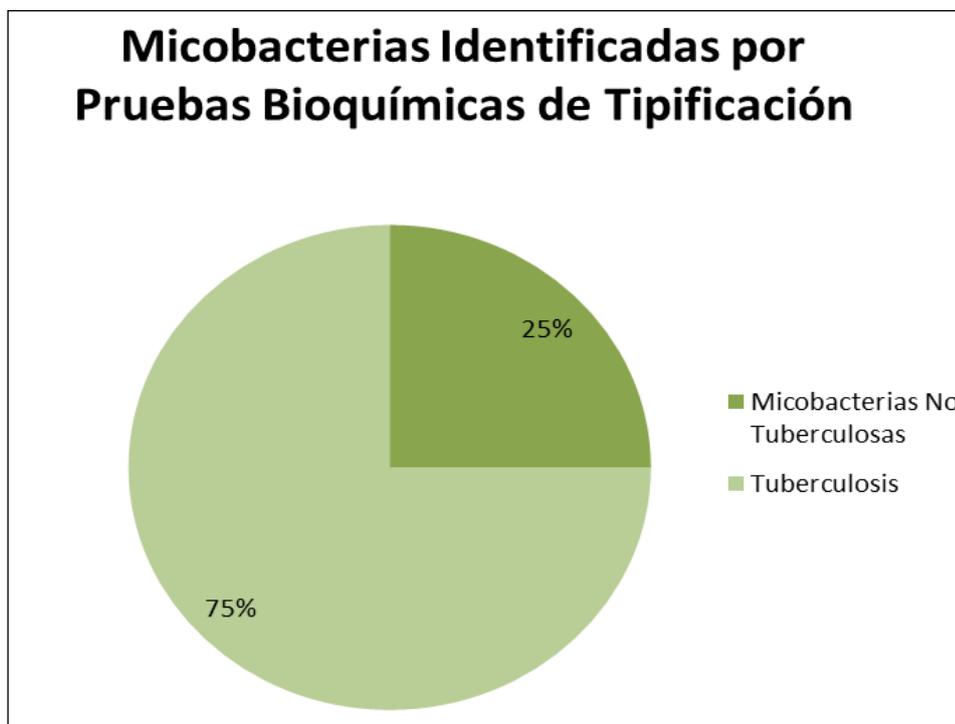


Figura 23. Porcentaje de micobacterias identificadas.

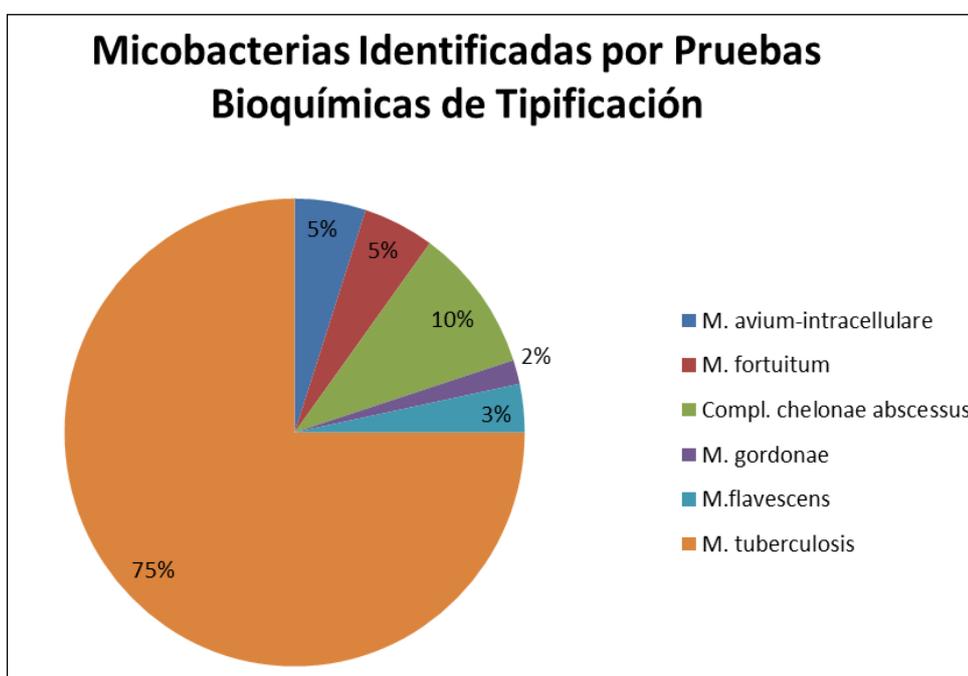


Figura 24. Micobacterias identificadas por PBT.

Se logró identificar 6 diferentes especies, cinco de ellas son organismos del grupo de Micobacterias No Tuberculosas: Complejo *chelonae abscessus*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* y Complejo *Mycobacterium Avium Intracellulare*, y la principal bacteria del Complejo Tuberculosos *M. tuberculosis* (Figura 25).

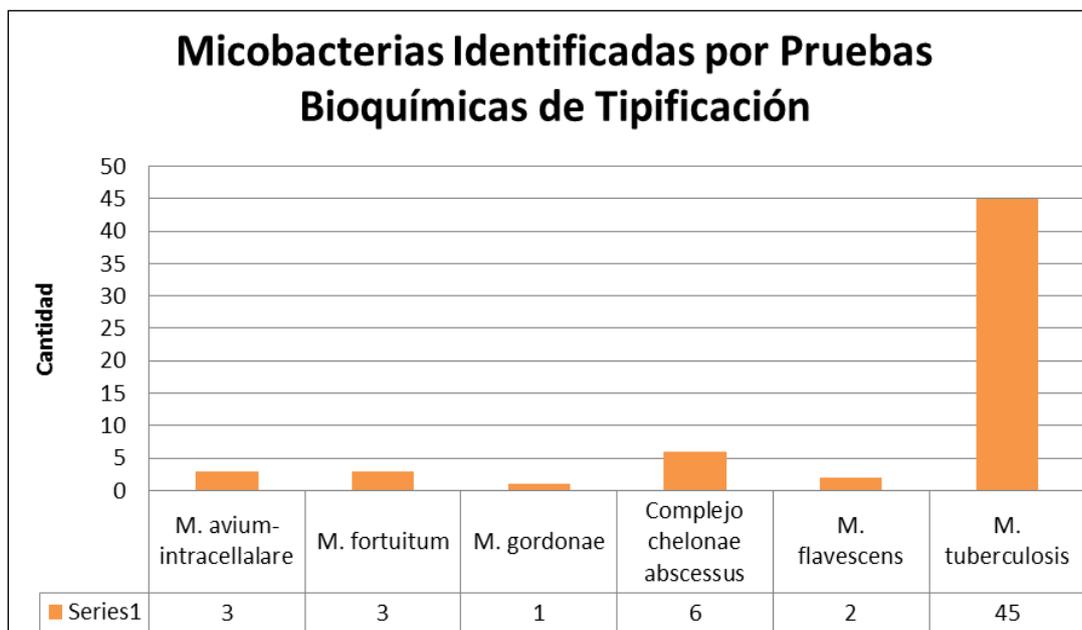


Figura 25. Micobacterias Identificadas por Pruebas Bioquímicas de Tipificación.

Por el Método de PBT se identificaron 15 (25%) especies de Micobacterias No Tuberculosas (Tabla IX), 2 de ellas son Micobacterias de Crecimiento Lento: MAI, que fue aislada de 3 pacientes, y *Mycobacterium gordonae*, aislada de un paciente. Se identificaron también 3 Micobacterias de Crecimiento Rápido: *Mycobacterium fortuitum*, aislada de 3 pacientes, *Mycobacterium flavescens*, presente en 2 pacientes, y el Complejo *chelonae abscessus*, aislada de 6 pacientes.

Mycobacterium tuberculosis fue identificado por PBT en 45 (75%) de las muestras (Tabla X). Para la confirmación de cada caso también se revisaron los antecedentes de los pacientes.

Tabla IX. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Tipificación en Micobacterias No Tuberculosas.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	Crecimiento	Niacina	Nitrato Reducción	Catalasa		Toma de Hierro	Hidrólisis de Tween	Ureasa	IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE TIPIFICACIÓN
				68°C	20°C				
3	L	-	-	+	+	-	-	-	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
8	R	-	+	+	+	+	+	+	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
9	R	-	+	+	+	+	+	+	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
10	R	+	-	+	+	-	-	+	<i>Complejo chelonae abscessus</i>
11	L	-	-	+	+	-	+	-	<i>Mycobacterium gordonae</i>
12	L	-	-	+	+	-	-	-	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
17	R	+	-	+	+	-	-	+	<i>Complejo chelonae abscessus</i>
18	R	-	+	+	+	+	+	+	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
19	R	+	-	+	+	-	-	+	<i>Complejo chelonae abscessus</i>
24	R	+	-	+	+	-	-	+	<i>Complejo chelonae abscessus</i>
39	R	+	-	+	+	-	-	+	<i>Complejo chelonae abscessus</i>
40	L	-	+	+	+	-	+	+	<i>Mycobacterium flavescens</i>
41	L	-	+	+	+	-	+	+	<i>Mycobacterium flavescens</i>
43	R	+	-	+	+	-	-	+	<i>Complejo chelonae abscessus</i>
54	L	-	-	+	+	-	-	-	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>

Tabla X. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Tipificación.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	Crecimiento	Niacina	Nitrato Reducción	Catalasa		Toma de Hierro	Hidrólisis de Tween	Ureasa	IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE TIPIFICACIÓN
				68°C	20°C				
1	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
2	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
4	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
6	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
7	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
13	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
14	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
15	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
16	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
20	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
21	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
22	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
23	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
25	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
26	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
27	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
28	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
29	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
30	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
31	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
32	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

33	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
34	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
35	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
36	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
37	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
38	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
42	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
44	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
45	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
46	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
47	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
48	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
49	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
50	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
51	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
52	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
53	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
55	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
56	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
57	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
58	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
59	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
60	L	+	+	-	+	-	+	+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

3.2 Análisis de Métodos de Extracción

Se extrajo el material genético de las muestras en base a método de extracción descrito en PRA (Figura 26) y RFLP (Figura 27).

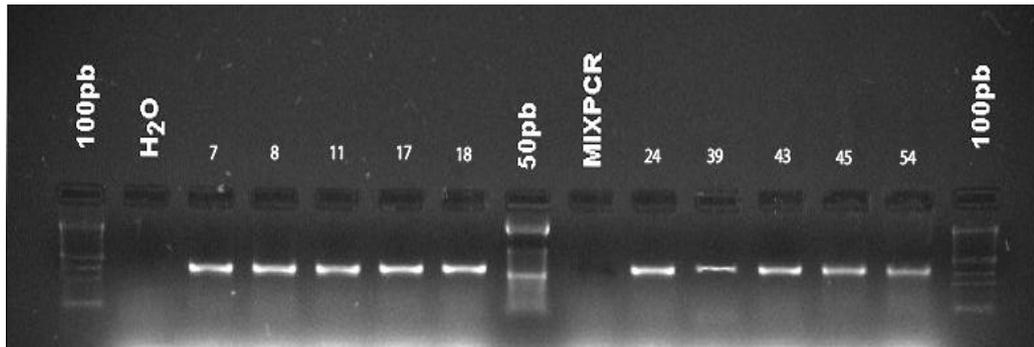


Figura 26. Extracción por método PRA.

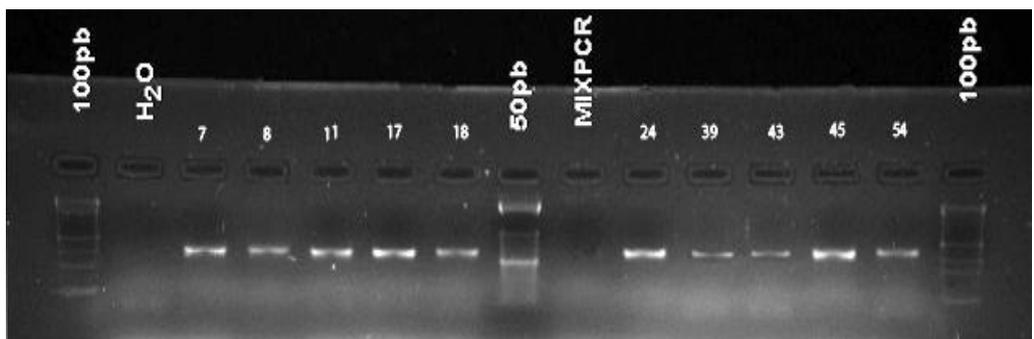


Figura 27. Extracción por método RFLP.

3.3 Identificación por Análisis de Patrones de Restricción (PRA)

Se analizaron los geles para conocer el peso en pares de base de cada banda formada por la restricción del gen hsp65 con endonucleasas del tipo II (Figura 28Figura 29). Los resultados de las bandas observadas (Tabla XI) fueron comparados con los patrones mostrados en el sitio web <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> para identificar las muestras a nivel de especie.

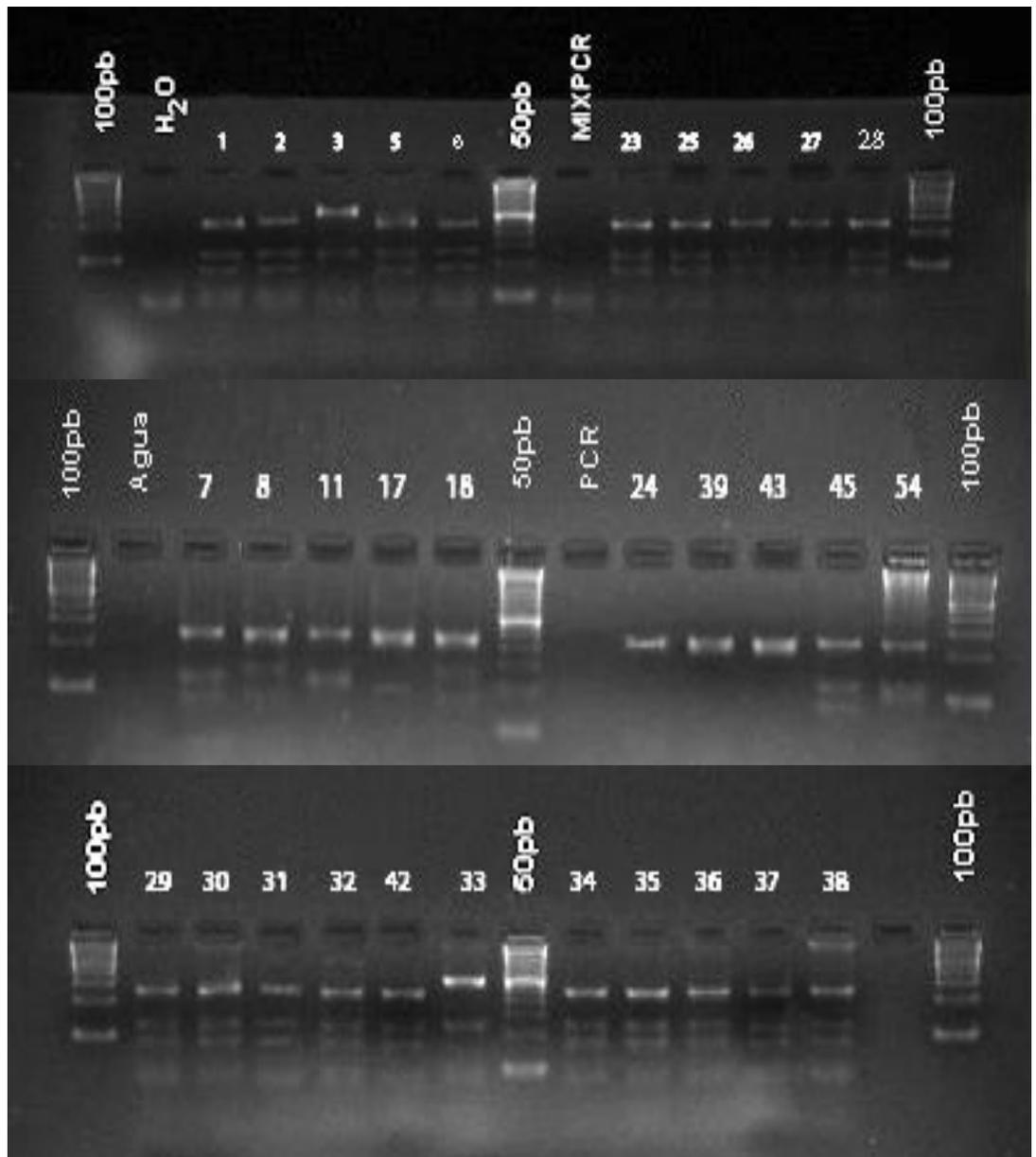


Figura 28. Producto de PCR digerido con enzima *BstEII*.

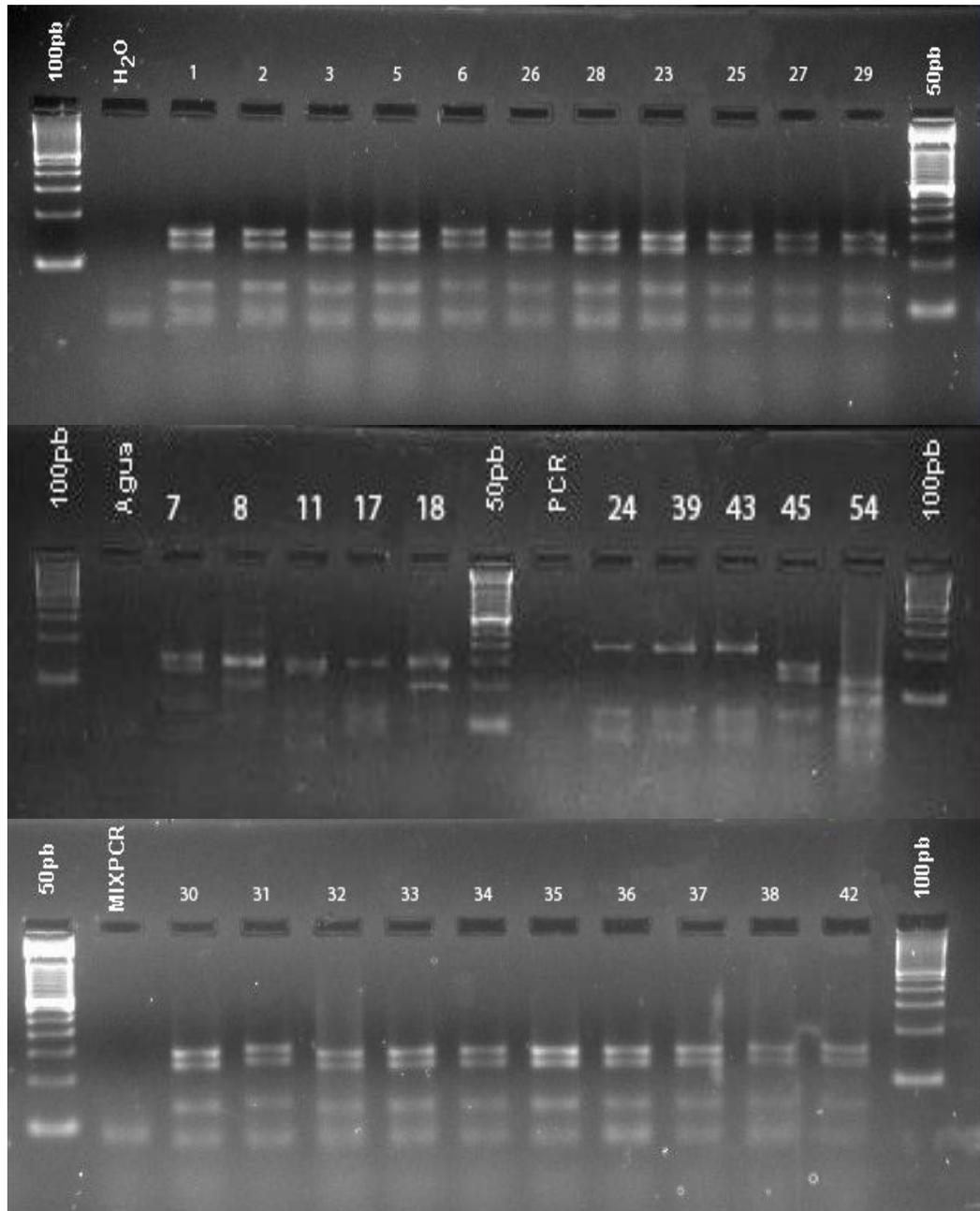


Figura 29. Patrones de restricción con enzima *HaellI*.

Tabla XI. Patrones de Restricción observados en el gel comparados con los mostrados en PRASITE.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	RESULTADOS DE GELES		RESULTADO PRASITE	
	<i>Bst</i> EII	<i>Hae</i> III	<i>Bst</i> EII	<i>Hae</i> III
1	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
2	225/120/80	160/130/70	235/120/85	150/130/70
3	240/200/0	145/110/0	235/210/0	130/105/0
4	250/140/100	150/130/70	235/120/85	150/130/70
5	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
6	250/135/80	160/130/70	235/120/85	150/130/70
7	250/135/85	150/110/60	235/120/85	150/130/70
8	245/130/85	145/110/50	235/120/85	145/120/60/55
9	245/135/85	150/110/55	235/120/85	145/120/60/55
10	300/110/0	200/70/60/50	320/130/0	200/60/55/50
11	240/130/110	140/130/50	235/120/100	145/130/60
12	245/125/100	150/125/60	235/120/100	145/130/60
13	250/130/80	145/130/80	235/120/85	150/130/70
14	250/130/80	150/130/90	235/120/85	150/130/70
15	250/130/80	150/135/70	235/120/85	150/130/70
16	250/130/80	150/130/90	235/120/85	150/130/70
17	300/120/0	200/70/65/50	320/130/0	200/60/55/50
18	230/135/95	155/95/55	235/120/85	145/120/60/55
19	300/120/0	200/70/60/50	320/130/0	200/60/55/50
20	310/120/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
21	230/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
22	230/145/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
23	230/135/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
24	235/210	205/90/60	235/210	200/70/60/50
25	260/140/90	160/130/80	235/120/85	150/130/70
26	270/140/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
27	230/120/80	160/135/80	235/120/85	150/130/70
28	230/120/80	160/135/80	235/120/85	150/130/70
29	240/120/90	170/150/80	235/120/85	150/130/70
30	240/120/90	140/100/75	235/130/85	130/95/70
31	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
32	230/120/80	160/135/80	235/120/85	150/130/70
33	320/115/0	150/130/70	-----	-----

34	230/120/80	160/135/80	235/120/85	150/130/70
35	230/120/80	160/135/80	235/120/85	150/130/70
36	230/120/80	160/135/80	235/120/85	150/130/70
37	230/120/80	160/135/80	235/120/85	150/130/70
38	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
39	235/210	205/90/60	235/210	200/70/60/50
40	420/0/35	135/60/50	440/0/0	140/55/50/0
41	420/0/35	135/60/50	440/0/0	140/55/50/0
42	230/135/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
43	235/210	205/90/60	235/210	200/70/60/50
44	230/135/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
45	230/135/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
46	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
47	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
48	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
49	245/130/85	160/130/80	235/120/85	150/130/70
50	250/130/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
51	250/130/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
52	250/130/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
53	250/130/80	160/120/80	235/120/85	150/130/70
54	230/120	140/90/50	235/120/100	130/100/60/55
55	250/130/80	160/120/80	235/120/85	150/130/70
56	250/130/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
57	250/130/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
58	250/130/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
59	250/130/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70
60	230/135/80	160/130/80	235/120/85	150/130/70

Se identificaron 7 tipos de Micobacterias No Tuberculosas (Figura 30 y Figura 31), que corresponden al 26% de las cepas muestreadas. El 73% restante corresponde a *Mycobacterium tuberculosis tipo 1* (Figura 32). No se logró identificar una muestra (2%).

Micobacterias No Tuberculosas Identificadas por Análisis de Patrones de Restricción

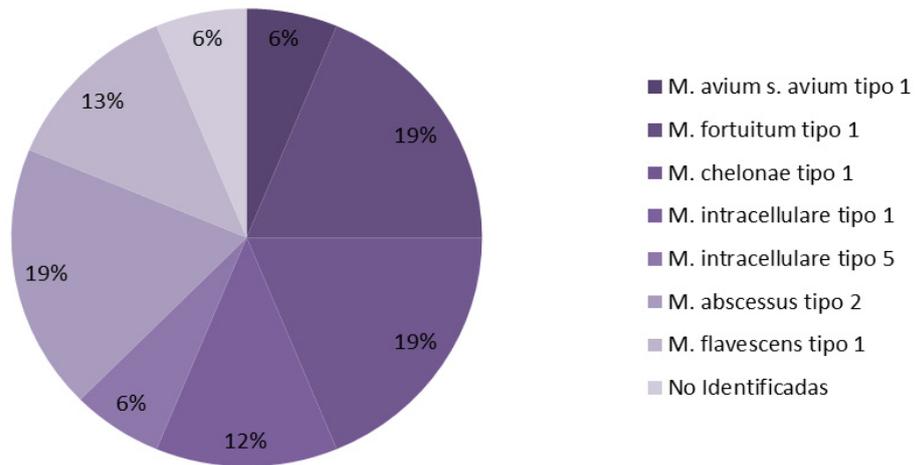


Figura 30. Micobacteria No Tuberculosas Identificadas por PRA.

Micobacterias Identificadas por Análisis de Patrones de Restricción

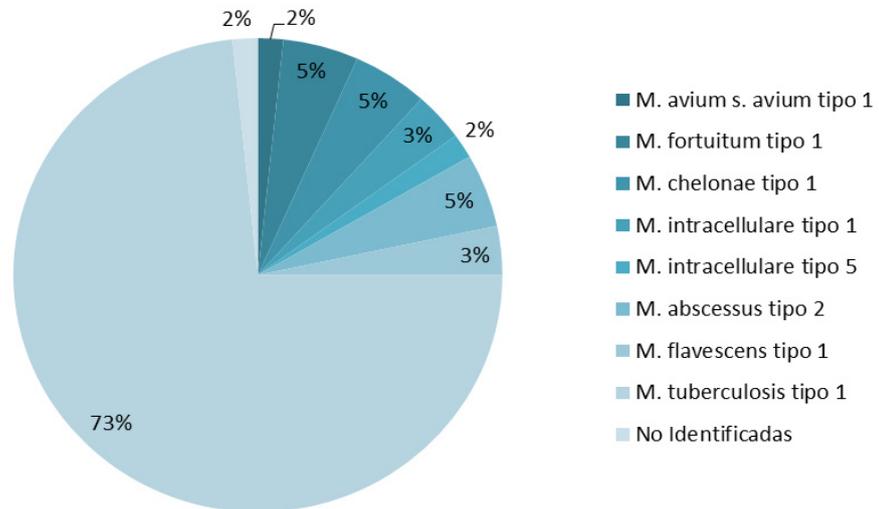


Figura 31. Micobacterias identificadas por PRA.

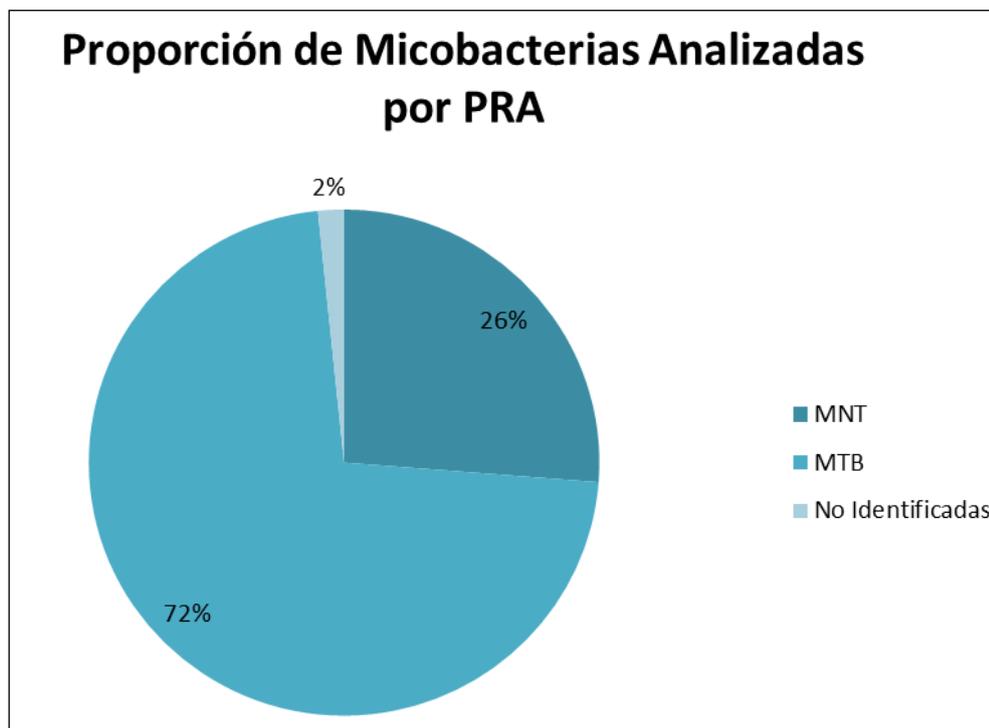


Figura 32. Proporción de Micobacterias Identificadas mediante PRA.

Tabla XII. Resultados obtenidos en base a la lectura de los fragmentos de restricción.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	RESULTADO PRASITE		IDENTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE PATRONES DE RESTRICCIÓN
	<i>Bst</i> EII	<i>Hae</i> III	
1	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
2	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
3	235/210/0	130/105/0	<i>Mycobacterium avium s. avium</i> tipo 1
4	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
5	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
6	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
7	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
8	235/120/85	145/120/60/55	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
9	235/120/85	145/120/60/55	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
10	320/130/0	200/60/55/50	<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1
11	235/120/100	145/130/60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1
12	235/120/100	145/130/60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 1
13	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
14	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
15	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
16	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
17	320/130/0	200/60/55/50	<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1
18	235/120/85	145/120/60/55	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tipo 1
19	320/130/0	200/60/55/50	<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1
20	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
21	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
22	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
23	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
24	235/210	200/70/60/50	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 2
25	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
26	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
27	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
28	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
29	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
30	235/130/85	130/95/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
31	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
32	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
33	-----	-----	No Identificada

34	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
35	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
36	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
37	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
38	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
39	235/210	200/70/60/50	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 2
40	440/0/0	140/55/50/0	<i>Mycobacterium flavescens</i> tipo 1
41	440/0/0	140/55/50/0	<i>Mycobacterium flavescens</i> tipo 1
42	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
43	235/210	200/70/60/50	<i>Mycobacterium abscessus</i> tipo 2
44	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
45	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
46	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
47	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
48	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
49	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
50	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
51	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
52	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
53	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
54	235/120/100	130/100/60/55	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo 5
55	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
56	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
57	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
58	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
59	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1
60	235/120/85	150/130/70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> tipo 1

Tabla XIII. Cuantificación de Micobacterias Identificadas por Pruebas Moleculares.

MICOBACTERIA NO TUBERCULOSA	CANTIDAD
<i>Mycobacterium avium s. avium tipo 1</i>	1
<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>	3
<i>Mycobacterium chelonae tipo 1</i>	3
<i>Mycobacterium intracellulare tipo 1</i>	2
<i>Mycobacterium intracellulare tipo 5</i>	1
<i>Mycobacterium abscessus tipo 2</i>	3
<i>Mycobacterium flavescens tipo 1</i>	2
<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>	44
<i>No Identificada</i>	1

3.4 Comparación de Resultados

Los resultados obtenidos por cada prueba fueron comparados entre ellos (Tabla XIV, Tabla XV Tabla XVI), a fin de encontrar discordancias.

Tabla XIV. Comparación de resultados de identificación de Micobacterias No Tuberculosas obtenidos por Pruebas Bioquímicas de Tipificación y Análisis de Patrones de Restricción.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE TIPIFICACIÓN	IDENTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE PATRONES DE RESTRICCIÓN
3	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	<i>Mycobacterium avium s. avium tipo 1</i>
8	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>
9	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>
10	<i>Complejo chelonae abscessus</i>	<i>Mycobacterium chelonae tipo 1</i>
11	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium intracellulare tipo 1</i>
12	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare tipo 1</i>
17	<i>Complejo chelonae abscessus</i>	<i>Mycobacterium chelonae tipo 1</i>
18	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>
19	<i>Complejo chelonae abscessus</i>	<i>Mycobacterium chelonae tipo 1</i>
24	<i>Complejo chelonae abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus tipo 2</i>
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium gordonae tipo 8</i>
39	<i>Complejo chelonae abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus tipo 2</i>
40	<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium flavescens tipo 1</i>
41	<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium flavescens tipo 1</i>
43	<i>Complejo chelonae abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus tipo 2</i>
54	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare tipo 5</i>

Tabla XV. Comparación de resultados de identificación de Micobacterias Tuberculosas obtenidos por Pruebas Bioquímicas de Tipificación y Análisis de Patrones de Restricción.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE TIPIFICACIÓN	IDENTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE PATRONES DE RESTRICCIÓN
1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
13	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
14	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
15	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
16	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
20	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
21	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
22	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
23	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
26	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
27	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
28	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
30	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
31	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
32	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	No Identificada
34	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
35	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
36	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
37	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
38	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>

42	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
44	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
45	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
46	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
47	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
48	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
49	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
50	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
51	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
52	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
53	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
55	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
56	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
57	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
58	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
59	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>
60	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis tipo 1</i>

Tabla XVI. Discordancias encontradas en los resultados.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE TIPIFICACIÓN	IDENTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE PATRONES DE RESTRICCIÓN
11	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium intracellulare tipo 1</i>
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	No identificada

3.5 Características de las Cepas Identificadas

El 73% de las muestras se identificó como *Mycobacterium tuberculosis* tipo 1 (Figura 33) por prueba Análisis de Patrones de Restricción (PRA).

ID	163
Organism	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex type 1
BstEII pattern	235 / 120 / 85
HaeIII pattern	150 / 130 / 70 / 0
ORIGIN	ATCC 27294
65 hsp sequence	AY299144
Phenotype	slowly growing non-pigmented

Figura 33. Características de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* tipo 1.

Las muestras 24, 39 y 43 fueron identificadas como *Mycobacterium abscessus* tipo 2 (Figura 34) por Análisis de Patrones de Restricción (PRA).

ID	2
Organism	<i>Mycobacterium abscessus</i> type 2
BstEII pattern	235 / 210 / 0
HaeIII pattern	200 / 70 / 60 / 50
ORIGIN	ATCC 14472
65 hsp sequence	DQ869273 AJ310216 AY603554 AF0
Phenotype	rapidly growing non-pigmented

Figura 34. Características de la cepa *Mycobacterium abscessus* tipo 2.

La muestra 3 fue identificada como *Mycobacterium avium s. avium tipo 1* (Figura 35) por prueba de Análisis de Patrones de Restricción (PRA).

ID	13
Organism	<i>Mycobacterium avium s. avium type 1</i>
BstEII pattern	235 / 210 / 0
HaeIII pattern	130 / 105 / 0 / 0
ORIGIN	ATCC 25291
65 hsp sequence	DQ284768 AF126030
Phenotype	slowly growing non-pigmented

Figura 35. Características de la cepa *Mycobacterium avium s. avium tipo 1*.

Las muestras 10, 17 y 19 fueron identificadas como *Mycobacterium chelonae tipo 1* (Figura 36) por prueba de Análisis de Patrones de Restricción (PRA).

ID	28
Organism	<i>Mycobacterium chelonae type 1</i>
BstEII pattern	320 / 130 / 0
HaeIII pattern	200 / 60 / 55 / 50
ORIGIN	ATCC 35749 CIP 104535 ATCC 357
65 hsp sequence	AY299148 AF547818 AY498742 AY4
Phenotype	rapidly growing non-pigmented

Figura 36. Características de la cepa *Mycobacterium chelonae tipo 1*.

Las muestras 40 y 41 se identificaron como *Mycobacterium flavescens tipo 1* (Figura 37) por prueba de Análisis de Patrones de Restricción (PRA).

ID	45
Organism	<i>Mycobacterium flavescens</i> type 1
BstEII pattern	440 / 0 / 0
HaeIII pattern	140 / 55 / 50 / 0
ORIGIN	CIP 104533
65 hsp sequence	AF547831
Phenotype	rapidly growing scotochromogen

Figura 37. Características de la cepa *Mycobacterium flavescens* tipo 1.

Las muestras 8, 9 y 18 fueron identificadas como *Mycobacterium fortuitum* tipo 1 (Figura 38) por Análisis de Patrones de Restricción (PRA).

ID	48
Organism	<i>Mycobacterium fortuitum</i> type 1
BstEII pattern	235 / 120 / 85
HaeIII pattern	145 / 120 / 60 / 55
ORIGIN	ATCC 6841 CIP 104534
65 hsp sequence	AY299152 AF547833 AY458072
Phenotype	rapidly growing non-pigmented

Figura 38. Características de la cepa *Mycobacterium fortuitum* tipo 1.

Las muestras 11 y 12 se identificaron como *Mycobacterium intracellulare* tipo 1 (Figura 39) por Análisis de Oatrones de Restricción (PRA).

ID	81
Organism	Mycobacterium intracellulare type 1
BstEII pattern	235 / 120 / 100
HaeIII pattern	145 / 130 / 60 / 0
ORIGIN	ATCC 13950 CIP 104243
65 hsp sequence	AF126035 DQ284774 AY299188 AF5
Phenotype	slowly growing non-pigmented

Figura 39. Características de la cepa *Mycobacterium intracellulare* tipo 1.

La muestra 54 fue identificada como *Mycobacterium intracellulare* tipo 5 (Figura 40) por Análisis de Oatrones de Restricción (PRA).

ID	178
Organism	Mycobacterium intracellulare type 5
BstEII pattern	235 / 120 / 100
HaeIII pattern	130 / 100 / 60 / 55
ORIGIN	Human specimen
65 hsp sequence	KF030699
Phenotype	slow growing non chromogenic (Jesus Pais Ramos doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.028)

Figura 40. Características de la cepa *Mycobacterium intracellulare* tipo 5.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Usualmente se emplean técnicas bioquímicas para la tipificación de micobacterias, pero existen diversos factores que pueden alterar la confianza sobre estos resultados, como la calidad y edad de la cepa, la integridad de los medios y los reactivos; además, el tiempo requerido para la ejecución de la totalidad de las pruebas implica varias semanas, sumando a ello el tiempo que se toma la cepa en dar una cantidad de colonias útiles para la práctica de dichas pruebas (11). Las técnicas moleculares son una alternativa frente a estos problemas. Se han descrito diferentes técnicas moleculares para la identificación de micobacterias en laboratorios de diagnóstico. La exactitud en sus resultados es altamente significativa en comparación con los métodos convencionales, además el tiempo que implican en dar los resultados es relativamente menor (11), así como la cantidad de material necesario para estas técnicas.

El método de Análisis de Patrones de Restricción es una herramienta útil para la identificación de micobacterias a nivel de especie, ya que utiliza la información genética única de cada organismo, y no características bioquímicas o microbiológicas que se pueden ver afectadas o interferidas por factores externos (11); además, el tiempo en que genera resultados es una notable ventaja, debido a que de las tres a cuatro semanas que se toman las pruebas bioquímicas, esta técnica da resultados en tres días. A diferencia de otras técnicas, no necesita equipos sofisticados como en la secuenciación de genes, por lo que la técnica de PRA puede considerarse más accesible. Posee alta sensibilidad para identificación de micobacterias de crecimiento rápido sobre la identificación de bacterias del CMTB, debido a que no logra discriminar entre ellas.

Partiendo de estos antecedentes, se observó que con las pruebas bioquímicas de tipificación se logró identificar 4 organismos a nivel de especie, y 2 complejos. Con el método de análisis de patrones de restricción se logró identificar 7 organismos a nivel de especie y un complejo. El nivel de sensibilidad obtenido con el PRA fue superior al conseguido con las pruebas PBT, estos resultados son parecidos a otros reportados en estudios similares, en donde se observa la concordancia de los resultados entre pruebas moleculares y bioquímicas (11, 71, 96).

Los resultados de las PBT no son de alta confiabilidad, ya que existen diversas condiciones que pueden afectar en el resultado, como, las condiciones del cultivo, su crecimiento en el medio, la edad de la cepa, el tiempo en estufa, lo que puede

provocar envejecimiento, estos son factores que interfieren en un correcto diagnóstico, además del ojo crítico y experiencia del técnico que valora la prueba (11).

Una muestra identificada por PRA no es concordante con el resultado obtenido por PBT. La muestra 11, que por PBT dio como resultado a *M. gordonae*, por el método PRA fue identificada como *M. intracellulare*. Se revisaron los antecedentes y los resultados de las PBT en donde se observó que el paciente de 70 años de edad, se encuentra como antes tratado, es decir, ha tomado anteriormente el tratamiento antituberculoso, el perfil de sensibilidad muestra resistencia a casi todas las drogas de primera línea, lo que es compatible con MNT que por lo general muestran este perfil de resistencia natural (97). *M. intracellulare* y *M. gordonae* son micobacterias de crecimiento lento no pigmentadas frente a la luz, aunque en la oscuridad *M. gordonae* puede desarrollar coloración, ambas micobacterias dan los mismos resultados frente a las PBT, a excepción de la hidrólisis de Tween, cuyo resultado puede haberse interpretado erróneamente. En base a este análisis se puede observar la necesidad de una técnica rápida y precisa para la identificación de micobacterias, a fin de dar el diagnóstico y tratamiento correcto y de manera oportuna al paciente.

No se logró la identificación de una micobacteria por el método de análisis de patrones de restricción. Los patrones encontrados no fueron concordantes con los de la base de la página web de referencia.

Los organismos del Complejo *Mycobacterium avium* (MAC) denominado también *Mycobacterium avium intracellulare* (MAI) (98, 99), son unos de los organismos aislados frecuentemente responsables de la mayoría de las enfermedades que afectan al ser humano además de TB; se encuentran asociados principalmente a pacientes con SIDA. Estos organismos no pueden ser identificados con facilidad por pruebas bioquímicas de tipificación (99, 100). El grupo *Mycobacterium chelonae-abscessus* está formado por tres organismos: *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium immunogenum*. Estos organismos son bacterias normalmente relacionadas y son difícilmente distinguibles por técnicas bioquímicas o microbiológicas (101, 102).

Durante el análisis de los antecedentes (Anexo E), se observó que el 60% de los pacientes infectados con MNT diagnosticadas por PRA han sido tratados previamente con medicación antituberculosa, y el 20% se encontraba tomando la medicación al momento de la toma de la muestra; esto puede ser contraproducente debido a que la administración de medicación inadecuada, puede provocar la prevalencia de las micobacterias infectantes y no eliminarlas.

Por ser la Tuberculosis una enfermedad de gran importancia en la salud humana con resultados de confirmación lentos, los casos son diagnosticados por baciloscopía. Al momento de obtener la primera baciloscopía positiva del individuo sintomático respiratorio, se administra de manera inmediata el tratamiento médico, sin investigar los antecedentes del paciente o realizar estudios profundos sobre la

bacteria, y en casos de enfermedades por MNT se corre el riesgo de que el paciente empeore. Cabe mencionar que la medicación para TB, puede tener efectos adversos como fiebre, hepatitis, anemia, trastornos gastrointestinales, vértigo, toxicidad renal, gota, entre otros (103, 104).

Micobacterias No Tuberculosas como Complejo MAI, Complejo *chelonae abscessus*, *M. fortuitum*, *M. flavescens*, identificadas en este estudio por PBT, y *M. avium s. avium tipo 1*, *M. intracellulare tipo 1 y 5*, *M. flavescens tipo 2*, *M. chelonae tipo 1*, *M. abscessus tipo 2*, identificadas por PRA, son concordantes a las reportadas previamente para la región en países como Cuba, Venezuela, Colombia, Perú, Argentina y Chile (11, 71, 73, 96, 105, 106).

CONCLUSIONES

Se logró tipificar micobacterias a partir de cepas inactivadas mediante análisis de patrones de restricción (PRA) utilizando enzimas del tipo II: *BstE II* y *Hae III*. Se encontró que el método molecular es altamente sensible sobre los métodos bioquímicos, debido a que los factores que pueden intervenir en la calidad de los resultados, son menores.

Se ha implementado el procedimiento de análisis de Patrones de Restricción (PRA) para la tipificación de Micobacterias a partir de cepas inactivadas como herramienta de diagnóstico para el Centro de Referencia Nacional de Tuberculosis y Otras Micobacterias.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la metodología del análisis de Patrones de Restricción con el banco internacional de perfiles de restricción de micobacterias en el sitio web <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>

Se comparó los resultados obtenidos por Análisis de Patrones de Restricción con los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales. Se puede confiar en estos resultados debido a que no se evidenció contaminación en los procesos, además de que los perfiles de restricción obtenidos son específicos para cada organismo.

Este método no es útil para la identificación de micobacterias del complejo tuberculoso debido a que estas bacterias se encuentran altamente relacionadas entre ellas. Para diferenciarlas entre si existen otros métodos de biología molecular con alta sensibilidad como la secuenciación de un gen específico.

No se logró identificar una muestra por análisis de patrones de restricción, debido a que los fragmentos obtenidos no eran concordantes con los mostrados en la página web de referencia.

La identificación de las micobacterias se puede reforzar con el estudio de los antecedentes del paciente

Las micobacterias identificadas en este estudio eran compatibles con estudios previos realizados para la región, como en Venezuela y Colombia.

El Análisis de Patrones de Restricción PRA se puede aplicar para identificar a nivel de especie los organismos que por PBT son caracterizados como complejos, como en el caso de MAC y Complejo *chelonae abscessus*.

Debido a los pocos estudios realizados en nuestro país con respecto a micobacterias no tuberculosas, es probable que existan subtipos de micobacterias no descritas, por ello no se logró identificar al 100% las muestras de este estudio.

El gen *hsp65* que codifica para la proteína de choque térmico, se encuentra presente en todas las micobacterias, sin embargo, la secuencia de este gen muestra variabilidad específica para cada especie. Por ello, se la considera una herramienta útil para la identificación de las micobacterias a nivel de especie ya sea por análisis de los patrones de restricción o secuenciación genética.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar este procedimiento con un mayor número de muestras de Micobacterias No Tuberculosas.

Este estudio se debe complementar con la secuenciación del gen 16S RNAr y compararlo con la secuencia del gen hsp65.

Se recomienda replicar este estudio con nuevas enzimas a fin de obtener nuevos perfiles de restricción de micobacterias comparables con nuevas investigaciones.

Se recomienda utilizar el análisis de patrones de restricción como herramienta auxiliar de diagnóstico para el paciente.

Es necesario realizar estudios más profundos sobre las micobacterias presentes en nuestro país, desde su patología hasta la información genética contenida en ellos, a fin de fortalecer la información epidemiológica de nuestro país.

ANEXOS

**ANEXO A - AGENTES ANTIMICOBACTERIANOS A
CONSIDERAR PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD
DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (107).**

Grupos de Especies de Micobacterias	Utilidad probada Clínicamente Relevante	Relevancia Incierta	Prueba de Sensibilidad que No Muestra Beneficios (Resistencia Natural)
MNT de crecimiento lento			
MAC	Claritromicina*	Amikacina Ciprofloxacina Etambutol Etionamida Rifabutina Rifampicina Estreptomina	Isoniazida Pirazinamida
<i>M. kansasii</i>	Rifampicina	Amikacina Ciprofloxacina Claritromicina* Etambutol Isoniazida Rifabutina Estreptomina Sulfonamida	Pirazinamida
<i>M. marinum</i>	Doxycycline o Minocycline Etambutol Rifampicina Sulfonamida	Amikacina Ciprofloxacina Claritromicina* Rifaburina	Isoniazida Pirazinamida
Otras MNT de crecimiento lento			
<i>M. haemophilum</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i>	Claritromicina*+ Etambutol 1 Rifampicina 1	Amikacina Ciprofloxacina Isoniazida Rifabutina Estreptomina	Pirazinamida
MNT de crecimiento rápido			
<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. smegmatis</i>	Amikacina Cefoxitina Ciprofloxacina Claritromicina* Doxycycline o Minocycline Sulfonamidas	Cefmetazole Imipenem Ofloxacina Tobramicina (solo <i>M. chelonae</i>)	Clofacimina Etambutol # Isoniazida Pirazinamida Rifampicina Estreptomina
* Clase de drogas para macrólidos (claritromicina, azitromicina, roxitromicina) + Etambutol es clínicamente útil para <i>M. smegmatis</i> # Utilidad probada clínicamente relevante para algunas pero no todas las especies			

**ANEXO B - TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
PULMONARES ASOCIADAS A MICOBACTERIAS DE
CRECIMIENTO RÁPIDO (108).**

Micobacteria No Tuberculosa de Crecimiento Rápido	Droga Activa
M. abscessus	Claritromicina Amikacina Cefoxitina Imipenem
M. chelonae	Tobramicina Claritromicina Linezolid Imipenem Amikacina Doxyciclina Ciprofloxacina
M. fortuitum	Amikacina Ofloxacina/Ciprofloxacina Imipenem Sulfonamidas Claritromicina Doxiciclina

ANEXO C - BASES DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE TIPIFICACIÓN

Producción de niacina

La niacina (ácido nicotínico) juega un papel vital en las reacciones de oxidación-reducción (20, 21, 75, 77) que ocurren durante los procesos metabólicos de todas las micobacterias.

A pesar de que todas estas bacterias producen niacina, estudios comparativos han demostrado que en ocasiones está bloqueado el camino metabólico debido a la acción de una enzima que transforma la niacina libre en niacina - ribonucleótido.

M. tuberculosis acumula grandes cantidades de ácido nicotínico y su determinación es utilizada como diagnóstico definitivo. Son escasas las cepas de *M. tuberculosis*, niacina negativa, mientras que algunas otras especies de micobacterias pueden ser niacina positiva.

Reducción de nitratos

La presencia de la enzima nitrato-reductasa es importante para la clasificación de las micobacterias: *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. fortuitum* las que reducen nitratos a nitritos. Otras especies producen también nitrato-reductasa tales como: *M. flavescens*, *M. terrae*, *M. triviale* y *M. chelonae*.

Las micobacterias que contienen esta enzima pueden utilizar el oxígeno de los nitratos (20, 21, 39, 70, 75, 77) y de otros productos de reducción.

La reacción química es:



La presencia de nitrito es detectada por la adición de sulfanilamida y N-naftil-etilendi-amina a pH ácido.

Si el nitrito está presente se forma un compuesto rojo de diazonio. La técnica se efectúa en cultivos de menos de un mes.

Inhibición de actividad de catalasa

La mayoría de las micobacterias producen la enzima catalasa, algunas más que otras, la determinación se puede realizar por tres técnicas (20, 21, 39, 70, 75, 77):

- 1- La catalasa semicuantitativa, indica el nivel de producción de la enzima.
- 2- Pérdida de la actividad a 68°C y pH.
- 3- Método a temperatura ambiente o de la gota: realizado en ocasiones para una determinación cualitativa rápida de catalasa.

Los organismos productores de esta enzima tienen la habilidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre.



La reacción en las micobacterias difiere de la utilizada en otros tipos de bacterias, por el empleo de peróxido de hidrógeno al 30% y una solución concentrada de

detergente: Tween 80 al 10%, el cual ayuda a dispersar la masa bacteriana hidrofóbica, hasta bacilos separados individualmente, maximizando la determinación de la enzima.

Hidrólisis de Tween 80

La hidrólisis enzimática del Tween 80 es una importante característica de la diferenciación de micobacterias (20, 21, 39, 70, 75).

Con raras excepciones las especies que hidrolizan el Tween 80 en 10 días no son clínicamente significativas, por ej. el bacilo del agua de canilla *M. gastri*, *M. terrae* y *M. triviale*, mientras que las especies que tienen importancia clínica, *M. scrofulaceum* y el complejo *M. avium-intracellulare*, son negativas.

El Tween 80 es la marca registrada del detergente: monoleato de polioxietileno sorbitan.

Tomar nota de la fecha en que observa ese cambio de color y seguir incubando hasta completar los 10 días para confirmar; el color puede intensificarse a rosado más intenso y hasta rojo pajizo.

Toma de hierro

Inocular 2 tubos de medio Löwenstein-Jensen, cada uno con 0,2 mL de una suspensión bacilar de aproximadamente 1 mg/mL de la cepa. Colocar los tubos inclinados, difundiendo la siembra en toda la superficie del medio. Incubar a 37°C

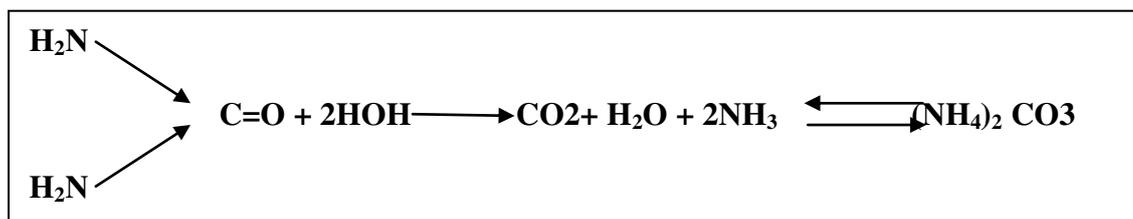
hasta el séptimo día, se revisa el cultivo para observar la presencia de contaminación (20, 21, 75), Micobacterias no tuberculosas y se registra si existe presencia de agua o cambio de coloración en el medio, lo que nos puede indicar un cambio de pH, y a su vez un crecimiento no adecuado. Si no se observa presencia de suspensión bacilar, es decir, si ya se ha reabsorbido en la superficie del medio, se pueden levantar, en caso contrario, se deja inclinado hasta que la suspensión haya penetrado el medio.

Una vez que hemos dejado en posición vertical, y hemos observado crecimiento de colonias, añadir en el fondo de uno de ellos 1 mL de la solución de citrato de hierro amoniacal sin toca la superficie del medio, es decir, se agrega en dirección e la pared del tubo, del mismo modo, en el otro tubo, agregar 1 ml de agua destilada estéril. Incubar en posición vertical a 37°C por tres semanas.

El resultado esperado, es la presencia de un anillo color rojo o amarillo alrededor del tubo. Justo en el límite superior donde se ha agregado el Citrato de Hierro Amoniacal.

Método de la Ureasa

Determina la capacidad del organismo para desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa, que está clasificada como una amidasa, es decir que cataliza la hidrólisis de las amidas, es capaz de romper la unión entre el carbono y el nitrógeno (20, 21, 75).



ANEXO D - ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ÚTILES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE MICOBACTERIAS (70, 109).

Prueba o Propiedad	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. farinosus</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. avium intracellulare</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. gastri</i>	<i>Comp. M. terrae</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae abscessus</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. vaccae</i>
Crecimiento	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R
Pigmentación en la oscuridad	-	-	-	-	-	+	1	+	+	2	3	-	-	-	-	-	-	+	-	v
Fotocromogenicidad	-	-	+	+	+	2	1/2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Niacina	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	- / +	-	-	-	-	v	-	-	-
Nitrato Reducción	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Catalasa 68°C, 20 min.	-	-	+	-	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	P	+
Hidrólisis de Tween (5-10 días)	P	-	+	+	-	-	P	+	+	-	-	-	+	+	+	P	-	+	+	+
Toma de Hierro	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Ureasa	+	+	+			+		-	+	-	-		+	-		+	+			

L: Lento
R: Rápido
P: Parcial, algunas cepas poseen esta característica, otras no.
V: Variable
1: *M. szulgai* es escotocromógena cuando crece a 37°C y fotocromógena a 25°C.
2: El pigmento se intensifica por envejecimiento o por exposición prolongada a la luz.
3: En algunas cepas aparece pigmentación por envejecimiento.
Espacio en blanco: No hay suficientes datos.

ANEXO E - DESCRIPCIÓN DE CEPAS: ANTECEDENTES Y CLÍNICA DE PACIENTES.

CODIGO BIOLOGIA MOLECULAR	TIPO DE MUESTRA	PROCEDENCIA	AÑO	SEXO	EDAD	DX	VIH	MDR	PSD
1	ESPUTO	EL ORO	2013	M	20	VT			
2	ESPUTO	EL ORO	2013	F	15	CT			
3	ESPUTO	EL ORO	2013	M	25	CT	X		
4	ASPIRADO GASTRICO	GUAYAS	2012	M	7	VT			
5	ESPUTO	EL ORO	2013	M	41	VT			
6	ESPUTO	EL ORO	2013	F	32	VT			
7	ESPUTO	SUCUMBIOS	2011	M	44	AT			RSRSS
8	ESPUTO	SUCUMBIOS	2010	F	31	AT		x	RRRRS
9	ESPUTO	SUCUMBIOS	2010	F	31	AT			RRRRS
10	ESPUTO	EL ORO	2010	F	66	AT			RRRRS
11	ESPUTO	GUAYAS	2011	F	70	AT			RRRRS
12	ESPUTO	SUCUMBIOS	2010	F	55	AT			RRRRS
13	ESPUTO	EL ORO	2013	M	57	VT			SSSSS
14	ESPUTO	EL ORO	2013	M	55	VT			SSSSS
15	GANGLIO	GUAYAS	2012	F	37	CT			
16	LIQUIDO PLEURAL	GUAYAS	2010	F	40	VT			
17	ESPUTO	GUAYAS	2011	M	88	CT			RRRRS

18	ESPUTO	MORONA SANTIAGO	2010	M	26	AT			RRRRS
19	ESPUTO	AZUAY	2010	M	88	CT			
20	ESPUTO	ESMERALDAS	2012	M	47	CT			
21	LIQUIDO PLEURAL	GUAYAS	2009	M	17	VT		x	
22	ESPUTO	LOS RIOS	2012	F	30	VT			SSRSS
23	ESPUTO	EL ORO	2012	F	24	VT			
24	ORINA	GUAYAS	2012	M	62	AT			RRRRS
25	ESPUTO	EL ORO	2012	M	102	VT			
26	ESPUTO	EL ORO	2012	M	78	VT			
27	ESPUTO	EL ORO	2012	M	32	VT			
28	ESPUTO	EL ORO	2012	F	90	VT			
29	ESPUTO	EL ORO	2012	M	69	VT			
30	ESPUTO	EL ORO	2012	M	41	VT			
31	ESPUTO	EL ORO	2012	M	30	VT			
32	ESPUTO	EL ORO	2012	F	26	VT			
33	ESPUTO	EL ORO	2012	M	18	VT			
34	ESPUTO	EL ORO	2012	M	21	VT			
35	ESPUTO	EL ORO	2012	M	66	VT			
36	ESPUTO	EL ORO	2012	M	42	VT			
37	ESPUTO	EL ORO	2012	F	83	VT			
38	ESPUTO	EL ORO	2012	M	48	VT			
39	ESPUTO	GUAYAS	2011	M	62	AT			
40	ESPUTO	GUAYAS	2010	F	75	VT			
41	ESPUTO	GUAYAS	2011	F	75	VT			RSSSR

42	LAVADO BRONQUEAL	GUAYAS	2013	M	28	VT			SSSSS
43	ESPUTO	GUAYAS	2011	M	63	AT			
44	ESPUTO	GUAYAS	2013	M	52	VT			SSSSS
45	ASPIRADO GASTRICO	GUAYAS	2011	F	4	VT			
46	ESPUTO	GUAYAS	2013	F	54	VT			SSSSS
47	ESPUTO	GUAYAS	2013	M	31	VT			SSSSS
48	ESPUTO	GUAYAS	2013	M	53	VT			SSSSS
49	ESPUTO	GUAYAS	2013	M	28	VT			SSSSS
50	ESPUTO	GUAYAS	2013	M	30	VT	X	X	SSSSS
51	ESPUTO	GUAYAS	2013	F	28	VT			SSSSS
52	ESPUTO	GUAYAS	2013	F	65	VT			SSSSS
53	ESPUTO INDUCIDO	GUAYAS	2013	M	75	VT	X		RSSSS
54	GANGLIO	GUAYAS	2010	M	61	VT	X		
55	ESPUTO	GUAYAS	2012	M	20	VT		X	RRSSS
56	ESPUTO	GUAYAS	2012	F	32	VT			SSSSS
57	ESPUTO	GUAYAS	2012	M	46	CT		X	RRSSS
58	ESPUTO	GUAYAS	2012	M	63	VT			RSRSS
59	ESPUTO	GUAYAS	2012	M	74	VT			SSSSS
60	ESPUTO	GUAYAS	2012	M	56	CT			SSSSS

ANEXO F - REACTIVO DE GRIESS: SOLUCIÓN A y

SOLUCIÓN B (70).

Solución A	
Ácido Sulfanílico (o Sulfanilamida)	0,8 g
Ácido Acético	30 ml
Agua destilada	100 ml

Solución B	
α naftilamina	0.5 g
Ácido Acético	30 ml
Agua Destilada	100 ml

**ANEXO G - REACTIVOS PARA PREPARAR LA
MASTER MIX POR MUESTRA (8).**

10 X Buffer PCR sin Mg ²⁺	5 µl
MgCl 50 mM	2 µl
dNTP 2 mM	1 µl
TB 11; 20 pmoles	1 µl
TB 12 ;20 pmoles	1 µl
Betaína 10% final	5.7 µl
Agua	29.2 µl
Taq pol	0.2 µl
ADN	5 µl
Volumen total	50 µl

ANEXO H - PROGRAMA EN QUE SE REALIZA LA PCR

(8).

Desnaturalización	95°C	5 min
35 ciclos	94°C	1 min
	60°C	1 min
	72°C	1 min
Extensión Final	72°C	∞

**ANEXO I - PREPARACIÓN DE LA MEZCLA PARA
RESTRICCIÓN DE GENES (8).**

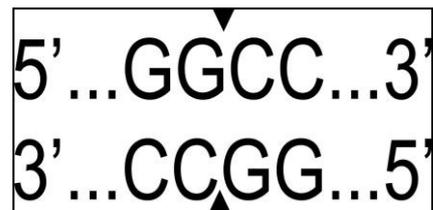
Producto de PCR	15 μ l
10X Buffer específico para cada enzima	2,5 μ l
Enzima	1 μ l
Agua	<u>6,5 μl</u>
Volumen Final	25 μ l

**ANEXO J - PALÍNDROME DE RECONOCIMIENTO DE
ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (110, 111).**

BstE II



HaeIII

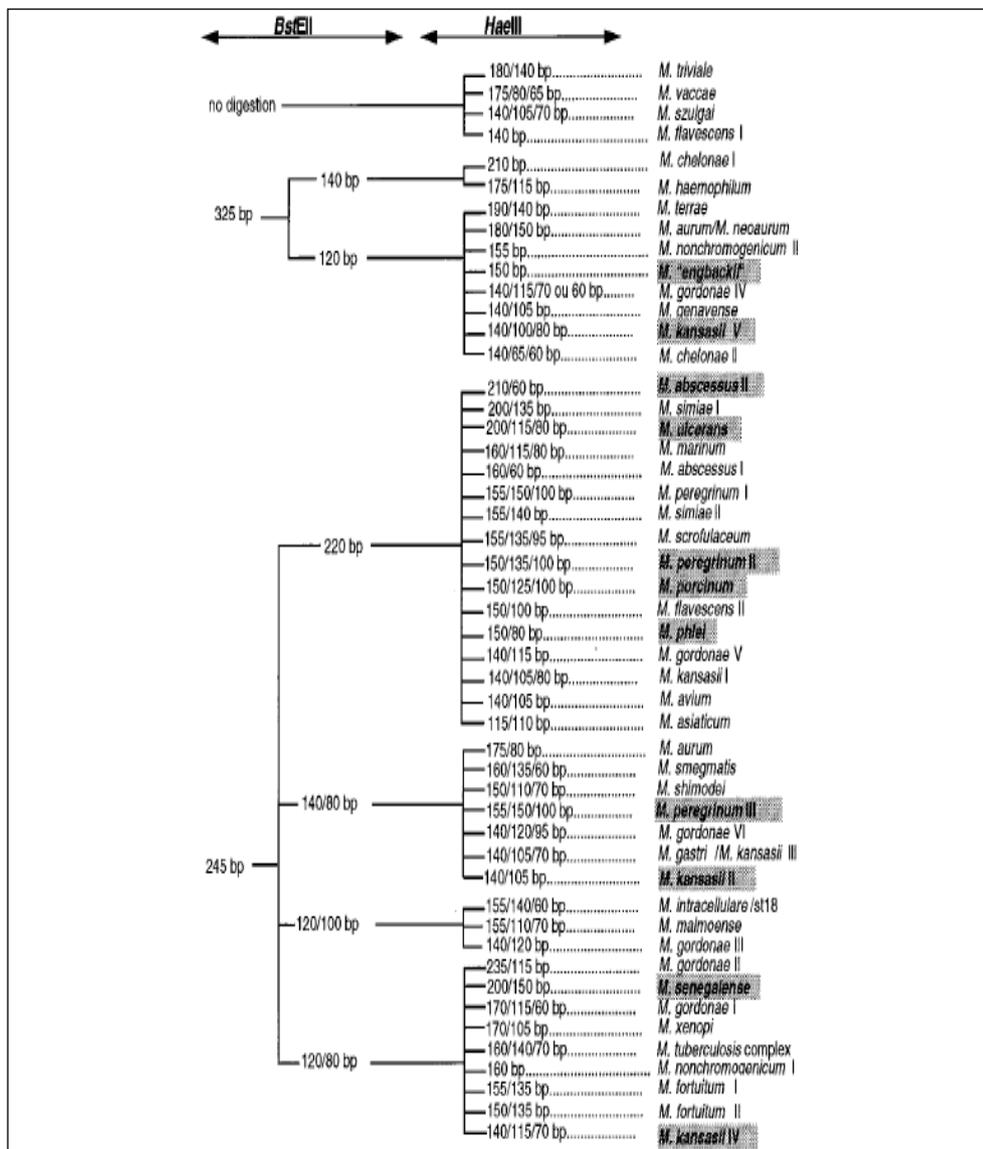


ANEXO K - ALGORITMO DE PATRONES PRA PARA

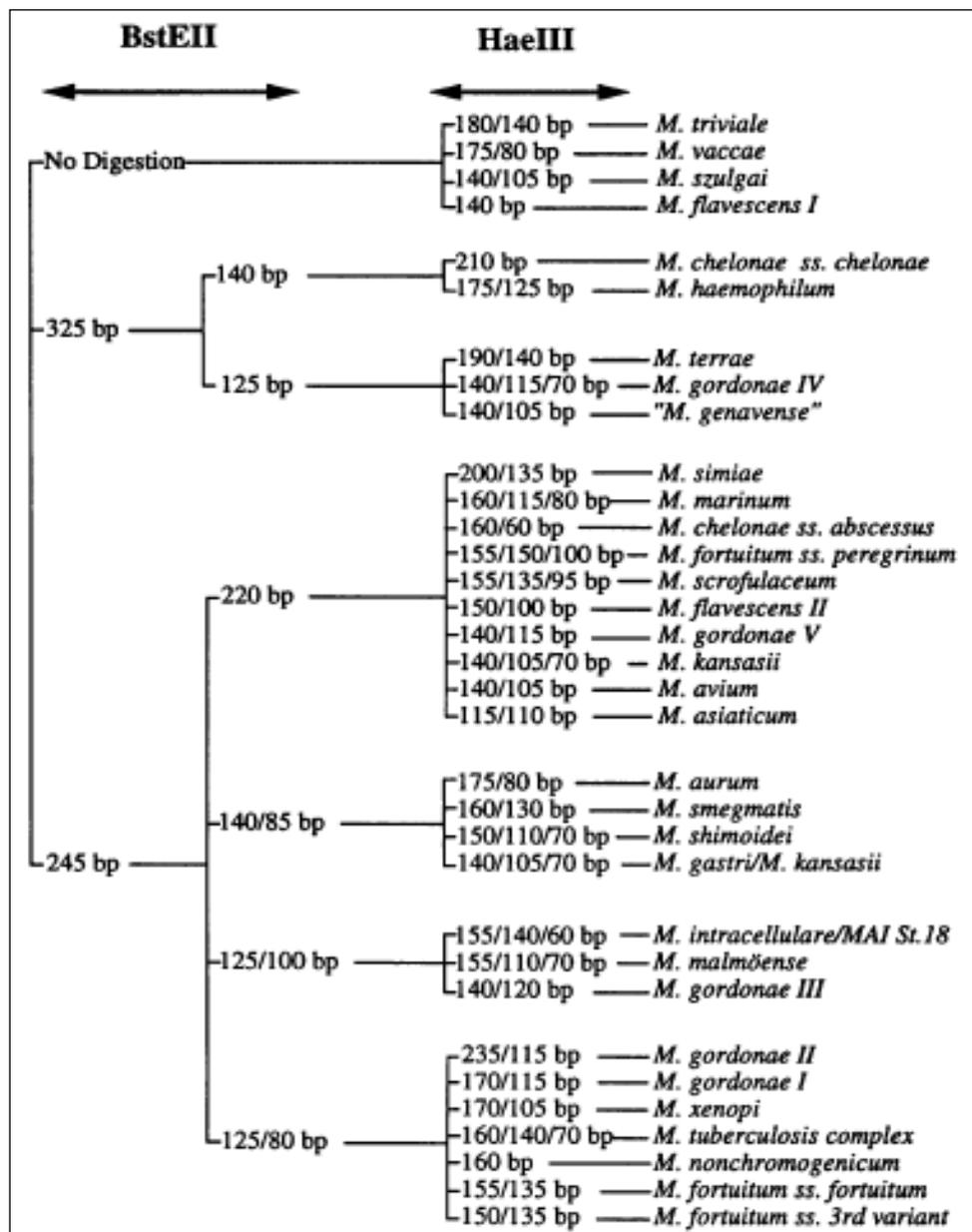
34 ESPECIES LA DIFERENCIACIÓN DE

MICOBACTERIAS A NIVEL ESPECIE PROPUESTO

POR TELENTI (10).



**ANEXO L - ALGORITMO PARA LA DIFERENCIACIÓN
DE MICOBACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA Y
DE LABORATORIO A NIVEL DE ESPECIE
PROPUESTO POR DEVALLOIS (47).**



B0IBLIOGRAFÍA

1. Han, X. Y., Seo, Y. H., Sizer, K. C., Schoberle, T., May, G. S., Spencer, J. S., ... Nair, R. G. (2008). A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. *American Journal of Clinical Pathology*, 130, 856–864.
2. Han, X. Y., Sizer, K. C., Thompson, E. J., Kabanja, J., Li, J., Hu, P., ... Silva, F. J. (2009). Comparative sequence analysis of Mycobacterium leprae and the new leprosy-causing Mycobacterium lepromatosis. *Journal of Bacteriology*, 191(19), 6067–6074.
3. Organización Mundial de la Salud. (2014). Lepra. Nota Descriptiva N° 101.
4. World Health Organization. (2014). *Global Tuberculosis Report 2014*. World Health Organization.
5. World Health Organization. (2009). *REPORT 2009 Global Tuberculosis Control*. World Health Organization.

6. World Health Organization. (2012). *Global Tuberculosis Report 2012*. World Health Organization.
7. Falkinham III, J. O. . (1996). Epidemiology of infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Review*, 9(2), 177–215.
8. Araya, P. (2007). Procedimiento Análisis de Patrones de Restricción (PRA) de Micobacterias Atípicas.
9. Steingrube, V. a, Gibson, J. L., Brown, B. a, Zhang, Y., Wilson, R. W., Rajagopalan, M., & Wallace, R. J. (1995). PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 149–153.
10. Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C., & Bodmer, T. (1993). Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2), 175–178.
11. Godoy, M. J., Orozco, L., Hernández, C., DaMata, O., Jacobus, D. W., & Gonzáles Rico, S. (2008). Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Revista D Ela Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28, 96–104.

12. Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., ... Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 Sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 852–857.
13. García-Martos, P., & García-Agudo, L. (2012). Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(4), 192–200.
14. Rodríguez, G. (1945). Mycobacterias. *Temas de Bacteriología Y Virología Médica*, 381–400.
15. Goodfellow, M., & Magee, J. G. (1998). 1 Taxonomy of Mycobacteria. In *Mycobacteria I Basics Aspects* (p. 401).
16. Basso, L. A., Pereira Da Silva, L. H., Fett-Neto, A. G., Filgueira De Azevedo, W., De Souza Moreira, Í., Palma, M. S., ... Santos, D. S. (2005). The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases - A Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(6), 475–506.
17. Caminero Luna, J. A. (2001). MICOBACTERIAS ATÍPICAS. *BSCP Can Ped*, 25(2), 237–248.

18. Del Solar, M. (n.d.). *Micobacterias Atípicas. Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt" de La Universidad Peruana Cayetano Heredia.*
19. Bannalikal, a. S., & Verma, R. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* & *M. tuberculosis* from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR. *Indian Journal of Medical Research*, 123(February), 165–172.
20. Bernardelli, A. (2007). *Manual de Procedimientos. Clasificación fenotípica de las micobacterias.*
21. De Hoyos Urzola, V. (2009). *MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA DE Mycobacterium tuberculosis A LOS ANTIMICROBIANOS. Pontificia universidad javeriana.*
22. Soini, H., & Musser, J. M. (2001). Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clinical Chemistry*, 47(5), 809–814.
23. Gopinath, K., & Singh, S. (2010). Non-Tuberculous Mycobacteria in TB-Endemic Countries: Are we neglecting the danger? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(4), 1–4.
24. Timpe, A., & Runyon, E. H. (1954). The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 44.

25. Del Solar, M., Salomón, M., Bravo, F., Seas, C., Gotuzzo, E., Culqui, D., ... Suárez, L. Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética. Reporte de casos y revisión de la literatura., 16 *Folia Dermatológica Peruana* 127–135 (2005).
26. Saldías P, F., Tirapegui S, F., Día, & z P, O. (2013). Infección pulmonar por *Mycobacterium avium* complex en el huésped inmunocompetente. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 29, 162–167.
27. Ramos e Silva, M., & Ribeiro de Castro, C. (2003). Mycobacterial Infections. In *Dermatology*. (1st ed., pp. 1145–64).
28. Runyon, E. H., & Timpe, A. (2008). Runyon Clasification of Nontuberculous Mycobacteria.
29. Shields, T., Reed, C., LoCicero III, J., & Feins, R. (2009). *General Thoracic Surgery* (7th editio).
30. Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., & Woods, G. (2006). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (6th editio).
31. Farga C, V., & Caminero L, J. A. (2011). *Tuberculosis*. (Mediterráneo, Ed.)*Revista chilena de infectología* (3a edición, Vol. 28).
32. McMurray, D. N. (n.d.). Mycobacteria and Nocardia.

33. Ulrichs, T., & Kaufmann, S. H. E. (2002). Mycobacterial Persistence and Immunity.
34. Zerbini, E., Darnaud, R. M., Prieto, V., Imaz, S., Sequeira, M. D., Dato, M. I., & Bossio, J. C. (2008). *Programa Nacional De Control De La Tuberculosis. Normas Técnicas 2008. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* (Tercera Ed).
35. Kerbiriou, L., Ustianowski, A., Johnson, M. a, Gillespie, S. H., Miller, R. F., & Lipman, M. C. I. (2003). Human immunodeficiency virus type 1-related pulmonary Mycobacterium xenopi infection: a need to treat? *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37, 1250–1254.
36. Yim, J. J., Park, Y. K., Woo, J. L., Bai, G. H., Sung, K. H., & Shim, Y. S. (2005). Mycobacterium kansasii pulmonary diseases in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 20, 957–960.
37. Organización Mundial de la Salud. (2013). *Informe mundial sobre la tuberculosis 2013. Organizacion Mundial de la Salud.*
38. Organización Mundial de la Salud. (2012). *Informe mundial sobre la tuberculosis 2012.*

39. Organización Panamericana de la salud. (2008). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. parte 2 Cultivo. *Organización Panamericana de La Salud*, 114.
40. World Health Organization. (2011). *Global Tuberculosis Control 2011. World Health Organization*.
41. Ministerio de Salud Publica del Ecuador. (2010). *Manual de Normas y Procedimientos para el Control de la Tuberculosis. Ministerio de Salud Publica del Ecuador* (Segunda Ed).
42. Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Guía para el control de la tuberculosis en poblaciones privadas de libertad de América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud*.
43. Farga C, V. (2011). Nuevos desafíos en tuberculosis. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 27, 161–168.
44. Edwards, L. B., Acquaviva, F. A., Livesay, V. T., Cross, F. W., & Palmer, C. E. (1969). An atlas of sensitive to tuberculin, PPD-B, and histoplasmin in the United States in the United States. *The American Review of Respiratory Disease*, 99, 1–133.
45. Ramos, & Silva, M. (2003). *Ribeiro de Castro C Mycobacterial infections. Dermatology* (First Ed).

46. Arenas, R., Vega, M., & Hojyo, T. (1993). Micobacteriois atípicas. Aspectos clinico-epidemiológicos de 44 casos. *Dermatology Review Mexico*, 37, 305–15.
47. Devallois, A., Seng Goh, K., & Rastogi, N. (1997). Rapid identification of Mycobacteria to Species Level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 Gene and Proposition of an Algorithm to Differentiate 34 Mycobacterial Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2969–2973.
48. Winthrop, K. L., McNelley, E., Kendall, B., Marshal-Olson, A., Morris, C., Cassidi, M., ... Hedberg, K. (2010). Pulmonary Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, 182.
49. Mee Hwang, S., Suk Lim, M., Ji Hong, Y., Soo Kim, T., Un Park, K., Song, J., ... Chong Kim, E. (2013). Simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. *ELSEVIER*, 93, 642–646.
50. Adékambi, T., & Drancourt, M. (2004). Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2095–2105.

51. Wolinsky, E. (1979). Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *American Review of Respiratory Disease*, 107–159.
52. Banks, J., Jenkins, P., & Smith, A. (1985). Pulmonary Infection with *Mycobacterium malmoense*: a review of treatment and response. *Tubercle*, 66, 197–203.
53. Howell, N., Heaton, P., & Neutze, J. (1997). The Epidemiology of Non-Tubercular Mycobacterial Lymphadenitis Affecting New Zealand Children. *New Zealand Medical Journal*, 110, 171–173.
54. Chetchotisakd, P., Kiertiburanakul, S., Mootsikapun, P., Assanasen, S., & Chaiwarith, R. (2007). Disseminated Non-Tuberculous Mycobacterial Infection in Patients Who are not Infected with HIV in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 421–427.
55. Mizuguchi, Y. (1984). Micobacteriophages. In *The Mycobacteria: A Sourcebook*. (pp. 629–639).
56. Rastogi, N., & Barrow, W. W. (1994). Cell envelope constituents and the multifaceted nature of *Mycobacterium avium* pathogenicity and drug resistance. *Research and Microbiology*, 145, 243–252.
57. Rastogi, N., Frehel, C., Ryter, A., Ohayon, H., Lesourd, M., & David, H. L. (1981). Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: is the wall

architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20, 666–677.

58. Cambau, E., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (1994). Amplification and Nucleotide sequence of the quinolona resistance-determining region in the *gyrA* gene of mycobacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 116, 49–54.
59. Ichikawa, K., Yagi, T., Inagaki, T., Moriyama, M., Nakagawa, T., Uchiya, K. I., ... Ogawa, K. (2010). Molecular typing of Mycobacterium intracellulare using multilocus variable-number of tandem-repeat analysis: Identification of loci and analysis of clinical isolates. *Microbiology*, 156, 496–504.
60. Jarlier, V., & Nikaido, H. (1994). Mycobacterial Cell Wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 123.
61. Rastogi, N., Gob, K. S., & David, H. L. (1990). Enhancement of drug susceptibility of Mycobacterium avium by inhibitors of cell envelopesynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 759–764.
62. Rastogi, N., Goh, K. S., & Labrousse, V. (1993). Activity of subinhibitory concentrations of dapsone alone and in combination with cell-wall inhibitors against Mycobacterium avium complex organisms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 12, 954–958.

63. Hoffner, S., Heurlin, N., Petrini, B., Svenson, S., & Kallenius, G. (1994). Mycobacterium avium complex develop resistance to synergistically active drug combinations during infection. *European Respiratory Journal*, 7, 247–250.
64. Hoffner, S., Kallenius, G., Beezer, A., & Svenson, S. (1989). Studies on the mechanisms of the synergistic effects of ethambutol and other antibacterial drugs on Mycobacterium avium complex. *Acta Leprologica Journal*, 7(1), 195–199.
65. Hoffner, S., Kallenius, G., Petrini, B., Brennan, P. J., & Tsang, A. Y. (1990). Serovars of Mycobacterium avium complex isolated from patients in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1105–1107.
66. Hoffner, S., Svenson, S., & Kallenius, G. (1987). Synergistic effects of antimycobacterial drug combinations on Mycobacterium avium complex determined radiometrically in liquid medium. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 6(530-535).
67. World Health Organization. (2013). *The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs*. World Health Organization.
68. Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 22, 57–67.

69. Santos Lima, A., Silva Duarte, R., Lapa Montenegro, M. L., & Charifker Schindler, H. (2013). Rapid detection and differentiation of mycobacterial species using a multiplex PCR system. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(4), 447–452.
70. Zoonosis, C. P. de. (1979). *Bacteriología de la Tuberculosis Humana y Animal*.
71. Castro, C. M., Puerto, G., García, L. M., Orjuela, D. L., Polo, C. L., Garzón, M. C., & Ribón, W. (2007). Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción. *Journal of Microbiology*, 27, 439–446.
72. Alcaide, F., Esteban, J., González, J., & Palacios, J. J. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Micobacterias. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
73. Araya R, P., Velasco R, M., & Fernández O, J. (2006). Identificación rápida de micobacterias no tuberculosas mediante análisis de patrones de restricción. *Revista Medica de Chile*, 134, 868–873.
74. Da Silva Rocha, A., Werneck Barreto, A. M., Dias Campos, C. E., Villas-Bôas Da Silva, M., Fonseca, L., Saad, M. H., ... Suffys, P. N. (2002). Novel Allelic Variants of Mycobacteria Isolated in Brazil as Determined by PCR-Restriction

Enzyme Analysis of hsp65. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4191–4196.

75. Cortés Sierra, E. (2009). Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de. *Pontificia Universidad Javeriana*.
76. Garrigó, M., Coll, P., & Pau, H. D. S. (n.d.). Identificación de las micobacterias. *Control Calidad SEIMC*, 1–11.
77. Kuffo, D., Franco, G., Avegia, L., Alvarado, K., Sosa, P., & Villamar, H. (2011). *Manual de normas técnicas y procedimientos para el diagnóstico de la tuberculosis por cultivo. Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez*.
78. Turner, P., McLennan, A., Bates, A., & White, M. (2007). *Molecular Biology. BIOS Instant Notes* (3rd editio, Vol. 1).
79. Bernatzky, R. (1988). Restriction Fragment Length Polymorphism. *Plant Molecular Biology Manual, C2*, 1–18.
80. Institute for Microbiology. (n.d.). Description of the Method.
81. Kim, H., Kim, S. H., Shim, T. S., Kim, M. N., Bai, G. H., Park, Y. G., ... Kim, B. J. (2005). Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1649–1656.

82. Segal, G., & Ron, E. Z. (1996). Regulation and Organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, *138*, 1–10.
83. Lee, H., Park, H., Cho, S., Bai, G., & Kim, S. (2000). Species Identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of *therpoB* Gene Species Identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the *rpoB* Gene, *38*(8), 2966–2971.
84. Hafner, B., Hagg, H., Geiss, H., & Nolte, O. (2004). Different Molecular Methods for the Identification of Rarely Isolated Non-Tuberculous Mycobacteria and Description of New *hsp65* Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns. *Molecular and Cellular Probes*, *18*(1), 59–65.
85. Hosek, J., Svastova, P., Moravkova, M., Pavlik, I., & Bartos, M. (2006). Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: A review. *Veterinarni Medicina*, *51*(5), 180–192.
86. Wards, B. J., Collins, D. M., & De Lisle, G. W. (1995). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by Polymerase Chain Reaction. *Veterinary Microbiology*, *43*, 227–240.
87. Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., & Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, *103*, 209–217.

88. Ayele, W. Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., & Pavlik, I. (2005). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 1210–1214.
89. Araya, P., Tognarelli, J., & Fernández, J. (2009). Procedimiento Tipificación de Mycobacterium tuberculosis Mediante RFLP.
90. Gori, A., Bandera, A., Marchetti, G., Esposti, A. D., Catozzi, L., Nardi, G. P., ... Franzetti, F. (2005). Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(8), 1242–1248.
91. Green, M. R., & Sambrook, J. (2013). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (Vol. 33).
92. Beckmann, J. S., & Soller, M. (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, *67*(1), 35–43.
93. Taylor, T. B., Patterson, C., Hale, Y., & Safranek, W. W. (1997). Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(1), 79–85.

94. 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 hsp65 Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2799–2806.
95. Murcia, M. I., Cardoso Leao, S., Ritacco, V., Palenque, E., De Oliveira, R. S., Reniero, A., ... García, M. J. (2004). Distribución de patrones PRA en aislamientos clínicos del complejo *Mycobacterium avium* procedentes de España y Suramérica. *Biomédica*, 24, 60–64.
96. Hernández, C., Correa, M., Zamora, F., Rossi, M., Gonzáles, S., Pedroza, R., & Gómez, M. (2005). Aislamiento e identificación de micobacterias mediante métodos bacteriológicos y de biología molecular. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2), 203–216.
97. Gillespie, S. (1994). *Medical Microbiology Illustrated* (1st ed.).
98. Coelho, A. C., Pinto, M. D. L., Matos, A., Matos, M., & Dos Anjos Pires, M. (2013). *Mycobacterium avium* Complex in Domestic and Wild Animals. In *Insights from Veterinary Medicine* (pp. 91–128).
99. Koirala, J. (2014). *Mycobacterium avium-intracellulare*.

100. Sircili, M. P., Roxo, E., & Leão, S. C. (1999). Discrimination of members of the *Mycobacterium avium* complex by polymerase chain reaction. *Revista de Microbiologia*, 30(1998), 144–148.
101. Yakrus, M. A., Hernandez, S. M., Floyd, M. M., Sikes, D., Butler, W. R. a Y., & Metchock, B. (2001). Comparison of Methods for Identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4103–4110.
102. Odell, I. D., Cloud, J. L., Seipp, M., & Wittwer, C. T. (2005). Rapid Species Identification Within the *Mycobacterium chelonae* – *abscessus* Group by High-Resolution Melting Analysis of hsp65 PCR Products. *American Journal of Clinical Pathology*, 123, 96–101.
103. Garcia Ramos, R., Lado Lado, F., Túnez Bastida, V., Pérez del Molino Bernal, M., & Cabarcos Ortiz de Barron, A. (2003). Tratamiento actual de la tuberculosis. *Anzales de Medicina Interna*, 20(2), 91–100.
104. García, J. (2008). Manejo de los efectos adversos del tratamiento antituberculoso. *Galicia Clínica*, 69(1), 21–28.
105. Scappaticcio B, A., Velasco R, M., Leiva C, T., & Rodríguez D, J. C. (2011). Frecuencia de micobacterias ambientales en Chile en el año 2008. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 27, 214–222.

106. Yzquierdo S, S. L., Mederos C, L., Díaz G, A., Echemendia F, M., & Montoro C, E. (2007). Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. *Revista Chilena de Infectología*, 24(5), 391–396.
107. American Thoracic Society. (1997). Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *The American Journal of the Medical Sciences*.
108. Marusic, A., & Jankovic, M. (1998). Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Pulmonary Infection*.
109. Trucksis, M., & Dunn, J. P. (2006). Mycobacterial Disease of the Eye.
110. NEB. (n.d.-a). BstEII.
111. NEB. (n.d.-b). HaeIII.