



Artículo original

Aislamiento e identificación de micobacterias mediante métodos bacteriológicos y de biología molecular

Cohinta Hernández^a, María F Correa de Adjoulian^b, Felipe Zamora^a, Marcelo Rossi^b,
Susana González Rico^a, Raquel Pedroza^b, María Gómez^a

^aSección de Bacteriología, Instituto de Medicina Tropical,

^bSección de Biología Molecular de Agentes Infecciosos, Instituto de Medicina Experimental.
Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela
Caracas, Venezuela.

Recibido 25 de octubre de 2005; aceptado 10 de noviembre de 2005

Resumen: La tuberculosis constituye un problema de salud a nivel mundial y se necesitan esfuerzos concertados para lograr un diagnóstico oportuno. Las infecciones por micobacterias no-tuberculosas (MNT) se agregan al reto diagnóstico. En este trabajo mostramos el aislamiento e identificación de micobacterias, usando métodos bacteriológicos y moleculares a partir de 256 muestras clínicas obtenidas de 188 pacientes con impresión diagnóstica de tuberculosis. De las 41 muestras en las cuales hubo aislamiento (16% del total), 24 fueron baciloscopia positiva (BK+), 58,5% y 17 BK- (41,5%). *M. tuberculosis* representó el 58,14% de los aislados y MNT el 37,2%: 6 *M. chelonae*, 4 *M. marinum*, 3 *M. fortuitum*, 3 no identificadas. La correlación entre la identificación bacteriológica y molecular fue del 93%. La presencia de un alto porcentaje de MNT aisladas de pacientes clínicamente enfermos señala la importancia de incluirlas en el diagnóstico clínico diferencial y la necesidad de implementar el cultivo como herramienta obligatoria de diagnóstico bacteriológico. Palabras claves: *M. tuberculosis*, micobacterias no tuberculosa, identificación bioquímica, identificación molecular.

Palabras clave: *M. tuberculosis*, micobacterias no tuberculosa, identificación bioquímica, identificación molecular

Mycobacteria isolation and identification by bacteriological methods and molecular biology

Abstract: Tuberculosis constitutes a worldwide major health problem and concerted effort to obtain an opportune diagnosis is needed. The infections caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM) add to the diagnosis challenge. In this work we isolated and identified mycobacteria, using bacteriological and molecular methods, from 256 clinical samples obtained of 188 patients with diagnostic impression of tuberculosis. From forty one samples with isolation (16%), 24 were bacilloscopy positive (BK+), 58,5% and 17 were BK- (41,5%). *M. tuberculosis* represented 58.14% of all isolated mycobacteria and NTM were present in 37,2%: 6 *M. chelonae*, 4 *M. marinum*, 3 *M. fortuitum*, 3 no identified. The correlation between the bacteriological and molecular identification methods was 93%. The presence of a high percentage of NTM obtained from clinically ill patients indicates the importance to include them in the differential clinical diagnosis and implementation the culture as obligate bacteriological diagnostic tool.

Keywords: *M. tuberculosis*, non-tuberculous mycobacteria, biochemical identification, molecular identification

* Correspondencia:
E-mail: herco51@yahoo.com

Introducción

La magnitud del problema de la tuberculosis a nivel mundial es enorme, a pesar de los esfuerzos por parte de las autoridades sanitarias por frenar el avance de dicha enfermedad. Un tercio de la población mundial (1.7 billones) ha sido infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, la mortalidad anual está alrededor de 3 millones de personas

y cada año se notifican alrededor de 3,3 millones de casos en todo el mundo. [1,2]. Sin embargo, según algunos cálculos, es posible que se produzcan entre 7 millones y 8,8 millones de casos, 95% de ellos en países en desarrollo. [3]. En Venezuela la tuberculosis ocupa el primer lugar como causa de muerte diagnosticada producida por un único agente infeccioso [4]. Se notifican alrededor de 25

casos por 100.000 habitantes cada año [5]. Sin embargo los informes técnicos de la Coordinación Nacional de Salud Respiratoria reconocen que existe un subdiagnóstico de esta enfermedad.

El bacilo *M. tuberculosis* es considerado uno de los organismos más virulentos dentro del grupo de las micobacterias, así como el patógeno oportunista más común en las personas inmunosuprimidas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA). Aún cuando se le considera susceptible a las drogas antimicobacterianas de uso común, hay suficientes reportes en la literatura internacional de resistencia a las mismas [6,7,8].

La tuberculosis produce alrededor de un 6,7% del total de muertes en personas en edad reproductiva. Muchos de estos pacientes mueren a pesar de estar recibiendo tratamiento antimicrobiano. Entre las causas por las cuales se suceden estos decesos están las fallas en el diagnóstico oportuno y adecuado (debido a la poca sospecha clínica por parte del personal médico), la selección y efectividad del tratamiento antituberculoso escogido, el incumplimiento o abandono del tratamiento indicado por parte del paciente o a la presencia de micobacterias multi-resistentes a las drogas [9,10,11]. Se conoce que algunos de los pacientes incluidos como casos dentro del programa de control de tuberculosis, por ser baciloscopía positivos, no responden adecuadamente al tratamiento (resistencia primaria).

Otro grupo de micobacterias, las denominadas no tuberculosas (MNT), juegan un papel importante como causantes de infecciones en el humano, produciendo algunas de ellas sintomatología similar a la producida por el *M. tuberculosis*. Las MNT son ubicuas, generalmente se encuentran en muestras ambientales como el suelo, agua potable y aguas servidas, en agua usada en duchas y soluciones quirúrgicas, en leche y como flora bacteriana de animales domésticos, etc. La transmisión persona-persona es muy rara y se adquieren generalmente por inhalación o ingestión. Se les consideran agentes oportunistas y con frecuencia son resistentes a la mayoría de los agentes antituberculosos lo que hace más complicado su tratamiento médico [12,13,14]. La incidencia de las enfermedades causadas por estas micobacterias aún no está bien estudiada en la mayor parte del mundo, pero en general no se observa el mismo patrón de prevalencia en los diferentes países. Por ejemplo, en la India, *M. tuberculosis* es la causa principal de infecciones micobacterianas y la proporción de MNT es considerablemente baja [13], mientras que en los Estados Unidos y otros países desarrollados los más frecuentes son *M. avium*, *M. kansasii* y *M. fortuitum* [15]. En el Reino Unido, *M. kansasii* es la MNT predominante en las infecciones respiratorias en Gales e Inglaterra, mientras que *M. malmoense* es la más común en Escocia. En un estudio realizado en España, la infección causada por *M. kansasii* fue la de mayor prevalencia seguida de la infección por el complejo *M. avium*. [14]. No se conoce la prevalencia de infección por micobacterias no tuberculosas en Venezuela.

Entre las principales especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) involucradas en infecciones en el humano, están las micobacterias de crecimiento lento, no pigmentadas y pertenecientes al Complejo *Mycobacterium avium*

(CMA) donde se incluyen al *M. avium* y al *M. intracellulare*, entre otras cepas aún no bien clasificadas. Este complejo es el más común de las especies MNT asociadas con enfermedad en el humano y son naturalmente resistentes a las drogas antituberculosas. Las infecciones producidas por micobacterias del CMA son comunes en bronquitis crónicas, bronquiectasias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica y linfadenitis [13,14]. En 1992, los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos registraron un aumento significativo en el porcentaje de infecciones por micobacterias no tuberculosas, especialmente por *M. avium* [15].

Otras especies como *M. kansasii* son causa común de infección pulmonar crónica semejante a la tuberculosis, aun cuando pueden afectar otros sistemas u órganos. Ocupan el segundo lugar, luego del CMA, entre las infecciones micobacterianas oportunistas asociadas con SIDA. También, en estos pacientes, el *M. marinum* puede producir lesiones cutáneas, luego del contacto con aguas contaminadas, las cuales pueden confundirse con sarcoma de Kaposi's y esporotricosis [14, 15].

Entre las micobacterias de crecimiento rápido capaces de producir enfermedad en el humano están el grupo *M. fortuitum*, grupo *M. chelonae-abscessus*, y el grupo *M. smegmatis*. Previo a los estudios moleculares, los grupos *M. chelonae-abscessus* y *M. fortuitum* fueron considerados como subespecies o biovariantes respectivamente, actualmente se consideran especies separadas [16]. Estas micobacterias son consideradas como patógenos humanos y pueden causar enfermedad tanto en personas sanas como en inmunocomprometidas. Aunque la infección diseminada es rara, en la actualidad existen reportes de este tipo de afección en pacientes con VIH/SIDA. Otros factores predisponentes para una infección diseminada, son: la presencia de enfermedades de base como linfoma, leucemia, hemodiálisis asociada con falla renal, así como el uso de medicamentos inmunosupresores [13,16,17,18,19]. La enfermedad más común asociada con estos complejos son las infecciones de los tejidos blandos como resultado de la inoculación directa de material contaminado. Entre el 60-80% de los casos de infecciones posquirúrgicas, así como las relacionadas con el uso de catéteres, son debidas a estos grupos [13].

La amplia presencia de las micobacterias como agentes patógenos, amerita la implementación de métodos de aislamiento e identificación factibles de ser usados oportunamente y que permitan obtener resultados en corto tiempo, para así poder administrar el tratamiento médico adecuado. La principal limitante de los métodos tradicionales de laboratorio para la detección e identificación de micobacterias, es el tiempo mínimo requerido (entre 3 a 8 semanas) para la obtención de resultados confiables. Esto ha llevado a la necesidad de implementar nuevas estrategias para disminuir el tiempo necesario para el diagnóstico microbiológico final de la muestra clínica [20, 21].

La técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias de ADN especie específicas, ha sido usada para la identificación de las micobacterias. Se han utilizado diferentes blancos moleculares pre-

sentés en el genoma del género *Mycobacterium* que codifican para la proteína de 32 KDa [22], para la ARN polimerasa *rpoB* [23], el ARN ribosomal 16S [24,25] y la proteína de 65 KDa [26,27], así como secuencias nucleotídicas exclusivas del complejo tuberculoso como las secuencias de inserción *IS6110* [28,29], y como secuencias aparentemente únicas de *M. tuberculosis* la secuencia *mtp40* [30, 31]. La PCR se ha utilizado en combinación con hibridación molecular [29] o digestión enzimática (PRA) [32] para la identificación de especies de micobacterias presentes en muestras clínicas [26]. La correlación entre las pruebas de identificación microbiológica y de biología molecular a partir de muestras clínicas está aun en etapa de validación [33,34,35]. Es por ello que nos propusimos realizar esta investigación, dirigida a detectar, aislar e identificar por técnicas microbiológicas las micobacterias que pudiesen estar infectando a pacientes con tuberculosis o donde se sospeche su presencia y una vez aisladas comparar la identificación microbiológica con la identificación por biología molecular.

Materiales y Métodos

Muestras

Para realizar éste trabajo, se estudiaron 256 muestras clínicas de diferentes procedencias (lavado bronquial, biopsia de tejido, esputo, orina, pus de abscesos, heces, biopsias, sangre, líquidos corporales, médula ósea), las cuales fueron procesadas en un tiempo no mayor de 24-48 horas una vez recibidas. Las muestras clínicas fueron obtenidas de pacientes hospitalizados en los Servicios de Neumonología y de Enfermedades Infecciosas del Adulto del Hospital Universitario de Caracas durante los años 1998-2000, así como de pacientes ambulatorios que fueran referidos a nuestra Sección en el mismo período de tiempo.

Estudios bacteriológicos

De cada muestra recibida se realizaron frotis para las coloraciones de Gram y Ziehl-Neelsen. Las muestras se sometieron al proceso de descontaminación y homogenización, según el método de Petroff [36] y se cultivaron en el medio de Löwenstein Jensen (tres tubos), incubándolos a temperatura ambiente, a 37°C, y a 42 °C. Los cultivos se observaron por un período de siete días, hasta un máximo de sesenta días. En aquellas muestras con crecimiento bacteriano presuntivo de micobacterias se estudiaron los siguientes parámetros: Aspectos macroscópicos de las colonias (morfología, fotocromogenicidad), aspectos microscópicos del cultivo (coloraciones), determinación de las características del cultivo (tiempo y temperatura óptima de crecimiento) y pruebas bioquímicas convencionales para la determinación de especie (catalasa a temperatura ambiente, a 68°C y semi-cuantitativa, niacina, reducción de nitratos, tolerancia al NaCl al 5%, hidrólisis Tween-80, arylsulfatasa, ureasa, crecimiento en MacConkey sin cristal violeta, captación de hierro y reducción del telurito), todas estas pruebas se realizaron de acuerdo a las reco-

mendaciones convencionales [6,20,32,36,37]. En base a estas pruebas se identificaron como:

a. *M. tuberculosis* las que dieron positivas para niacina, catalasa a temperatura ambiente, tolerancia a NaCl al 5% y reducción de nitratos y catalasa a 68 °C negativa.

b. *M. chelonae* con pruebas positivas para catalasa a temperatura ambiente y 68°C, arylsulfatasa (3 días), crecimiento en McConkey sin cristal violeta, y reducción de telurito y negativas la producción de pigmento, reducción de nitratos, tolerancia a NaCl 5%, hidrólisis de Tween-80, hidrólisis de la urea y captación de hierro.

c. *M. marinum*: pruebas positivas para catalasa temperatura ambiente y 68°C, producción de pigmento luego de fotoinducción, hidrólisis de Tween-80, hidrólisis de la urea, reducción de telurito y negativas la producción de pigmento en oscuridad, niacina, tolerancia a NaCl 5%, arylsulfatasa (3 días), crecimiento en McConkey sin cristal violeta y captación de hierro, con velocidad de crecimiento rápido (6 días).

d. *M. fortuitum*: pruebas positivas para catalasa a temperatura ambiente y 68°C, reducción de nitratos, tolerancia a NaCl 5% e hidrólisis de tween 80, arylsulfatasa (3 días), hidrólisis de la urea, crecimiento en McConkey sin cristal violeta, captación de hierro y reducción de telurito y negativa la producción de pigmento, con una velocidad de crecimiento rápida (20, 36, 37, 38).

Como controles de crecimiento se utilizaron las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. smegmatis* 1008 (gentilmente donada por el Dr. Arend Kolk del Royal Tropical Institute, Ámsterdam, Holanda) y *M. africanum* ATCC 35711, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*. (Gentilmente proporcionadas por la Dra. Marta I Guerrero de Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de tuberculosis de Colombia. Bogota DC, Colombia).

Estudios de Biología Molecular

Con la finalidad de evaluar la eficiencia y utilidad de la técnica de PCR para la identificación de micobacterias, se estudiaron un total de 16 aislados micobacterianos, los cuales fueron analizados en la Sección de Biología Molecular de Agentes Infecciosos (IME) sin conocer la identificación microbiológica. Se usaron como controles positivos para la identificación, las micobacterias de referencia: *M. africanum* ATCC 35711, y otras de la colección de micobacterias del Laboratorio Nacional de Referencias de Tuberculosis de Colombia (Bogota, Colombia): *M. tuberculosis* H37Rv-TMC 102, *M. avium*, *M. terrea*, *M. triviale*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. nonchromogenicum*, *M. flavescens*. También se utilizó la *M. scrofulaceum* 9801809 gentilmente proporcionada por la Dra. Sofia Toro del Instituto Nacional de Higiene (Caracas, Venezuela) y *M. avium intracelular* de la Sección de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical (Caracas, Venezuela).

Aislamiento del material genético (ADN) de las cepas bacterianas

Se tomaron 10 o más colonias de los aislados y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga con 500 µl de amortiguador TE 1X (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.0). Las células se inactivaron a 100°C por 20 minutos y se les añadió lisozima a una concentración final de 200 µg/ml, incubándose por una hora a 37°C. Finalizada la incubación, se les agregó SDS (dodecil sulfato de sodio) y proteinasa K, a concentraciones finales de 1% y 250 µg/ml respectivamente, incubándose por 10 minutos a 60°C. Una vez ajustada la concentración a 1.5 M de NaCl y 1% de la solución CTAB/NaCl, se les extrajo el ADN con un volumen igual de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a temperatura ambiente por 5 minutos a 12.000 x g. Se recuperó la fase acuosa y se precipitaron los ácidos nucleicos con 0,6 volúmenes de isopropanol, por 30 minutos a -20°C, para luego centrifugarla por 15 minutos a temperatura ambiente a 12.000 x g. El precipitado se lavó con una solución de etanol frío al 70% para remover residuos de CTAB y NaCl y se centrifugó a 12.000 x g por 5 minutos, eliminando cuidadosamente el sobrenadante. El ADN se resuspendió en 100-150 µl de amortiguador TE y se estimó la concentración mediante la absorbancia a 260 nm/280nm. El ADN así obtenido se guardó a -20°C hasta ser utilizado en la reacción de amplificación.

Reacción de polimerización en cadena (PCR)

Se utilizaron como blancos moleculares para PCR varias secuencias nucleotídicas presentes en el género de las micobacterias: la secuencia IS6110 (presentes en el complejo *M. tuberculosis*), *mtp40* (presente en *M. tuberculosis*) y *hsp65* (presente en las micobacterias, nocardias y actinomicetes). Los oligonucleótidos empleados, la secuencia a amplificar y el tamaño del producto de PCR, así como el protocolo de amplificación y el análisis de polimorfismo de restricción (PRA) son los descritos previamente [29,30,31]. Además, se usó el método de Wong y col., [33] que se basa en la amplificación por PCR de un fragmento del gen *hsp65* seguido del análisis de restricción usando las enzimas de restricción *Sau96I* y *CfoI*.

Análisis de restricción de los productos de PCR

Los productos de la reacción de amplificación y digestión se visualizaron utilizando electroforesis en geles planos de agarosa al 1.2 y 4% p/v en TBE 1X (0.1 M Tris HCl, 0.09 M ácido bórico, 0.0001 M EDTA, pH 8.4). El ADN fue visualizado usando bromuro de etidio y bajo luz ultravioleta. El análisis de restricción se realizó siguiendo el protocolo descrito por Telenti y col., [32]. Los patrones de digestión obtenidos con las enzimas *BstEII* y *HaeIII* se

analizaron utilizando el programa de Equipo BIORAD Gel Doc Quantity One 4.1 y se ingresaron a la base de datos PRASite del Instituto Pasteur, Francia, para identificar la especie por comparación mediante el cálculo del índice de similitud entre el patrón ingresado y los disponibles en la base de datos PRASite: <http://www.hospvd.ch:8005> (acceso realizado Julio 25, 2002).

Resultados

Se estudiaron un total de 256 muestras clínicas (Tabla 1) procedentes de 188 pacientes, hospitalizados o ambulatorios, que fueron referidos de diferentes centros hospitalarios de la ciudad de Caracas, con tuberculosis o sospecha clínica de tuberculosis.

Tabla 1. Tipos de muestras estudiadas.

Muestras	Nº
Espuito	82
Orina	25
Biopsias de piel	6
Otras biopsias *	21
Líquidos corporales**	16
Sangre	20
Líquido cefalorraquídeo	16
Secreciones y/o abscesos	43
Lavado bronquial	10
Lavado gástrico	6
Medula ósea	9
Heces	2
Total	256

* Mesenterio, tejido blando, óseo, pared abdominal; ** pleural, ascítico, articular.

Del total de muestras, 24 (9,37 %) fueron baciloscopia positivas. En el 100% de éstas se logró el aislamiento de bacilos ácido alcohol resistentes, los cuales fueron posteriormente identificados bacteriológicamente como: *M. tuberculosis* (17 muestras); *M. chelonae* (4) 1 *M. marinum* (1), MNT no identificadas (2) y *Nocardia braziliensis* (2), aisladas en las muestras 58 y 61. En las restantes 232 muestras, que fueron baciloscopia negativas, se obtuvieron 17 (7,32%) aislados que correspondieron a: *M. tuberculosis* (8) y 9 MNT, que fueron identificadas como: *M. chelonae* (2), *M. marinum* (3), *M. fortuitum* (3), y 1 MNT que no se pudo identificar bioquímicamente. Los datos se resumen en la Tabla 2.

Cuando desglosamos los aislamientos obtenidos de acuerdo al tipo de muestra, observamos que de 22 muestras de origen respiratorio, aislamos 17 *M. tuberculosis* (16 muestras BK+ y 1 muestra BK-), y otros 5 aislados correspondieron a MNT (5/22): 4 muestras baciloscopia negativa y una baciloscopia positiva

Tabla 2. Identificación microbiológica de los aislados micobacterianos.

N° de aislados	Muestra N°	Tipo de muestra	Coloración ZN	Crecimiento/ Identificación Bioquímica
1	1	Lavado bronquial	+	<i>M. tuberculosis</i>
2	12	Lavado bronquial	-	MNT (no identificado)
3	18	Lavado bronquial	+	<i>M. tuberculosis</i>
4	26	Biopsia de absceso en tórax	-	<i>M. marinum</i>
5	44	Biopsia de piel región inguinal	-	<i>M. tuberculosis</i>
6	58	Absceso en el muslo	+	<i>M. chelonae,</i>
7				<i>N. brassiliensis</i>
8	61	Absceso abdominal	+	<i>M. chelonae,</i>
9				<i>N. brassiliensis</i>
10	64	Biopsia de piel región inguinal	-	<i>M. tuberculosis</i>
11	75	Líquido articular	-	<i>M. tuberculosis</i>
12	106	Biopsia de ganglio	+	<i>M. tuberculosis</i>
13	112	Biopsia de pleura	-	<i>M. tuberculosis</i>
14	137	LCR	-	<i>M. tuberculosis</i>
15	142	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
16	144	Secreción de ulcera en la mano	-	<i>M. marinum</i>
17	159	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
18	160	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
19	161	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
20	164	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
21	166	Secreción de ulcera en la mano	-	<i>M. marinum</i>
22	167	Secreción de absceso en la axila	-	<i>M. tuberculosis</i>
23	168	Absceso de cuello	-	<i>M. tuberculosis</i>
24	169	Secreción absceso de muslo	+	<i>M. chelonae</i>
25	180	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
26	181	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
27	182	Lavado gástrico	+	<i>M. tuberculosis</i>
28	186	Espuito	-	<i>M. fortuitum</i>
29	188	Espuito	-	<i>M. fortuitum</i>
30	220	Espuito	-	<i>M. fortuitum</i>
31	211	LCR	-	<i>M. tuberculosis</i>
32	241	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
33	266	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
34	273	Absceso abdominal	-	<i>M. chelonae</i>
35	277	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
36	283	Secreción de nódulos en muslo	-	<i>M. chelonae</i>
37	289	Espuito	+	MNT (no identificado)
38	290	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
39	291	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
40	295	Secreción de absceso en mano	+	<i>M. marinum</i>
41	298	Absceso abdominal	+	<i>M. chelonae</i>
42	304	Espuito	+	<i>M. tuberculosis</i>
43	312	Secreción nódulo en mano derecha	+	MNT(no identificado)

ZN: coloración de Ziehl-Neelsen, MNT: micobacteria no tuberculosa

Con respecto a las 19 muestras de origen no respiratorio se aislaron 8 *M. tuberculosis*: 7 fueron baciloscopia negativa y solo una baciloscopia positiva. De las restantes 11 muestras: 6 fueron MNT baciloscopia positiva y 5 bacilos-

copia negativa. En dos de estas muestras se encontró coinfección con *M. chelonae* y *N. brassiliensis*. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Aislamientos de micobacterias de acuerdo al tipo de muestras.

Tipo Muestra	Aislados				Otros Microorganismos/ BK+
	MT/BK+	MT/BK-	MNT/BK+	MNT/BK-	
Respiratorias / 22	16	1	1	4	
No respiratorias / 19	1	7	6	5	
Total	41	17	8	9	2

MT: *M. tuberculosis*, BK+: baciloscopia positiva, BK-: baciloscopia negativa, MNT: micobacteria no tuberculosa.

En resumen se obtuvieron 43 aislados de los cuales 25 (58,14%) fueron *M. tuberculosis* y 16 (37,2%) micobacterias no tuberculosas, además del aislamiento de 2 Nocardias.

Adicionalmente, y con la finalidad de analizar la utilidad de la PCR para la identificación de micobacterias, se estudiaron por este método, y sin conocer los resultados de la identificación bioquímica, 16 aislados identificados bioquímicamente como: 12 *M. tuberculosis*, 3 *M. chelonae*, y 1 *M. marinum*. Se amplificó la secuencia *IS6110* y *mtp40* del complejo tuberculosis en 12 de los 12 aislados de *M. tuberculosis*, confirmando la identificación bioquímica. De

los 3 aislados de *M. chelonae*, 2 fueron identificados mediante PCR como *M. chelonae tipo I* (N° 58 y N° 61). Además, se determinó la coinfección de *M. chelonae tipo I* y *M. tuberculosis* en estas muestras. El otro aislado, el cual fue identificado bioquímicamente como *M. chelonae*, se identificó como *M. gordonae tipo 8*. Para la identificación correcta del aislado de *M. marinum* se requirió la amplificación de otro segmento diferente del gen *hsp65* y posterior digestión con las enzimas de restricción *Sau96I* y *CfoI* (Tabla 4). En conclusión la correlación entre la identificación por métodos bioquímicos y moleculares en los aislados estudiados fue de un 93%.

Tabla 4. Resultados de la amplificación por PCR de los aislados de micobacterias.

N° de aislado	Fuente	N° IMT / Identificación	Identificación molecular: Secuencia nucleotídica		
			<i>IS6110</i>	<i>mtp 40</i>	Gen <i>hsp65</i> -PRA
1	SEMAI	1/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
2	IMT	18/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
3	IMT	44/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
4	IMT	58/ <i>M. chelonae</i> <i>N. brassiliensis</i>	Positivo	NR	<i>M. chelonae tipo I</i> Coinfección
5	IMT	61/ <i>M. chelonae</i> <i>N. brassiliensis</i>	Positivo	NR	<i>M. chelonae tipo I</i> Coinfección
6	IMT	75/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
7	IMT	106// <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
8	IMT	112/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
9	IMT	137/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
10	IMT	142/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
11	IMT	161/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
12	IMT	164/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
13	IMT	182/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
14	IMT	241/ <i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
15	IMT	295/ <i>M. marinum</i>	Negativo	NR	<i>M. marinum</i> *
16	IMT	298/ <i>M. chelonae</i>	Negativo	NR	<i>M. gordonae tipo IV</i>

SEMAI: Sección de Biología Molecular de Agentes Infecciosos, IMT: Instituto de Medicina Tropical, NR: No Realizado, *confirmado mediante la amplificación de varios blancos moleculares.

Discusión

El presente estudio se realizó con el objeto de establecer la presencia de *M. tuberculosis* o de micobacterias no tuberculosas como agentes causales de enfermedad en una muestra de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis. También estaba dirigido a evaluar la capacidad de identificar las micobacteria utilizando para ello herramientas moleculares. Uno de los principales logros del presente trabajo fue demostrar que hay un alto porcentaje (37%) de pacientes con infección por MNT en la población analizada.

Las MNT a nivel mundial se han considerado como agentes causantes de un gran número de infecciones pulmonares o no pulmonares, así como de infecciones diseminadas, tanto en individuos inmunocompetentes, como en pacientes con compromiso inmunológico [14,39,40]. Sin embargo, la presencia de estas micobacterias como flora habitual del medio ambiente hace difícil determinar la importancia médica de un resultado de cultivo positivo para MNT a partir de una de una muestra clínica. Por ello se requiere y recomienda para el correcto diagnóstico el aislamiento de la MNT a partir de varias muestras clínicas del mismo paciente. En la práctica clínica, implicarlos como el agente causal de enfermedad en pacientes inmunocompetentes, es más difícil, ya que se asume en forma generalizada que estas micobacterias son agentes infecciosos poco frecuentes en esta población. Su presencia como microorganismos colonizantes es aún discutida, ya que no se sabe con exactitud cual es el tipo de interacción que se establece entre el huésped y la micobacteria. Esta interacción debe ir mas allá de una simple colonización, ya que la exposición al MNT produce una respuesta de hipersensibilidad intermedia a la proteína purificada derivada (PPD) por reacción cruzada contra los antígenos comunes presentes en todas las micobacterias [41].

Las infecciones causadas por MNT han aumentado a nivel mundial, y las razones de este incremento no son muy claras. Entre los argumentos están: una mayor eficiencia de los laboratorios para aislar e identificar este tipo de micobacterias y un aumento en la susceptibilidad de la población debido a un incremento en numero de individuos inmunosuprimidos y sobrevivientes con enfermedades debilitantes susceptibles a este tipo de agentes oportunistas [42]. En el presente trabajo un 37.2% de los aislados correspondieron a MNT, un valor mucho mayor que lo reportado para otros países [13,14,42,43,44,45,46,47] y probablemente un valor mayor a lo estimado. Una de las posibles causas del resultado obtenido se deba a la realización de varios cultivos a diferentes condiciones de temperatura optimizándose al máximo las capacidades del diagnóstico bacteriológico. Este alto porcentaje obtenido advierte la necesidad de incluir el aislamiento e identificación de MNT como parte de la rutina de diagnóstico micobacteriológico. Para lograr esto se requiere a) un mayor conocimiento por parte del médico tratante sobre las posibilidades de infección por MNT en nuestra población y b) incrementar la capacitación del personal del laboratorio en cultivo e identificación de micobacterias.

Dentro de los métodos de diagnóstico de la tuberculosis, la baciloscopia es el método más usado dentro de los programas de control de la tuberculosis, ya que se le considera el mejor y el más rápido para detectar los casos bacilíferos, que representan los de mayor riesgo de transmisión e infección para la comunidad. Sin embargo, es el menos sensible de los métodos, ya que se requieren entre de 10^3 a 10^5 microorganismos/ml de muestra para obtener un resultado positivo. En este estudio logramos diagnosticar 24 casos bacilíferos (baciloscopia positiva) de los cuales 17 fueron obtenidos a partir de muestras de origen respiratorio. Estos pacientes hubiesen sido considerados como casos de tuberculosis dentro del Programa Nacional de Control de la tuberculosis por ser baciloscopia positivos y se les hubiese iniciado tratamiento antituberculoso, sin embargo, una vez aisladas e identificadas las micobacterias, 16 correspondieron a *M. tuberculosis* y una MNT.

Las otras 7 muestras con baciloscopia positiva, correspondieron a muestras de origen extrapulmonar, se aisló en solo una de ellas *M. tuberculosis*. En los otros 6 casos se aislaron e identificaron MNT. Este resultado demuestra la presencia de micobacterias no tuberculosas como agentes causales de infección respiratoria o asociadas a lesiones en la piel, muchas veces no sospechadas por el clínico y por ende no aislados e identificados los microorganismos por el laboratorio.

Desafortunadamente y posiblemente por razones de índole operacional y/o económicas, es política de la Coordinación Nacional de Salud Respiratoria incluir como caso de tuberculosis a los pacientes con muestras clínicas positivas al microscopio, iniciándoles tratamiento antituberculoso en base a esta prueba diagnóstica. No se realiza el cultivo de rutina a los casos BK positivos y en muchos estados del país no se realiza el cultivo como herramienta diagnóstica. Esto significa que algunos casos de infección por MNT son tratados con drogas antituberculosas convencionales, las cuales no necesariamente producen adecuada respuesta terapéutica. Especialmente en aquellos casos en los cuales el tratamiento antituberculosos inicial no produce la respuesta deseada, debe sospecharse también la posibilidad de infección por MNT. Lo ideal sería poder cultivar todos los casos bacilíferos y hacer la identificación de las micobacterias y las pruebas de susceptibilidad a drogas dentro de la rutina del programa. En otros países las muestras referidas para el diagnóstico de tuberculosis o micobacteriosis son procesadas mediante el examen directo (la baciloscopia) y detección de especies mediante sondas o amplificación de ácidos nucleicos en las muestras directamente y en todos los casos se realiza el cultivo [21,46], como parte de la rutina de los laboratorios encargados del diagnóstico de tuberculosis. Una vez obtenido el cultivo, éste se subcultiva para pruebas tanto bioquímicas de identificación y resistencia, como para el análisis molecular con varios blancos específicos de género, especie y grupo.

Además, de las muestras baciloscopia negativa, crecieron 17 aislados, de los cuales 8 fueron *M. tuberculosis* y 9 correspondieron a MNT. Cinco [5] de estos pacientes presentaron sintomatología respiratoria, aislándose en solo uno de ellos *M. tuberculosis* y los otros fueron 4 MNT. Las

micobacterias aislada en 3 de estos casos fue *M. fortuitum*, una micobacteria de crecimiento rápido no pigmentada, clasificada dentro del grupo IV de Runyon, capaz de producir infección respiratoria. En otros estudios realizados [30,40,41,42] *M. fortuitum* no es el agente más común, pero se le han atribuido infecciones pulmonares fatales [43]. Es importante destacar que este microorganismo suele ser resistente a algunas de las drogas usadas contra *M. tuberculosis* [42], por lo que el patrón de susceptibilidad a drogas debe ser determinado antes de aplicar tratamiento. Nuestros resultados demuestran que las micobacterias no tuberculosas pueden ser agentes causales de sintomatología respiratoria, y permite suponer que algunos pacientes sintomáticos respiratorios crónicos, no son tratados adecuadamente, ya que el médico orienta su diagnóstico con la baciloscopía y no se busca o solicita la realización del cultivo. Esto evidencia la posibilidad de un subdiagnóstico y por ende un subregistro de infección respiratoria por MNT en nuestro país.

A partir de las muestras extrapulmonares con baciloscopía negativa (9/16) se logró aislar y hacer la identificación bacteriológica: 6 fueron *M. chelonae*, 4 de *M. marinum*, y 1 MNT no identificados, además en dos muestras se encontró coinfección con *N. brassiliensis*, lo cual hace más difícil el diagnóstico y la selección del adecuado tratamiento y señala nuevamente la importancia de la realización del cultivo como método de diagnóstico bacteriológico definitivo.

Se requiere cada vez más la identificación de este grupo de bacterias y la determinación de sus patrones de resistencia, para lograr el adecuado diagnóstico. Son necesarios estudios de prevalencia a la infección por MNT en la población venezolana. En otro trabajo realizado por nosotros recientemente, también aislamos e identificamos diferentes MNT a partir de tejidos provenientes de pacientes que fallecieron con diagnóstico presuntivo de tuberculosis o sin causa etiológica [46], lo que argumenta aun más la urgencia con la que deben ser respondidas las necesidades antes señaladas.

Adicionalmente, nuestro trabajo permitió verificar la utilidad de las técnicas moleculares, ya que en el 100% de los aislados identificados bioquímicamente como *M. tuberculosis*, que fueron estudiados por PCR se corroboró su identificación. De las secuencias utilizadas, la *IS6110* ha sido ampliamente usada como blanco de amplificación y en la identificación de micobacterias pertenecientes al Complejo de *M. tuberculosis*, ya que está presente en forma repetida en el genoma de estas bacterias, y la secuencia *mtp40* esta presente como copia única en *M. tuberculosis*, ambas blancos son buenos candidatos para la identificación de *M. tuberculosis*. En cuanto a los aislados de MNT que fueron analizados con PCR y PCR-PRA, fueron correctamente identificados 3 de los 4 aislados ensayados. El aislado N° 16 identificado bioquímicamente como *M. chelonae*, por PCR se identificó como *M. gordonae* tipo IV. Para aclarar esta discrepancia se requiere la realización de la amplificación de otras secuencias blanco. El laboratorio de micobacterias debe esforzarse en proporcionar resultados confiables en el menor tiempo posible, para lo

cual debe combinarse necesariamente la identificación bioquímica con métodos moleculares, ya que estos últimos requieren para su realización de tiempos menores (4-5 horas) y comienzan a usarse en otros laboratorio en el mundo como parte de la rutina diagnóstica. En nuestro caso se requiere utilizar estas metodologías en un mayor número de muestras para establecer el porcentaje de correlación entre estas pruebas moleculares y las bioquímicas convencionales.

Financiamiento

Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico – UCV, número 09-34-4003-97 y parte proporcionados por el Proyecto Agenda Salud FONACIT número 98-003363.

Referencias

- [1] Avilan Y, Rodríguez N, Fernández BC. Tuberculosis en el Tercer Milenio. Arch Hosp Vargas 2000; 44:168-79.
- [2] Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis: Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic. JAMA 1995; 273:220-26.
- [3] Boletín Epidemiológico OPS. Tuberculosis. 2000; 21:12-13.
- [4] Anuarios de Estadística y Epidemiología Vital 2003; Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Venezuela.
- [5] World Health Organization. WHO Report 2005; Geneva: World Health Organization; 2005. Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing; pp. 1–258.
- [6] Hale YM, Pfyffer GE, Salfinger M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons earned. Clin Infect Dis 2001; 33:834-46.
- [7] Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, Dormandy J, Mirabello L, Polletta VL y col., Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2218-25.
- [8] Parsons LM, Somoskovi A, Urbanczik R, Salfinger M. Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. Front Biosci. 2004; 9:2086-105.
- [9] Salfinger M. Role of the laboratory in evaluating patients with mycobacterial disease. Clin Microbiol Newsletter 1995; 14:108-10.
- [10] Enarson DA. Failure of Diagnosis: a key in indicator in quality assurance of tuberculosis control. Tubercule 1995; 76:279-280.
- [11] Greenberg AE, Lucas S, Tossou O, Issa-Malik C. Autopsy-proven causes of death in HIV-Infect patients treated for tuberculosis in Abidjan, Cote D'Ivoire. AIDS 1995; 9: 1251-54.
- [12] Wolinsky E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. Clin Infect Dis 1992; 15:1-2.
- [13] Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res 2004; 120:290-304.
- [14] García JM, Palacios GJJ, Sánchez AAA. Respiratory infections caused by environmental mycobacteria. Arch Bronconeumol 2005; 41: 206-19.
- [15] Benson CA. *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex diseases in patients with HIV infections. Curr Opin Infectious Disease 1994; 7:95-107.
- [16] Wallace RJ Jr, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschern JA, Stone MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. Rev Infect Dis 1983; 5:657-79.

- [17] Horsburgh CR Jr. *Mycobacterium avium* Complex in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1991; 324:1332-38.
- [18] Ingram Ch W, Tanner DC, Duranck DT, Wallace KG Jr., Corey R. Disseminate infection with rapidly growing Mycobacteria. Clin Infect Dis 1993; 16(4):463-71.
- [19] Sack JB. Disseminated infection due *Mycobacterium fortuitum* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis 1990; 12: 961-63.
- [20] Kiehn TE. The diagnostic mycobacteriology laboratory in the 1990s. Clin Infect Dis 1993 Suppl 2:S447-54.
- [21] Witebsky FG, Conville PS. The Laboratory diagnosis of Mycobacterial infectious disease. Infect Dis Clin North Am 1993 7(2):359-76.
- [22] Soini H, Bottger EC, Viljanen MK.. Identification of Mycobacteria by PCR based sequence determination of the 32 Kilodalton protein gene. J Clin Microbiol 1994; 32:2944-47.
- [23] Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. J Clin Microbiol 2000; 38:2966-71.
- [24] Patel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. J Clin Microbiol 2000; 38:246-51.
- [25] Kox LF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM, Kolk AH. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. J Clin Microbiol 1995; 33:3225-33.
- [26] Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D, Raugier J, y col. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol 1989; 3:843-49.
- [27] Brisson-Noel A, Azar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli y col. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet 1991; 338:364-66.
- [28] Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in Diagnosis. J Clin Microbiol 1990; 28:2668-73.
- [29] Kolk AH, Noordhoek GT, de Leeuw O, Kuijper S, van Embden JD. Mycobacterium smegmatis strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. J Clin Microbiol 1994; 32:1354-6.
- [30] Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. J Clin Microbiol 1991; 29:2163-68.
- [31] Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J Clin Microbiol 1996; 34:933-8.
- [32] Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993; 31:175-8.
- [33] Wong DA, Yip PC, Cheung DT, Kam KM. Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex species, and other commonly isolated mycobacteria. J Clin Microbiol 2001; 39:3768-71.
- [34] Coussin D, Francis B, Dawson D. Multiplex PCR provides a low-cost alternative to DNA probe methods for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol 1996; 34:2331-33.
- [35] Morán MC, Aceves D, Peña PM, Gallegos MP, Fores SE, Montoya H, y col. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del nor-occidente de México. Rev Panam Salud Publica 2000; 7: 389-94.
- [36] Kantor IN. Bacteriología de la Tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud 1985. Centro Panamericano de Zoonosis.
- [37] Valdivia J, Ferra C, Jiménez C, Mederos L, Montero E, Díaz R, Echemendia M. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la tuberculosis y otras micobacteriosis. Laboratorio Nacional de referencia e Investigaciones en Tuberculosis, 1994. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Habana, Cuba.
- [38] Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC. Two Laboratory collaborative studies on identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol 1996; 34:296-303.
- [39] Lessing MP, Walker MM. Fatal pulmonary infection due to *Mycobacterium fortuitum*. J Clin Pathol 1993; 46:271-2.
- [40] Jesudason MV, Gladstone P. Non tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens at a tertiary care hospital in South India. Indian J Med Microbiol 2005; 23:172-5.
- [41] Crespo M^a del P, Corral R, Alzate A. Micobacterias no tuberculosas en personas VIH positivas y en personas sin factores de riesgo a la infección. Colombia Médica 1997; 28:136-44.
- [42] Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville-Dufaux M y col. Spanish Group for Non-Tuberculosis Mycobacteria. patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. Int J Tuberc Lung Dis 2004;8:1186-93.
- [43] Somoskovi A, Mester J, Hale YM, Parsons LM, Salfinger M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Clin Chest Med 2002; 23:585-97.
- [44] Barnes AI, Rojo S, Moretto H. Prevalence of mycobacteriosis and tuberculosis in a reference hospital, Cordoba province Rev Argent Microbiol 2004; 36:170-73.
- [45] Sungkanuparph S, Sathapatayavongs B, Prachartam R. Infections with rapidly growing mycobacteria: report of 20 cases. Int J Infect Dis 2003; 7:198-205.
- [46] Sungkanuparph S, Sathapatayavongs B, Prachartam R. Rapidly growing mycobacterial infections: spectrum of diseases, antimicrobial susceptibility, pathology and treatment outcomes. J Med Assoc Thai 2003; 86:772-80.
- [47] Correa de Adjunian MF, Hernández C, Alveárez O, Gonzáles-Rico S, Pedroza, R, Céspedes G y col. Micobacterias en muestras de autopsia. Rev Soc Ven Microb 2004; 240:8-11.