

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

**Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y
Micobacterias**

**Evaluación de las técnicas "GenoType *Mycobacterium* CM y AS" para la
identificación rápida de micobacterias no tuberculosas en Cuba.**



AUTOR: Lic. Misleidis Sardiñas Aragón

Trabajo de Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología

LA HABANA

2018

Año 60 de la Revolución



Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

**Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y
Micobacterias**

**Evaluación de las técnicas "GenoType *Mycobacterium* CM y AS" para la
identificación rápida de micobacterias no tuberculosas en Cuba.**

AUTOR: Lic. Misleidis Sardiñas Aragón

TUTORES: Lic. Lilian M Mederos Cuervo, MSc.

Lic. Raúl Díaz Rodríguez, DrC.

ASESORAS: Dra. María R. Martínez Romero, MSc.

Lic. Dihadenys Lemus Molina, DrC.

Trabajo de Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología

LA HABANA

2018

Año 60 de la Revolución



Los Laboratorios son los templos del futuro, de la riqueza y del bienestar

Es allí donde la humanidad, crece, se fortalece y se hace mejor.

Louis Pasteur.

A mis padres, hijo y esposo que son mi razón de ser.

AGRADECIMIENTOS

El mayor agradecimiento es para mis padres y esposo por darme apoyo, amor, cariño y la fuerza para seguir adelante con mis estudios. A mi hijo por tener la paciencia de esperar por mí cada vez que me necesitaba.

A mi tío Felito que aunque hoy no está entre nosotros siempre me intensivo para que siguiera estudiando y estuvo siempre pendiente a mi superación.

A mis primas, primos y demás familiares que me brindaron su apoyo incondicional, sobre todo en los momentos difíciles.

A mi tutora Lili que siempre me ha guiado y me ha brindado su experiencia, apoyo y dedicación desde que comencé en este instituto, ahora por ayudarme a realizar esta investigación, por sus consejos, por ser más que una tutora.

A mi tutor Raul que aunque siempre muy ocupado por ser el jefe de laboratorio me ayudo a culminar este trabajo.

A mi amiga Grechen que gracias a ella no deje la carrera y no hubiera sido posible que estuviera hoy discutiendo esta tesis.

A Rosy por ser más que mi asesora en esta investigación, por toda su ayuda y por dedicar su tiempo de su entretenimiento de juego en la guagua camino a casa y venida al trabajo revisando parte de mí documento.

A mi asesora y compañera Dihadenys por tener siempre tiempo para explicarme cada vez que tuve duda en mi investigación.

A María de los Angeles que siempre me oriento y me brindo su cariño todo los años que estuvimos trabajando juntas y después de jubilada.

AGRADECIMIENTOS

A Ana María, Mirian y Iraida por sus consejos y ayuda que siempre me han brindado.

A Miguelito por brindarme su experiencia y sabiduría en todos estos años de trabajo.

.A mis compañeras y amigas de la carrera de tecnología de la salud y después de la maestría, Yanaika, Oderay, Yaisel, Dianeya, Yani, Emidalys, Naifi, José por estar siempre a mi lado.

A mis compañeras de la maestría que no son trabajadoras de nuestro centro Naty, Irina y a los extranjeros chinos Lei Fu y Zexi Tan, por siempre tener su apoyo siempre que los necesite.

Un agradecimiento especial a mis compañeros del Departamento de Bacteriología-Micología” que de una forma u otra han tenido que ver con mi superación profesional.

A todos mis profesores del IPK y del pediátrico del Cerro, no hubiera sido posible llegar donde estoy, sin sus enseñanza y dedicación.

A todos los que aportaron su granito de arena para que yo culminara este trabajo.

Gracias

En los últimos años las infecciones ocasionadas por micobacterias no tuberculosas (MNT) han tenido un incremento notable en varias regiones del mundo, asociado fundamentalmente a infecciones en individuos inmunocomprometidos. El objetivo de este estudio fue evaluar las técnicas moleculares GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS para la identificación de MNT en Cuba y su comparación con las pruebas fenotípicas convencionales. Se emplearon 12 cepas de referencia y 52 aislados clínicos referidos al Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI-TBLM) del IPK, en el periodo abril 2017 - abril 2018. Por las técnicas GenoType *Mycobacterium* CM y AS se identificaron correctamente las 12 cepas de referencia utilizadas. Por técnicas convencionales, las especies más predominantes fueron *Mycobacterium fortuitum* (36,54%) y Complejo *avium-intracellulare* (34,61%). Se hallaron cuatro aislados de *M. simiae*, especie poco frecuente. Al comparar la identificación por pruebas moleculares y convencionales se obtuvo una concordancia de 87,5%. Las técnicas GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS constituyen herramientas adecuadas para la identificación rápida de micobacterias en un Laboratorio Nacional de Referencia por su baja complejidad, tiempo de ejecución corto y precisión en los resultados.

	Paginas
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. MARCO TEÓRICO	5
III.1 Antecedentes Históricos	5
III.2 Generalidades	5
III.3 Estructura celular de las micobacterias	7
III.4 Micobacterias no tuberculosas (MNT)	8
III.5 Micobacteriosis	10
III.6 Epidemiología de las MNT	12
III.7 Diagnóstico de laboratorio	12
III.7.1 Baciloscopía	12
III.7.2 Cultivo	13
III.7.3 Métodos de diagnóstico automatizados	14
III.8 Identificación convencional de las MNT	15
III.9 Análisis del perfil lipídico	16
III.10 Técnicas moleculares para la identificación de micobacterias	16
III.10.1 Sondas de ácidos nucleicos	17
III.10.2 Técnicas de amplificación	17
III.10.2.1 PCR y análisis de restricción(PCR-RFLP o PRA)	17
III.10.2.2 PCR-Secuenciación de ADN de la subunidad ribosomal 16S.	18
III.10.2.3 PCR-Hibridación en fase sólida	19
III.10.2.4 Amplificación y detención en tiempo real	20
III.11 Espectrometría de masa	21
III.12 Identificación de MNT en Cuba	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
IV.1 Cepas de referencia	24
IV.2 Definición del universo y muestra estudio	25
IV.3 Identificación de las MNT	25
IV.3.1 Preparación de la muestra	25
IV.3.2 Pruebas de Identificación Convencional	25
IV.3.2.1 Preparación del inóculo	25
IV.3.2.2 Pruebas bioquímicas	26

IV.3.3 Pruebas de Identificación molecular	26
IV.3.3.1 Extracción de ADN	26
IV.3.3.2 Reacción de amplificación	27
IV.3.3.3 Hibridación	28
IV.3.3.4 Evaluación e Interpretación de Resultados	28
IV.4 Procesamiento de los datos	29
IV.5 Análisis de la información	29
IV.6 Aspectos éticos	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	48
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
IX. ANEXOS	

Las micobacterias están presentes en la naturaleza, muchas de estas especies han sido aisladas de diversos nichos ecológicos, se encuentran distribuidas ampliamente en el medio ambiente (suelo, agua) y en animales como; aves, cerdos y humanos. Hasta ahora se han descrito más de 150 especies, alguna de ellas son saprófitas y otras son patógenas o se comportan como patógenas oportunistas¹.

Las micobacterias no tuberculosas (MNT), llamadas también micobacterias atípicas (MA) o micobacterias ambientales u oportunistas (MAO) son aquellas especies no pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) o complejo *Mycobacterium leprae*. Estas son agentes causales de severas patologías que afectan pulmones (preferiblemente), glándulas linfoides, piel, heridas, huesos. Las principales especies que aparecen como causa de infección en humano son el complejo *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* y el complejo *M. fortuitum-chelonae*².

Las infecciones causadas por MNT representan entre 30-50% del total de las enfermedades provocado por el género *Mycobacterium* en humanos, por lo que muchas de estas especies han sido reconocidas como agentes etiológicos tanto en infecciones pulmonares como extrapulmonares. Las infecciones ocasionadas por MNT han tenido un incremento en los últimos años y se asocia a que existe una elevada morbilidad y mortalidad sobre todo en individuos con inmunidad local o sistémica alterada, tal como los pacientes con Virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Por otro lado, se han desarrollado técnicas diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad que ha permitido mejorar la identificación de este tipo de infección³⁻⁶.

La identificación tradicional de las MNT se basa en el análisis de las características fenotípicas (biológicas y bioquímicas) tales como: morfología, velocidad de crecimiento, producción de pigmento, actividad de ciertas enzimas y la utilización de algunos sustratos. Muchas de estas técnicas requieren de varias semanas para obtener sus resultados, y algunas no permiten la diferenciación de miembros pertenecientes a un mismo complejo ⁷.

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de identificación diagnóstica, basándose en las características genotípicas. Estas pruebas no solo son más rápidas, sino también más precisas, ya que no dependen de las condiciones ambientales. Entre los métodos moleculares se destacan los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), los cuales presentan una alta sensibilidad y especificidad. En 1993, Telenti y colaboradores, implementaron con éxito una técnica llamada Análisis de Restricción de productos de PCR (PCR-RFLP o PRA, por sus siglas en inglés), la cual se basa en la digestión con enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*) del producto de amplificación del gen *hsp65* y el cálculo de su(s) talla(s) molecular(es). El algoritmo usado por estos autores permitió la identificación de 34 especies diferentes de micobacterias ⁸.

El ensayo GenoType *Mycobacterium* CM (Hain Lifescience, Nehren, Alemania) es una nueva herramienta para la identificación de micobacterias. La prueba se basa en una PCR, dirigida a una región del gen que codifica para el ARNr 23S, seguido de hibridación reversa y tecnología de sonda en línea. Esta técnica permite la diferenciación rápida y confiable de las micobacterias, ya que genera un patrón específico para cada especie, lográndose una identificación rápida, y por tanto, la aplicación oportuna del tratamiento específico. Con esta

metodología, es posible la identificación de las 24 especies de micobacterias más aisladas en humanos. La empresa Hain Lifescience dispone también de un ensayo GenoType *Mycobacterium* AS para las identificaciones de otras MNT, menos frecuentes, no detectadas con el sistema GenoType *Mycobacterium* CM⁹⁻¹¹.

En estudios recientes en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI-TBLM) aplicando las técnicas convencionales, se ha apreciado un incremento significativo de los aislados de MNT; sin embargo, estas infecciones no representan un problema de salud en Cuba¹²⁻¹⁴. Investigaciones previas con la técnica PCR-RFLP (realizadas también en el LNRI-TBLM), han demostrado la utilidad de esta metodología molecular, pero finalmente no se ha podido introducir en el diagnóstico de rutina¹⁵.

Debido a la demora del diagnóstico convencional para diferenciar las MNT se hace necesario la introducción de nuevas metodologías que aporten mayor rapidez para la identificación de especies lo cual podría repercutir positivamente en la correcta y oportuna aplicación del tratamiento. Esto motivó la realización del presente estudio que tuvo como objetivo evaluar por primera vez en Cuba las herramientas de diagnóstico molecular GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS para la identificación de MNT aisladas de muestras clínicas.

1. Evaluar las técnicas moleculares GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS para la identificación de MNT en Cuba.
2. Describir la frecuencia de aislados de MNT de importancia médica en el período de estudio.
3. Comparar los resultados de los métodos moleculares y convencionales en la identificación de especies de MNT.

III.1 Antecedentes Históricos

El primer microorganismo patógeno descubierto en humanos, perteneciente al género *Mycobacterium* fue *M. leprae* en 1874 por el médico noruego Armauer Hansen, y de su nombre se derivó el término de enfermedad de Hansen para denominar dicha enfermedad ¹⁶.

Poco después, en 1882, Robert Koch, bacteriólogo alemán, fue el primer científico que logro aislar y teñir al agente causal de la tuberculosis (*M. tuberculosis*), este fue denominado “Bacilo de Koch” ¹⁷.

Luego de este hallazgo, y gracias al desarrollo alcanzado por la bacteriología, se hizo posible el descubrimiento de otras especies pertenecientes al mismo género, entre las que podemos citar: *M. smegmatis* (1889), *M. phlei* (1899), *M. marinum* (1926), *M. fortuitum* (1938), *M. avium-intracellulare* (1951), *M. kansasii* (1955), *M. simae* (1965), *M. bovis* (1970), *M. szulgai* (1972), *M. malmoense* (1977) *M. gordonae* (1984), *M. celatum* (1993), *M. intermedium* (1993), *M. conspicuum* (1995), *M. lentiflavum* (1996) y *M. ulcerans* (1998) ¹⁸⁻²⁴.

III.2 Generalidades

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomicetales*, comprende únicamente el género *Mycobacterium*. Estas presentan características que las distinguen del resto de las bacterias: su estructura particular y composición química de su pared ²⁵.

El género incluye más de 150 especies que han sido divididas en tres grupos con fines didácticos: *Complejo tuberculosis*, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*,

(incluida *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* (causante de enfermedad en cabras) y *M. pinnipedii*, (enfermedad en focas) *Complejo lepra*, que incluye *M. lepraemurinum* y *M. leprae*, agentes etiológicos de la lepra en ratón y hombre, respectivamente, por último las micobacterias atípicas o MNT, donde se ubican todas las especies que no están comprendidas en los dos grupos anteriores. Estas últimas pueden ser patógenas, patógenas oportunistas o saprófitas. En las MNT existen especies que comparten características bioquímicas, serológicas y patogénicas por lo que se agrupan y se identifican como complejos: Complejo MAI, Complejo *M. fortuitum-chelonae* y Complejo *M. terrae*^{25, 26}.

Las MNT se pueden dividir en dos grandes grupos atendiendo a la velocidad de crecimiento: micobacterias de crecimiento rápido y de crecimiento lento. El primer grupo produce, bajo condiciones óptimas de temperatura y nutrición, colonias densamente visibles sobre medio sólido en un período de siete días, mientras que las de crecimiento lento requieren una semana o más bajo condiciones similares¹.

Morfológicamente, son bacilos delgados de forma recta o ligeramente curvos, aerobios, inmóviles, no formadores de esporas, tienen una longitud de 1-4 micrómetros, y un ancho de 0,2-0,6 micrómetros. Son difíciles de teñir con la tinción de Gram, aunque se consideran débilmente grampositivos. Resisten la decoloración con alcohol clorhídrico al 3%, de ahí que se denominan bacilo ácido alcohol resistente (BAAR). Son sensibles al calor húmedo y destruido por las temperaturas de pasteurización²⁷.

La temperatura ideal para su crecimiento es de 32 a 37°C, y su pH óptimo está entre 6,5 – 6,8. En general, las micobacterias varían mucho en su morfología, desde formas cocoides a largos filamentos, ocasionalmente forman ramificaciones verdaderas que se observan en cultivos enriquecidos. La mayoría de las especies de este género forman más de una clase de colonias, pueden ser rugosas, color hueso crema, elevadas convexas y de bordes irregulares (*M. tuberculosis*); lisas y transparentes, con bacilos sin agrupaciones discernibles (Complejo *MAI*), o de aspereza intermedia (*M. kansasii*). Las micobacterias son más resistentes a la desinfección con productos químicos probablemente como consecuencia de su pared lipídica hidrófoba. Tienen una velocidad de crecimiento mucho menor que el resto de las bacterias, con un tiempo de duplicación celular de 16 a 20 horas por lo que en algunos casos se requiere de hasta seis semanas para observar los primeros indicios de colonias²⁸.

III.3 Estructura celular de las micobacterias

Poseen una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico que supone 60% del peso seco de la misma. Esta pared consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina o glicina en el caso de *M. leprae*. Esta capa da rigidez y forma a la bacteria. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Estos últimos, son ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el factor cordón (trehalosa 6,6-dimicolato) y por mucósidos²⁹.

En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos ³⁰.

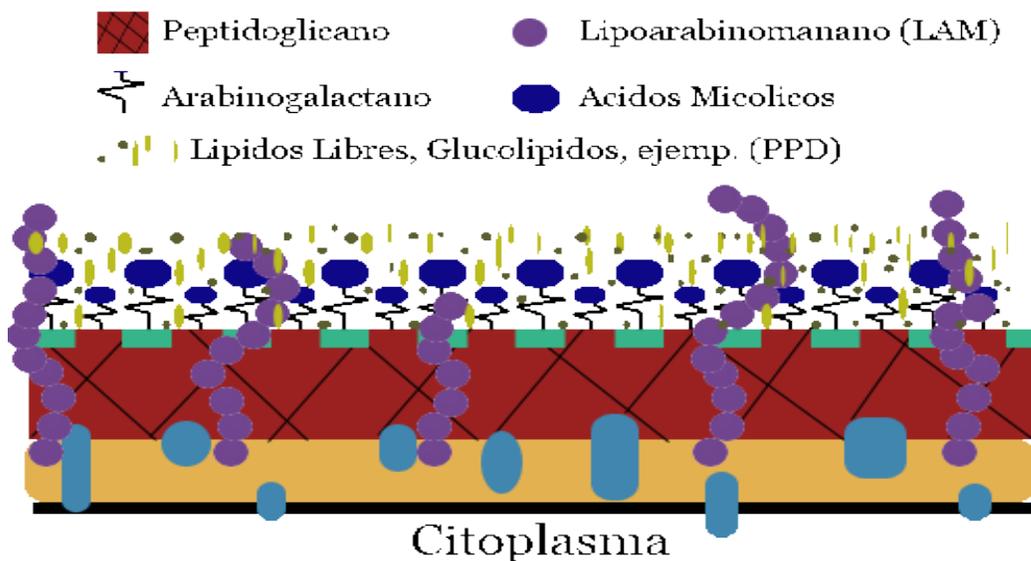


Diagrama de la Pared Celular Micobacteriana. Adaptado de <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>

III.4 Micobacterias no tuberculosas (MNT)

Paralelamente a los hallazgos de *M. tuberculosis* como agente causal de la TB, comenzaron a emerger evidencias de la existencia de otras infecciones provocadas por otras especies micobacterianas. La historia ha demostrado que estas especies no pertenecientes al complejo tuberculoso comienzan a

reconocerse casi simultáneamente con el descubrimiento del bacilo de Koch. Esto lo demuestra algunas de las diferentes denominaciones que han recibido estas especies; Moeller (1899) nombró a estas especies bacilos seudotuberculosos; Borrel y Marmoreck (1901) las denominó bacilos paratuberculosos; Timpe y Runyon (1954) micobacterias atípicas; Runyon (1959) micobacterias anónimas; Wolinsky, en 1979, micobacterias no tuberculosas; Wayne y Sramek (1992) *Potentiality pathogenic enviromental mycobacteria*. Posteriormente se acordó que el término que mejor se adecuaba era el de MAO²⁶.

En 1998, se publicaron unas recomendaciones para referirse a este grupo micobacteriano en las que se acordó que el término que mejor se adecuaba era el de micobacterias ambientales. Así, las especies de los complejos *M. tuberculosis* y *M. leprae*, dado que no se aíslan del ambiente, quedarían fuera de esta clasificación^{25,26, 31}. En los años recientes se ha adoptado el nombre de micobacterias no tuberculosas (MNT)¹.

Probablemente, el primer caso registrado de infección por una MNT fue en 1897 con la descripción por Albert Cook de úlceras cutáneas progresivas en pacientes en Uganda. Cincuenta años después, aparece una nueva enfermedad micobacteriana en humanos reportada en Bairnsdale, un distrito de Australia con el aislamiento y la identificación del *M. ulcerans*³².

Según la clasificación de Runyon las MNT se identifican basándose en dos simples parámetros; la producción o no de pigmento y el tiempo de crecimiento, quedando clasificadas en cuatro grupos³³.

La importancia de las infecciones por MNT está en relación con el mejor entendimiento de su cuadro clínico, sus mecanismos patogénicos, el desarrollo de métodos diagnósticos y las características del huésped en los últimos años, especialmente cuando su sistema inmune está alterado. Sin lugar a dudas, las MNT han venido adquiriendo más relevancia en el campo de la Salud Pública mundial, debido principalmente al incremento de su frecuencia como agentes causales de severas patologías, particularmente en pacientes inmunocomprometidos ^{34, 35}.

Consecuentemente, el interés de la comunidad científica por estos microorganismos ha crecido en forma radical actualmente, lo que ha permitido conocer los diversos aspectos asociados a las patologías que ocasionan y a sus factores de virulencia ³⁶.

III.5 Micobacteriosis

Las MNT se comportan como; patógenos obligados, patógenos oportunistas y saprófitos. Las infecciones que producen pueden ser tanto pulmonares como extrapulmonares y se denominan Micobacteriosis ³⁷.

Por otra parte, es realmente poco lo que se ha logrado establecer respecto a las formas de contagio. Se piensa que no son transmitidas de persona a persona, sino por ingestión de alimentos contaminados, inhalación de aerosoles o situaciones iatrogénicas. El incremento en la frecuencia de las enfermedades provocadas por MNT tiene actualmente su fundamento en la mayor virulencia de las micobacterias y en el crecimiento del número de individuos inmunocomprometidos, como

aquellos infectados por VIH; sin embargo, también se debe tomar en cuenta que ahora se dispone de técnicas más específicas y sensibles para identificar a estos microorganismos ³⁸⁻⁴⁰.

Entre los tipos de patologías causados por MNT figuran la neumonía, linfadenitis, infecciones diseminadas asociadas a deficiencia inmunitaria de tipo celular, enfermedad de Crohn, y, con menor frecuencia, las infecciones de la piel, osteomielitis, otitis media e infecciones en heridas y en las incisiones por donde se insertaron catéteres. Las manifestaciones clínicas implicadas dependen del órgano afectado, aunque suelen presentarse síntomas inespecíficos tales como fiebre persistente, sudores nocturnos, anemia, pérdida de peso, anorexia, diarrea, mialgia y adenopatía ^{38, 41}.

Dentro de las especies de MNT aisladas con mayor frecuencia están el *Complejo MAI*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. kansasii* y *M. chelonae*. La especie que produce enfermedad con mayor frecuencia en los pacientes con infección por el VIH es el complejo *MAI*. Esta enfermedad aparece en fases muy avanzadas de la infección por el VIH, concentrándose de forma casi exclusiva en el grupo de pacientes con recuentos de linfocitos T CD4+ inferiores a 200 cél/mL-1 ^{42,43}. Estudios han demostrado que en los pacientes sin tratamiento antirretroviral, las micobacteriosis diseminadas son más frecuentes, mientras que en los pacientes que reciben tratamiento la infección tiende a ser más localizada ⁴⁴.

III.6 Epidemiología de las MNT

Actualmente, existen más de 150 especies de MNT. Es evidente que ha habido un incremento dramático reciente en el número de especies y en la cantidad de especies significativas clínicamente ¹. Las micobacteriosis se han observado en la mayoría de los países industrializados; la incidencia varía de 1,0 a 1,8 casos por 100,000 habitantes ⁴⁵.

Las MNT se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son muchos los ambientes de los que se les puede aislar, animales vertebrados, invertebrados y domésticos, pero principalmente del agua. También se ha aislado en pantanos, piscinas, acuarios, peceras, grifos y desagües e incluso máquinas de hielo. Como no se ha podido demostrar que las MNT se transmitan de persona a persona y se aíslan en muestras de piel, aparato respiratorio o tubo digestivo de individuos sanos, se supone que la colonización o infección por estos microorganismos tiene un origen ambiental. Las especies de MNT presentan variaciones en su distribución geográfica en función de su capacidad de sobrevivir en las diferentes condiciones ambientales, lo que se refleja en las infecciones causadas tanto en humanos como en animales ^{46,47}.

III.7 Diagnóstico de laboratorio

III.7.1 Baciloscopía

La baciloscopía es una técnica sencilla, rápida y económica para el diagnóstico microbiológico. Esta permite valorar la calidad de las muestras, identificar los pacientes más contagiosos, y además resulta útil para monitorear la respuesta al

tratamiento antimicobacteriano. Esto la ha hecho una técnica muy útil por más de un siglo, ofreciendo valiosos resultados en un gran número de casos, aunque presenta una sensibilidad menor al cultivo, porque para que sea positiva necesita de 5000 a 10000 bacilos/mL^{48,49}.

Las técnicas de coloración se han mantenido sin modificaciones en el tiempo, pues estos microorganismos son difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales, debido a que son BAAR. La tinción de Ziehl- Neelsen es la variante más usada en el diagnóstico rutinario. Su sensibilidad es de 74% y la especificidad de 98%^{50,51}.

Las micobacterias tienen la capacidad de unir en su superficie sustancias fluorescentes como la auramina y rodamina. Esta característica ha permitido que puedan observar con el microscopio de fluorescencia, emitiendo una fluorescencia amarillo o naranja, dependiendo del filtro utilizado. Actualmente, también se utiliza con muy buenos resultados para el diagnóstico micobacteriano, la microscopía de fluorescencia LED, la misma usa un sistema de iluminación basado en la luz emitida por un diodo, con un tiempo de vida útil de hasta diez mil horas y no libera productos potencialmente tóxicos si se rompen. La OMS ha evaluado la eficacia de este método que mostró una sensibilidad mayor comparada con otras microscopías convencionales de luz o fluorescentes, y recomienda en un futuro el reemplazo de las técnicas tradicionales por esta tecnología^{52,53}.

III.7.2 Cultivo

El aislamiento micobacteriano a partir de muestras clínicas continúa siendo fundamental para el diagnóstico, pues el examen de cultivo es capaz de detectar poca concentración bacilar (10-100 bacilos/mL) por lo que lo hace más sensible

que la baciloscopía. Además, permite el aislamiento de las micobacterias para la identificación de la especie del agente causal, y posteriores estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos, así como la monitorización del tratamiento y curación del paciente. El cultivo tiene la limitación del tiempo prolongado de crecimiento de las micobacterias retrasando la toma de decisiones clínicas adecuadas. El medio de cultivo sólido más utilizado en los laboratorios de micobacteriología es el Löwenstein-Jensen ⁵⁴.

III.7.3 Métodos de diagnósticos automatizados

Los medios líquidos son medios enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y más rápidamente que los medios sólidos. Por ello, se aconseja incluirlos siempre para el aislamiento primario de muestras clínicas, como base para diversas pruebas de identificación bioquímica y de sensibilidad a los antimicrobianos. Estos también se utilizan para diferentes sistemas diagnósticos automatizados como son: ⁵⁵⁻⁵⁷

- ✓ BACTEC MGIT 960: método fluorométrico basado en la utilización de un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona adicionado al medio líquido Middlebrook 7H9. Bajo la luz ultravioleta el crecimiento se aprecia mediante la visualización de un brillo color anaranjado fluorescente en la superficie, y en el fondo del tubo como consecuencia del consumo de O₂.
- ✓ BacT/ALERT 3D: Sistema automatizado de cultivo colorimétrico que detecta la producción de CO₂ como indicador de crecimiento bacteriano. El medio utilizado es el básico Middlebrook 7H9 suplementado con factores de

crecimiento y una solución antibiótica para las muestras de origen no estéril.

- ✓ BACTEC serie 9000: Se trata de un sistema automatizado de hemocultivos convencionales que mediante un software y un medio de cultivo específico, se utiliza para la detección de micobacterias.

III.8 Identificación convencional de las MNT

Actualmente se sigue utilizando la clasificación de las MNT realizada por Runyon, en 1959. Esta clasificación toma en cuenta las características de las colonias: la pigmentación en presencia y ausencia de luz, así como la velocidad de crecimiento, que sirvió como criterio de división en cuatro grupos: I fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmento), II escotocromógenas (forman pigmento en presencia o ausencia de luz), III no cromógenas (nunca desarrollan pigmento) y IV de crecimiento rápido (donde se incluyen las especies de crecimiento rápido) ³³.

Las pruebas fenotípicas-bioquímicas conforman diversos protocolos de identificación que cada laboratorio pone en práctica de acuerdo a sus disposiciones. Estas son: termo-estabilidad de la catalasa a 68°C, reducción de nitratos a nitritos, ureasa, hidrólisis de tween 80, tolerancia al cloruro de sodio 5%, pirazinamidasasa, arilsulfatasa, toma de hierro y reducción de telurito de potasio. Estas técnicas tienen el inconveniente de que para obtener sus resultados, algunas demoran varias semanas, retardando el tiempo diagnóstico y el comienzo del tratamiento específico ^{58,59}.

III.9 Análisis del perfil lipídico

El análisis de la composición lipídica por varios procedimientos cromatográficos también es reconocido como una herramienta útil para diferenciar especies de micobacterias. Se ha señalado el valor del estudio de los ácidos micólicos por cromatografía en capa delgada como primer paso en la identificación de MNT como son: cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Esta última, HPLC en fase reversa de los ésteres de ácidos micólicos, ha demostrado ser un método rápido, reproducible y específico para la identificación de especies micobacterianas, lográndose una especificidad y sensibilidad elevada. Estas técnicas se basan en las diferentes solubilidades de los componentes entre dos fases: hay una fase estacionaria (líquida o sólida) y una móvil (gaseosa o líquida), que varían de constitución según el método cromatográfico utilizado ³⁰.

III.10 Técnicas moleculares para la identificación de micobacterias

En los últimos años, con los avances en la biología molecular se abrieron nuevas posibilidades para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre ellas las producidas por el género *Mycobacterium*, lo que ha permitido la detección y caracterización de estos microorganismos en menor tiempo y ha generado un importante avance en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad⁶⁰.

Los métodos moleculares ofrecen varias ventajas sobre las técnicas convencionales para la detección e identificación rápida de aislados del complejo

Mtb y de otras micobacterias, como son: corto tiempo para obtener resultados, confianza y reproducibilidad. El uso de estos métodos moleculares mejora el manejo del paciente y han sido recomendados por la OMS. Las deficiencias de la técnica están en los riesgos de contaminación cruzada y que no resulta de utilidad en el control de tratamiento, ya que no distinguen entre bacilos vivos y muertos ⁶¹.

III.10.1 Sondas de ácidos nucleicos

Desde los años 90, aparecieron sondas comerciales de ADN no radiactivas (AccuProbe, GenProbe Inc., San Diego, Estados Unidos) que permiten identificar por hibridación con el ARN ribosómico (ARNr) micobacteriano, de forma rápida (2 h) y específica el complejo *M. tuberculosis*, Complejo MAI, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*. Estas sondas se pueden aplicar sobre los cultivos obtenidos tanto en medios sólidos como líquidos. Así mismo, ofrecen la posibilidad de utilizarlos en medios líquidos con contenido hemático, siendo necesario a una pequeña preparación previa mediante concentración y lavado con una solución detergente (dodecil sulfato sódico y EDTA) ⁶².

III.10.2 Técnicas de amplificación

III.10.2.1 PCR y análisis de restricción (PCR-RFLP o PRA)

Este método se basa en la amplificación de un fragmento 441 pb del gen de la proteína de choque térmico *hsp65* (presente en todas las especies de micobacterias), por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido por la digestión de los productos amplificados con dos enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*. Los productos de la reacción de digestión son separados y visualizados por

electroforesis en gel de agarosa. Los patrones generados pueden ser comparados con patrones disponibles en una base de datos para la identificación de especies; también llamado sitio PRA, con perfiles para casi todas las especies micobacterianas^{63,64}.

Con esta tecnología se consigue una identificación rápida, precisa y económica de las MNT en los laboratorios clínicos. Aunque existen otras técnicas similares (vg., PCR-RFLP del 16S-23S), ésta es, actualmente, la mejor desarrollada, con una aplicación práctica de indudable valor. A título de ejemplo, se puede obtener el resultado final en la misma jornada laboral. Además, la experiencia acumulada en diversos centros, con una amplia relación de los polimorfismos encontrados en las distintas cepas analizadas, se encuentra reflejada en una página web (www.hospvd.ch/prasite/), en donde se pueden llevar a cabo y consultar los patrones obtenidos, así como intercambiar experiencias con diversos expertos en dicho método. Gracias a esto, se conoce que la técnica es lo suficientemente discriminatoria para diferenciar las especies y subespecies de los diversos complejos micobacterianos, e incluso dentro de las especies consideradas clásicamente homogéneas y en las que recientemente se ha descrito su heterogeneidad, como en *M. kansasii*⁶⁵.

III.10.2.2 PCR-Secuenciación de ADN de la subunidad ribosomal 16S

La secuenciación automática con iniciadores marcados con fluoresceína representa un avance sustancial, solucionando la identificación de muchos microorganismos que, por métodos convencionales, es imposible. Esta técnica representa el patrón de referencia de las identificaciones genotípicas, con la mayor

base de datos disponible en la actualidad (GenBank/Entrez, <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Aunque existen diversos trabajos que propugnan su aplicación en la práctica diaria, sigue siendo un método caro y laborioso, que quedaría limitado a los laboratorios de referencia de países de ingresos altos. No obstante, los avances tecnológicos son constantes y la mayor automatización con los nuevos secuenciadores capilares o la aparición de *microchips* de secuenciación del ADN podrían suponer una alternativa potencial en el futuro ^{66, 67}.

III.10.2.3 PCR- Hibridación en fase sólida

Se trata de una prometedora tecnología en pleno desarrollo, basada en sondas cortas de ADN específicas de especie y presentadas en formatos más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc) y otros de futura aplicación como son los microchips (APEX, Nanogen, Inc./Becton Dickinson Microbiology Systems). En una sola prueba, se aplicaría el producto de amplificación sobre diversas sondas de los microorganismos más frecuentemente aislados y con importancia clínica.

Actualmente, se disponen de varios sistemas comercializados: "INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics NV, Ghent, Bélgica), y los *GenoType MTBC/ GenoType Mycobacterium CM* y *GenoType Mycobacterium AS* (Hain Lifesciences, Nehren, Alemania). El "INNO- LiPA" v2, tiene como diana de amplificación un fragmento del gen que codifica para los 16S-23S del ARNr e incluye 16 sondas diferentes que permiten la identificación del complejo *Mtb* y de 16 las especies de MNT de mayor interés clínico. *M. kansasii* (subtipos I, II y III, para el resto más *M. gastri*), *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum/ulcerans*,

M. celatum, complejo *M. avium*, *M. avium*, *M. intracellulare* (grupo 1 y 2), *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, complejo *M. chelonae* (grupo 1 y 2), complejo *M. fortuitum* y *M. smegmatis*⁶⁸.

Existen otros ensayos como los sistemas “GenoType” que amplifican el gen que codifica para el ARNr 23S. El *GenoType MTBC* diferencia los miembros del complejo *Mtb* (*Mtb*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. canetti*).

El *GenoType Mycobacterium CM* permite la identificación genética molecular simultánea del complejo *Mtb* y de 24 de las especies de MNT más comunes, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. interjectum* y *M. marinum/ulcerans*.

En cambio el *GenoType Mycobacterium AS* identifica otras especies que no están incluidas en el *GenoType Mycobacterium CM*. Este incluye: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* y *M. shimoidei*. En general, los principales inconvenientes de estos sistemas comerciales son su laboriosidad y su costo, aunque inicialmente el *GenoType* es algo más económico y versátil^{69,70}.

III.10.2.4 Amplificación y detección en tiempo real

Más recientemente, se ha comenzado a utilizar, con fines diagnósticos, la tecnología de amplificación y detección a tiempo real. Estos métodos, se basan en la realización simultánea de una amplificación de una zona diana concreta y reconocimiento de la misma mediante hibridación. Esta última se detecta y se

mide (cuantifica), mediante el uso de diversos marcadores fluorogénicos. Las mayores ventajas residen en su rapidez (3h) y las posibilidades futuras de aplicación para un amplio abanico de especies, así como la detección directa a partir de la muestra ⁷¹. En la actualidad, existen diversos sistemas de amplificación y marcaje, aunque tan sólo dos están comercializados: BDProbeTec ET (Becton Dickinson Molecular Diagnostics, EE.UU.) y Lightmix Kit for detection of *Mycobacterium spp./M. tuberculosis*.(TIM MolBio, Alemania). El BDProbeTec ET se basa en la amplificación por desplazamiento de cadenas de ADN (SDA: *Strand Displacement Amplification*, en inglés) y detección mediante transferencia de energía fluorescente. A partir de cultivo, incluye la identificación de *M. tuberculosis* complex, *M. kansasii* y *M. avium* complex. Por su parte, el sistema *Lightmix* es un PCR en tiempo real con sondas Taqman que permite la identificación de 13 especies diferentes de MNT a partir de muestras clínicas ⁷².

III.11 Espectrometría de masa

En los últimos años, la espectrometría de masa MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) ha ganado una gran reputación entre los laboratorios de diagnóstico como una herramienta rápida y "económica" para la identificación "común" de bacterias relevantes clínicamente. Se han reportado muy buenos resultados relacionados con la identificación de varias especies de *Mycobacterium*. Las limitaciones importantes del método están representadas en este momento por la necesidad de una preparación de muestra específica para micobacterias que aún no está

optimizada y la gran completitud de bases de datos ⁷³. Adicionalmente, el espectrómetro MALDI-TOF es muy costoso.

III.12- Identificación de MNT en Cuba

En Cuba, se creó el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis (actualmente LNRI-TBLM) en 1963 y desde finales de la década del 60 se vienen haciendo estudios relacionados con las MNT.

En 1971, Valdivia y cols. describieron una nueva especie de micobacteria, que denominaron *M. habana*, aislada de pacientes con enfermedad pulmonar, la cual se comprobó que estaba relacionada bioquímicamente con *M. simiae* ⁷⁴. Posteriormente, se realizaron estudios inmunológicos y quimiotaxonómicos sobre esta posible nueva especie comparada con *M. simiae* que demostraron diferencias entre estas. Sin embargo, la comunidad científica internacional considera a *M. habana* como una subespecie de *M. simiae* ⁷⁵.

En la década del 80, Valdivia y cols. analizaron aislados de MNT de pacientes sintomáticos de Ciudad de La Habana y encontraron que las especies más frecuentes fueron *M. avium-intracellulare* y el complejo *M. fortuitum* ⁷⁶. En la década del 90, Ferrá y cols., realizaron una investigación para ver las especies de MNT de importancia clínica predominantes en Cuba y observaron que las especies antes mencionadas eran también las más frecuentes en el país ⁷⁷.

Más recientemente, Mederos y cols. (2007) y Castillo y cols. (2013) ratificaron que el mayor porcentaje de aislamientos, de muestras pulmonares y extrapulmonares de pacientes inmunocompetentes e inmunodeficientes, perteneció a las especies del complejo *MAI* y complejo *M. fortuitum* ^{12,78}.

Estos estudios son de gran utilidad en los laboratorios de Micobacteriología, pues de esta forma se puede llegar a conocer cuáles son las especies de MNT predominantes en una región o país y poder establecer una vigilancia eficaz sobre este tipo de infecciones, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, grupo más vulnerables a estas infecciones ⁵⁸.

En Cuba, los primeros estudios moleculares efectuados en el LNRI-TBLM fueron dedicados al diagnóstico de *M. tuberculosis*. Posteriormente, se inició la aplicación de estas técnicas a la identificación de especies micobacterianas. En 2004, Paneque realizó una evaluación de la técnica PRA para la identificación de especies de MNT. En 2007, Yzquierdo y cols. realizaron también una investigación con la técnica PCR-RFLP en aislados de MNT y encontraron que las especies *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. fortuitum* fueron las más frecuentes. Además, estos autores recomendaron la PCR-RFLP como un método rápido, sencillo y eficaz la cual pudiera ser de gran utilidad para el diagnóstico de MNT en los Laboratorios de Referencia de países de ingresos medios ^{15, 79,80}.

Se realizó un estudio descriptivo en donde se introdujeron y evaluaron dos nuevas pruebas diagnósticas moleculares para la identificación de MNT en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI-TBLM) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) durante el período: abril de 2017 a abril de 2018.

IV.1 Cepas de referencia

En esta investigación se emplearon cepas de referencia de MNT que se listan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas de referencia de MNT utilizadas en la identificación de especie mediante pruebas convencionales y moleculares.

Especie	No. de cepa	Pruebas convencionales	Pruebas moleculares
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 15073		X
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 11440		X
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 6841		X
<i>M. fortuitum</i>	Denver Smith 6196	X	X
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 23435		X
<i>M. phlei</i>	ATCC 11758		X
<i>M. scrofulaceum</i>	Denver EW 10407	X	X
<i>M. kansasii</i>	Denver-Cape 17	X	X
<i>M. gordonae</i>	ATCC 14470		X
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 607		X
<i>M. simiae</i>	ATCC 25275		X
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv		X

IV.2 Definición del universo y muestra estudio

El universo estuvo conformado por 60 aislados de MNT obtenidos entre la sección de diagnóstico del LNRI-TBLM del IPK y los enviados para la identificación de especie de los laboratorios de TB de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) y del Hospital Neumológico “Benéfico-Jurídico” (HBJ), durante el período: febrero de 2017 a febrero de 2018.

La muestra de estudio quedó conformada por 52 aislados de MNT que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: los que no presentaron contaminación y fueron viables después de realizar el subcultivo.

IV.3 Identificación de las MNT

IV.3.1 Preparación de la muestra

Las cepas de referencia y los aislados utilizados se manipularon en una cabina de bioseguridad EuroAire TDI Modelo 425-BSC-N-1300-IIA2 (TDI, Madrid, España) y se subcultivaron en medio Löwenstein–Jensen (L-J) (**Anexo 1**), se incubaron a 37°C durante 4 semanas.

IV.3.2 Pruebas de Identificación Convencional

IV.3.2.1 Preparación del inóculo

Con un asa plástica desechable estéril se tomaron 5 asadas del crecimiento en medio L-J, y se preparó una suspensión micobacteriana con turbidez, similar al tubo 1 de la escala de Mac Farland. Posteriormente, se utilizaron 0,2 mL para la realización de la identificación.

.IV.3.2.2 Pruebas bioquímicas

En la diferenciación de especie de los aislados incluidos en el estudio se emplearon pruebas fenotípicas y bioquímicas. La identificación fenotípica se realizó mediante el uso de la clasificación de Runyon (1959), para ello se utilizó el medio L-J³³. Esta prueba consiste en determinar la velocidad de crecimiento y producción de pigmentos o fotocromogenicidad. Se incluyeron también pruebas de identificación bioquímica como: termo-estabilidad de la catalasa a 68°C, reducción de nitratos a nitritos, ureasa, hidrólisis de tween 80, tolerancia al cloruro de sodio 5%, detección de la actividad pirazinamidasa y de la arilsulfatasa, toma de hierro y reducción de telurito de potasio (**Anexo 2**). Los aislados fueron identificados utilizando las tablas de identificación (**Anexo 3**)⁵⁸.

IV.3.3 Pruebas de Identificación Molecular

Para el montaje de las pruebas genotípicas GenoType *Mycobacterium* CM (Hain Lifescience, Nehren, Alemania) y GenoType *Mycobacterium* AS (Hain Lifescience) se emplearon ADN de 12 cepas de referencia de MNT mencionadas en la Tabla 1 y se siguieron las instrucciones del fabricante^{10,11}.

IV.3.3.1 Extracción de ADN

A las cepas de referencia y los aislados se les realizó la extracción de ADN usando el sistema comercial Genolyse (Hain Lifescience) y siguiendo las indicaciones del productor⁸¹. Brevemente, se preparó una mezcla que contuvo 100 µL de solución tampón de lisis (A-LYS) y 2 µL de ADN de control interno (IC, siglas en inglés) incluido en el sistema, se agitó, se recogió la biomasa (2 asadas) y se resuspendió cada cepa o aislado en 100 µL de la mezcla, se agitó de nuevo y se incubó por 5 minutos a 95°C en un bloque térmico

SBH130D 1 (Stuart, Londres, Inglaterra). Posteriormente, se agregaron 100 μL de solución tampón neutralizante (A-NB), se agitó la preparación y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos. Se utilizaron 5 μL del sobrenadante para la amplificación de ADN.

IV.3.3.2 Reacción de amplificación

A los ADN obtenidos se les realizó una amplificación múltiple de una región correspondiente al gen que codifica para el ARNr 23S con cebadores marcados con biotina. En cada tubo de reacción se añadieron 5 μL de ADN. Todos los reactivos necesarios para la amplificación (ADN polimerasa, cebadores, MgCl_2 y dNTP) estuvieron incluidos en las mezclas de amplificación A y B (AM-A y AM-B). La composición de la mezcla de reacción consistió en: 10 μL de AM-A y 35 μL de AM-B para un volumen final de 50 μL (incluidos los 5 μL de ADN). El protocolo de amplificación consistió en: 15 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido por 10 ciclos que comprendieron 30s a 95°C y 120s a 65°C, 20 ciclos de 25s a 95°C, 40s a 50°C, y 40s a 70°C y una extensión final de 8 min a 70°C. Para la reacción de amplificación se utilizó un termociclador SpeedCycler² (Analytik Jenna, Berlin, Alemania). Como control positivo se utilizó el suministrado por el sistema comercial y como control negativo se emplearon 5 μL de agua de calidad de biología molecular.

IV.3.3.3 Hibridación

La hibridación se llevó a cabo en la plataforma de incubación en un agitador con temperatura semiautomatizado Twincubator (Hain Lifescience), que tiene incorporado el programa de agitaciones a diferentes temperaturas para cada

etapa del proceso. Inicialmente, se colocaron 20 μ L del producto amplificado con 20 μ L de solución desnaturalizante. Posteriormente, se agregó 1 mL de solución tampón de hibridación precalentado a 40°C, se mezcló y agitó suavemente, se colocó una tira identificada en cada uno de los canales. Después de la incubación por 30 minutos a 45°C se siguieron los pasos de lavado. La detección de la hibridación se realizó mediante una reacción colorimétrica que se produjo luego de añadir el conjugado y el sustrato de la enzima (fosfatasa), ambos diluidos 1/100 con solución tampón de conjugado y solución tampón de sustrato, respectivamente. Después se realizó el lavado final y las tiras se dejaron secar a temperatura ambiente.

IV.3.3.4 Evaluación e Interpretación de Resultados

Cada tira utilizada contenía 17 sondas, que incluían 3 controles cada una: 1) Control de conjugado (CC), que evaluó la unión del conjugado a la sonda y reacción del sustrato; 2) Control interno (IC, siglas en inglés), para detección de especies ricas en guanina citosina, y 3) Control de género (GC, siglas en inglés) que documenta la presencia de un miembro del género *Mycobacterium*. Con cada ensayo comercial se proporcionó una hoja de evaluación, donde se pegaron las tiras reveladas en los campos marcados y se alinearon las bandas del CC y IC con las respectivas líneas de la hoja y se almacenaron protegiéndolas de la luz. Se anotó el número de las bandas positivas en la penúltima columna, y se determinó la especie con la ayuda de la tabla de interpretación. Los nombres de las especies identificadas se registraron en la última columna. La plantilla suministrada también sirvió como ayuda para la evaluación y se alineó con las bandas IC y CC de la tira (**Anexo 4**).

Los aislados de MNT que no se identificaron en especie por el sistema GenoType *Mycobacterium* CM se investigaron mediante el ensayo GenoType *Mycobacterium* AS, que tiene incorporado otras MNT menos frecuentes. Los pasos de extracción, amplificación, hibridación, evaluación e interpretación de resultados recomendados por el fabricante son iguales que con el sistema GenoType *Mycobacterium* CM (**Anexo 5**).

IV.4 Procesamiento de los datos

Los resultados finales de la identificación convencional y molecular se introdujeron en una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel 2013 (Windows). Se realizaron las tablas y gráficos empleando el mismo programa, los resultados se presentaron en tablas de frecuencia.

IV.5 Análisis de la información

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el propósito de conocer la concordancia para las técnicas de biología molecular GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS al ser comparadas con las pruebas bioquímicas convencionales.

IV.6 Aspectos éticos

El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de Investigación-IPK (Código de aprobación: CEI-IPK 28-18). El manejo de las cepas de referencia y aislados clínicos se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad clase II EuroAire TDI Modelo 425-BSC-N-1300-IIA2 (TDI). De esta manera, se impidió la liberación de microorganismos patógenos al exterior, por lo que dicho trabajo no representó riesgos para la comunidad donde se encuentra

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

enclavado el laboratorio. El personal médico, que atendió a los pacientes con esta enfermedad, tuvo derecho a conocer los resultados derivados del diagnóstico. Los nombres de los pacientes involucrados se mantuvieron de manera confidencial. El personal encargado tiene conocimiento suficiente de las normas de bioseguridad en el manejo de micobacterias.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la evaluación de las pruebas genotípicas GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS y para ello se emplearon 12 cepas de referencia de MNT, mencionadas previamente en el acápite de materiales y métodos (**Tabla 1**).

En la **Tabla 2** se muestran los resultados de la identificación de las 12 cepas de referencia utilizando las pruebas moleculares, referidas anteriormente. Como se puede observar, nueve de ellas, se identificaron correctamente con el sistema GenoType *Mycobacterium* CM, al hibridar las bandas designadas para cada especie. Mientras que las otras tres el patrón de bandas obtenidas solo permitió corroborar la presencia de una especie del género *Mycobacterium*¹⁰.

Tabla 2. Resultados de la identificación de las cepas de referencia por las técnicas GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS en esta investigación.

Cepas de Referencia	No	GenoType <i>Mycobacterium</i> CM		GenoType <i>Mycobacterium</i> AS	
		Patrón de bandas	Identificación	Patrón de bandas	Identificación
<i>M. fortuitum</i>	4	1,2,3,7,14	<i>M. fortuitum</i>	-	-
<i>M. intracellulare</i>	1	1,2,3,9	<i>M. intracellulare</i>	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	1	1,2,3,10,16	<i>M. tuberculosis</i>	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	1	1,2,3,9,10	<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
<i>M. kansasii</i>	1	1,2,3,10,12	<i>M. kansasii</i>	-	-
<i>M. gordonae</i>	1	1,2,3,8,10	<i>M. gordonae</i>	-	-
<i>M. simiae</i>	1	1,2,3,10	<i>Mycobacterium spp</i>	1,2,3,4,6	<i>M. simiae</i>
<i>M. smegmatis</i>	1	1,2,3,10	<i>Mycobacterium spp</i>	1,2,3,6,14	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. phlei</i>	1	1,2,3,10	<i>Mycobacterium spp</i>	1,2,3,8,16	<i>M. phlei</i>

Leyenda: No = números de cepas

Como se puede observar en la Tabla 2 las cepas de referencia de *M. simiae*, *M. smegmatis* y *M. phlei* se identificaron correctamente con el empleo del ensayo GenoType *Mycobacterium* AS¹¹.

La técnica GenoType *Mycobacterium* CM permite diferenciar las 24 especies de micobacterias más frecuentes que se asocian a micobacteriosis. Todas las cepas de MNT de referencia utilizadas en esta investigación fueron identificadas adecuadamente, observándose los patrones de hibridación específicos de cada una de ellas. Esto corrobora la calidad de este sistema comercial, lo cual ha sido ya publicado por otros autores^{69,70}. Para la identificación de *M. fortuitum* como especie con el sistema GenoType *Mycobacterium* CM se emplearon cuatro cepas de referencia, pues en la tabla de interpretación del Manual de Instrucciones del ensayo se refiere que existen dos patrones de bandas diferentes para *M. fortuitum*. Esto debe estar motivado por la elevada variabilidad genética de esta especie. No obstante, en este trabajo las cuatro cepas de *M. fortuitum* mostraron el mismo patrón (1,2,3,7,14).

En esta investigación, para la evaluación del sistema GenoType *Mycobacterium* AS se incluyeron cepas de referencia de micobacterias consideradas de baja frecuencia de aislamiento en procesos patológicos, que no están incluidas en el sistema GenoType *Mycobacterium* CM (**Tabla 2**)¹⁰. Sería recomendable incluir en un próximo estudio otras especies de MNT de baja prevalencia en humanos, como: *M. haemophilum*, *M. szulgai* y *M. gastri*, y ver la precisión del ensayo GenoType *Mycobacterium* AS frente a estas MNT.

En las últimas dos décadas se han incrementado los estudios taxonómicos de las MNT. Actualmente estos estudios se realizan empleando métodos moleculares de alta resolución como secuenciación de ADN y MALDI-TOR.

A pesar de que en Cuba la identificación rutinaria de las especie de MNT se realiza por pruebas fenotípicas y bioquímicas, se han realizado estudios utilizando métodos moleculares como el PRA, el cual solo se han llevado a cabo en el marco de investigaciones puntuales.

En la **Figura 1** se muestran las especies de MNT que fueron identificadas en esta investigación por los métodos convencionales. Los mayores porcentajes correspondieron a las especie *M. fortuitum* 36,54% (19/52) y al Complejo *M. avium-intracellulare* (MAI) 34,61% (18/52).

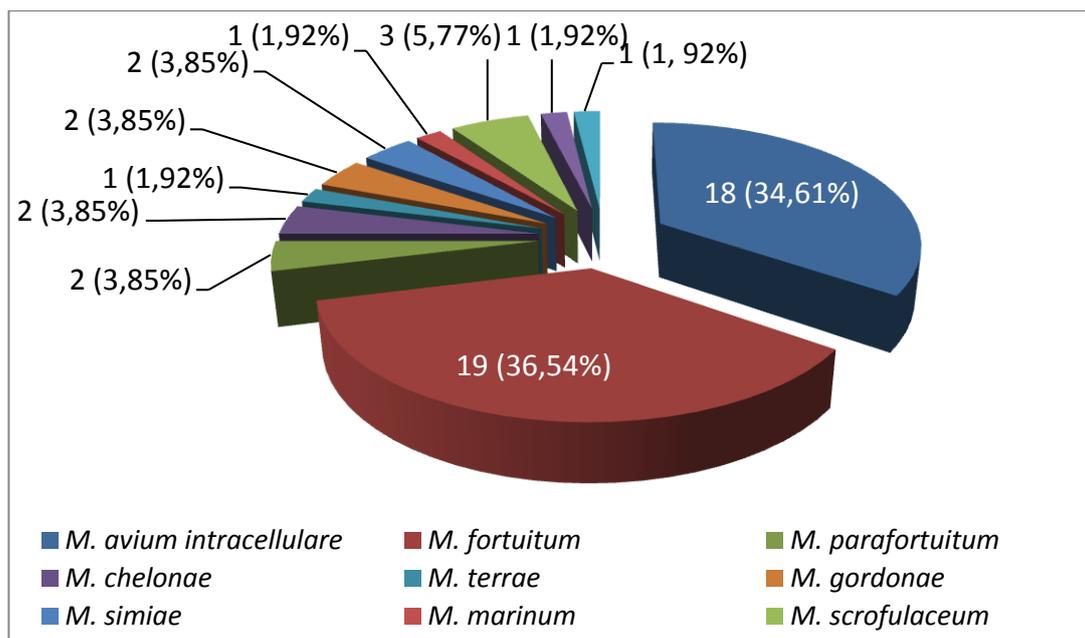


Figura 1. Frecuencia de especies de MNT identificadas por los métodos convencionales en 52 aislados clínicos obtenidos en Cuba 2017-2018.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a otros estudios realizados con anterioridad en el LNRI-TBLM. Valdivia y cols. (1985), en la

antigua provincia Ciudad de la Habana, estudiaron 200 aislados de MNT y encontraron también *M. fortuitum* y Complejo *MAI* como las especies de mayor frecuencia ⁷⁶. Ferrá y cols. (1992), analizaron 1061 aislados provenientes de los CPHEM del país durante el periodo 1985-1989 con el propósito de conocer la circulación de las MNT a nivel nacional y también observaron un predominio de estas especies ⁷⁷.

Un estudio más reciente, realizado en 2013 por Castillo y cols. para determinar la frecuencia de micobacteriosis pulmonar en pacientes con infección por VIH atendidos en el IPK, registraron como especies más predominantes a *M. fortuitum* con 18,91% y Complejo *MAI* con 16,21% ¹². Los resultados de esta investigación también son similares a los reportados por Mederos y cols. (2014), que analizaron aislados de MNT de muestras clínicas y detectaron al Complejo *MAI* (43%) entre las especies más frecuentes ¹³.

Otras investigaciones realizadas en América Latina reportaron resultados similares, como el estudio publicado por Godoy y cols. (2008) en Venezuela donde analizaron comparativamente 30 aislados por pruebas bioquímicas y genotípicas, encontrando como las especies de mayor predominio al Complejo *MAI* (21,7%) seguido por *M. fortuitum* (17,4%). Una investigación efectuada en Colombia por Montufar y cols. (2014), con el objetivo de describir las características demográficas y clínicas de pacientes hospitalizados con infecciones por MNT, hallaron con mayor frecuencia al complejo *MAI* (35,29%), *M. abscessus* (17,65%) y *M. chelonae* (11,76%). Sin embargo, los resultados obtenidos difieren de los reportados en otra región por Nasiri y cols. (2017), en Irán que analizaron 62 aislados MNT y obtuvieron mayor porcentaje de aislados de *M. simiae* (38,7%) y *M. fortuitum* (19,3%), siendo el Complejo *MAI* (8%) de

menos predominio. En algunos países del Medio Oriente, se ha registrado la presencia de *M. simiae* como una de las especies de MNT más prevalentes, lo cual pudiera estar relacionado con las características del área geográfica evaluada ^{7,82-84}.

Estudios a nivel mundial han demostrado que las especies pertenecientes al complejo *MAI* y *M. fortuitum* son las de mayor incidencia de aislamiento en humanos, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Estas se asocian a casos de micobacteriosis pulmonares y extrapulmonares, aunque específicamente en este tipo de pacientes, se han encontrado asociadas a otras especies micobacterianas. Dentro de las micobacteriosis extrapulmonares, la forma ganglionar es la más frecuente, siendo el complejo *MAI* (80%), la especie más comúnmente aislada en este tipo de patología ^{43,85}.

En una revisión realizada por Arano y cols en el 2014 sobre diferentes publicaciones de micobacteriosis pulmonar, se reportó en la población de Nueva York que el Complejo *MAI*, *M. xenopi* y *M. kansasii* fueron las especies más aisladas, y se obtuvo un porcentaje de aislamiento del 80%, 6%, y 5%, respectivamente. En otra área geográfica (Corea del Sur), se analizaron 195 aislados de MNT procedentes de pacientes con enfermedad pulmonar, se mostró que la especie más frecuentemente aislada fue *MAI* (48%) y *M. abscessus* (33%) ⁴⁵.

Las MNT son microorganismos muy resistentes a altas temperaturas, así como muchos desinfectantes clorados y al glutaraldehído, además sobreviven en ausencia de nutrientes; estos hechos contribuyen a explicar su presencia en diferentes ambientes hospitalarios y el hecho de que causen algunos brotes epidémicos de infecciones intrahospitalarias. La puerta de entrada proviene de

procedimientos quirúrgicos como catéteres, liposucciones, polipectomías, inyecciones epidurales, esternotomías, extracciones dentarias, mamoplastias y todo acto quirúrgico que implique material contaminado. Llegan a causar un amplio espectro de enfermedades como la endocarditis, meningitis, neumonías, queratitis, fístulas perianales, linfadenitis, osteomielitis, tenosinovitis y lesiones cutáneas ⁸⁶.

En la actualidad, en los laboratorios de referencia de micobacterias, de países de ingresos medios y altos, se ha dejado de utilizar la identificación rutinaria de especie por pruebas bioquímicas. Estas requieren de la realización de numerosos ensayos que conllevan una gran cantidad de biomasa y pueden demorar varios días para obtener un resultado. En su lugar, se ha preferido emplear técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como: PCR-en tiempo real (RT-PCR, siglas en inglés), PCR y análisis de restricción (PCR-RFLP o PRA, por sus siglas en inglés), PCR-hibridación en línea (GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS) y secuenciación de ADN ^{10, 11,71,72,87}.

En Cuba, los primeros estudios moleculares realizados en el LNRI-TBLM, del IPK fueron dedicados al diagnóstico y caracterización de *Mycobacterium tuberculosis* ^{79,88}. Posteriormente, se extendió la aplicación de las técnicas genotípicas a la identificación de otras especies micobacterianas. En 2001, Sotolongo implementó la identificación de micobacterias mediante PCR-RFLP (o PRA) y luego Yzquierdo y cols. (2007) realizaron un estudio comparativo entre las pruebas convencionales diagnósticas y la técnica molecular PCR-RFLP para la identificación de aislados clínicos de MNT. A pesar de los resultados alentadores de estas dos investigaciones, limitaciones de recursos

de biología molecular y equipamiento, impidieron la implementación de esta tecnología como herramienta en la rutina del laboratorio ^{15,89}.

Actualmente, se conocen nuevas técnicas de biología molecular que presentan una alta sensibilidad y especificidad como son los ensayos GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS.

En la **Tabla 3** se presentan los resultados obtenidos mediante la prueba molecular GenoType *Mycobacterium* CM con los aislados clínicos de MNT. Al emplearla para la identificación de los 52 aislados analizados, 44 correspondieron a especies y complejos identificables a nivel de especie, predominando *M. fortuitum* 34,6% (18/52) y dentro del complejo MAI, *M. intracellulare* 21,2% (11/52), mientras que ocho aislados resultaron no identificables a nivel de especie, solo se pudo determinar el género.

Tabla 3. Resultados de la identificación molecular mediante el ensayo GenoType *Mycobacterium* CM de 52 aislados de MNT obtenidos en Cuba en 2017-2018.

Identificación <i>Mycobacterium</i> CM	GenoType	n	%	Patrón de bandas
<i>M. avium</i> spp		6	11,5	1,2,3,4
<i>M. intracellulare</i>		11	21,2	1,2,3,9
<i>M. fortuitum</i>		18	34,6	1,2,3,7,14
<i>M. chelonae</i>		1	1,9	1,2,3,5,10
<i>M. gordonae</i>		2	3,8	1,2,3,8,10
<i>M. scrofulaceum</i>		2	3,8	1,2,3,9,10
<i>M. kansasii</i>		2	3,8	1,2,3,10,12
<i>M. abscessus</i>		2	3,8	1,2,3,5,6,10
<i>Mycobacterium</i> spp		8	15,3	1,2,3,10

Leyenda: n = número de aislados

En la **Tabla 4** se muestran los resultados de la identificación a nivel de especie por la técnica GenoType *Mycobacterium* AS de los ocho aislados de MNT no

identificados con el sistema GenoType *Mycobacterium* CM. Esta metodología tiene la ventaja de que logra la diferenciación de otras especies micobacterianas con menos frecuencia de aparición aislamientos clínicos en humanos, tanto de crecimiento rápido y crecimiento lento. Al aplicar esta técnica se lograron identificar cuatro aislados como pertenecientes a *M. simiae* (8,33%), mientras que en las cuatro restantes solo se confirmó el género *Mycobacterium*.

Tabla 4. Resultados de la identificación por la prueba GenoType *Mycobacterium* AS de los ocho aislados de MNT no identificados con GenoType *Mycobacterium* CM.

Identificación GenoType <i>Mycobacterium</i> AS	n	%	Patrón de bandas
<i>M. simiae</i>	4	7,7	1,2,3,4,6
<i>Mycobacterium spp</i>	4	7,7	1,2,3,12

Leyenda: n = número de aislados

El hallazgo de aislados de *M. simiae* en esta investigación (cuatro) es muy notorio. Esta especie fue reportada inicialmente por Karasova en 1965 en aislados de muestras de monos importados por Hungría desde India, que dieron la prueba de la tuberculina negativa. En Cuba, Valdivia y cols. (1971) describieron una micobacteria que está relacionada bioquímicamente con el serotipo 1 de *M. simiae* y fue denominada *M. habana*. Se clasifica filogenéticamente en el mismo grupo que otras MNT, tales como *M. triplex*, *M. genavense*, *M. heidelbergense* y *M. lentiflavum*. En los últimos años, se ha registrado un incremento en la frecuencia de aislamientos clínicos de *M. simiae* y actualmente, se considera un patógeno oportunista para animales y humanos. Desde el punto de vista

epidemiológico, *M. simiae* se ha localizado en varios países de casi todos los continentes: Argentina, China, Cuba, EE. UU., Francia; Inglaterra, India, Irán, Líbano, Malawi, Tailandia, entre otros. En Cuba, no se habían encontrado evidencias documentadas del hallazgo de esta especie entre las MNT aisladas en el país en más de una década ^{74,90,91}.

En los últimos cinco años, los laboratorios de micobacteriología han preferido emplear la PCR-hibridación en línea (GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS) en la diferenciación rápida de MNT por ser una tecnología sencilla, de fácil interpretación, aunque con lleva personal calificado, utilización de equipamiento, reactivos e insumos de calidad de biología molecular.

En Cuba, es la primera vez que se utilizan los ensayos GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS en la identificación de MNT. Con estas técnicas se logró determinar la especie de la mayoría de los aislados analizados; aunque en cuatro de ellos no fue posible. Esto estuvo dado a que la especie de MNT correspondiente no estuviera incluida dentro de los sistemas de diagnósticos utilizados. Recientemente, y motivado fundamentalmente por la disminución de la tuberculosis en los países desarrollados, y el incremento de las MNT en múltiples procesos patológicos, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos, se han incrementado los estudios de identificación y caracterización de MNT de importancia clínica. Actualmente, se reconocen más de 150 especies, muchas de estas descritas en las últimas dos décadas, gracias a los métodos moleculares¹.

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Singh y cols. en el 2013., en la India, donde realizaron un estudio en 60 aislados clínicos para evaluar los ensayos GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS en la diferenciación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y las diferentes especies de MNT. Las especies de MNT más comúnmente encontradas fueron; *M. fortuitum* 20 (33.3%), *M. intracellulare* 11 (18.3%) y *M. avium* 4 (6.7%). También reportaron tres aislados (dos de crecimiento rápido y uno lento) que no pudieron ser identificados con estas pruebas moleculares ⁷⁰.

Sin embargo, los resultados de esta investigación son inferiores a lo reportado por Leiva y cols en Chile (2012), que a partir de 63 aislados utilizando el GenoType *Mycobacterium* CM, detectó como especies más predominantes a *M. avium* (19,2%); seguido de *M. gordonae* (11,5%) y *M. kansasii* (9,6%) ⁹.

En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos al comparar las pruebas bioquímicas frente a las técnicas moleculares GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS.

Estos resultados mostraron una coincidencia en 42 de los aislados analizados, en seis aislados no se obtuvo coincidencia entre ambas técnicas, y en los cuatro restantes solo fueron identificados a nivel de género por los dos ensayos moleculares.

Tabla 5. Comparación entre el método convencional y los métodos moleculares para la identificación de MNT en 52 aislados obtenidos en Cuba en 2017- 2018.

Identificación pruebas bioquímicas	Identificación genotípica <i>Mycobacterium</i> GenoType CM y AS	No de aislados
<i>Complejo MAI</i>	<i>M. avium</i>	6
	<i>M. intracellulare</i>	10
	<i>M. simiae</i>	1 ^a
	<i>Mycobacterium spp</i>	1 ^b
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	18
	<i>M. abscessus</i>	1 ^a
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1
	<i>M. abscessus</i>	1 ^a
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	2
<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	1
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	2
	<i>M. simiae</i>	1 ^a
<i>M. simiae</i>	<i>M. simiae</i>	2
<i>M. terrae</i>	<i>M. intracellulare</i>	1 ^a
<i>M. marinum</i>	<i>M. kansasii</i>	1 ^a
<i>M. nochromogenicum</i>	<i>Mycobacterium spp</i>	1 ^b
<i>M. parafortuitum</i>	<i>Mycobacterium spp</i>	2 ^b

Leyenda: ^a Resultados discordantes entre ambos métodos.

^b Por métodos moleculares solo se identificó el género

Para el cálculo de la concordancia entre la identificación bioquímica y las pruebas moleculares no se tuvieron en cuenta los cuatros aislados que solo se identificaron como género *Mycobacterium* empleando los sistemas comerciales GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS (marcados con una b). En este caso, no se trataron de verdaderas discordancias, sino que la especie no estaba incluida en los ensayos moleculares, como se mencionó anteriormente. Por tanto, el número total de aislados comparados se consideró como 48 (en vez de 52) obteniendo una concordancia del 87,5%. Los

resultados obtenidos en este estudio resultaron inferiores a los reportados por Richter y cols. (2006) en un estudio realizado en Alemania donde registraron valores de concordancia superiores a 92% para los sistemas GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS, en comparación con las pruebas bioquímicas⁹². Sin embargo, fueron similares a lo reportado por Gitti y cols. en una investigación en Grecia (2006) analizando 76 aislados clínicos de MNT por método convencional y los sistemas GenoType *Mycobacterium* CM /AS obtuvieron una concordancia de 84,2%⁹³.

En la literatura revisada existen muy pocos reportes donde se comparan los métodos convencionales de identificación de las MNT respecto a las pruebas moleculares GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS.

En Cuba, Paneque (2004) realizó una comparación de las pruebas convencionales y el método molecular PRA para identificar 50 aislados clínicos de MNT llegados al LNRI-TBLM procedentes de los CPHEM del país y se obtuvo 81,25% de concordancia⁸⁰.

Yzquierdo y cols. en (2007), analizando 46 aislados de MNT realizaron un estudio comparativo entre las pruebas bioquímicas y la herramienta diagnóstica molecular PCR-RFLP obteniendo una concordancia de 91,3%. Las especies más frecuentemente encontradas en este trabajo fueron *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. fortuitum*¹⁵.

En otro estudio conducido por Godoy y cols. en 2008 en Venezuela compararon los resultados de identificación por las pruebas bioquímicas y PCR-RFLP donde se encontró una coincidencia de 81%. Uno de los aislados discordantes fue identificado como perteneciente a la especie *M. chelonae* por

las técnicas convencionales, por PCR-RFLP se identificó como *M. abscessus* tipo 1. Similar discordancia se obtuvo en la investigación realizada ⁷.

Castro y cols. en 2007 realizaron un estudio en Colombia donde identificaron 70 aislamientos clínicos de MNT mediante metodologías fenotípicas y genotípicas (PCR-RFLP). La concordancia encontrada entre las especies *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. goodii* y *M. intracellulare* varió de 44% a 89%. En cinco (7,14%) de los casos, la metodología fenotípica no logró identificar la especie, sólo determinó su clasificación como especie Escotocromógena perteneciente al grupo IV de Runyon, mientras que por la técnica molecular se definió la especie ⁶¹.

La identificación convencional de MNT se lleva a cabo mediante pruebas que permiten detectar características fenotípicas y bioquímicas. Estas pruebas son muy utilizadas, pero presentan importantes limitaciones que contribuyen al problema de la diferenciación de especie y de manejo clínico de las micobacteriosis. Las pruebas bioquímicas en ocasiones presentan variabilidad, ya que la expresión de un fenotipo determinado depende de condiciones ambientales. La metodología puede presentar diferentes resultados al modificarse factores tales como; preparación de los medios y reactivos, cantidad y tiempo de crecimiento de la cepa a identificar, e incluso el observador, ya que se requiere de un personal entrenado. Todo ello, dificulta la interpretación de los resultados obtenidos ⁹⁴.

Otra limitante importante de los métodos bioquímicos es que, como se requiere de un cierto número de bacterias viables para producir un resultado detectable,

el tiempo necesario para obtener un resultado puede ser de varias semanas, particularmente en especies de crecimiento lento. Además, las bases de datos de las características fenotípicas se encuentran limitadas a las especies más comunes y no son actualizadas con frecuencia, por lo que las especies descritas recientemente no pueden ser identificadas por estos métodos. La aplicación de estas técnicas involucra un alto riesgo de bioseguridad para el personal, pues se trabaja en todo momento con bacterias vivas. Las pruebas moleculares, basadas en la detección de características genotípicas, surgen como respuesta a muchas de estas limitaciones, y se ha reportado que las mismas permiten una identificación más rápida, confiable y sensible de las MNT ⁷.

En la investigación realizada se encontraron seis discordancias cuya identificación molecular no coincidió con la identificación bioquímica. En cuatro de ellos fueron discordantes solo en la especie pero si correspondían a la misma clasificación de los grupos de Runyon, los otros dos aislados se identificaron uno como *M. scrofulaceum* y el otro Complejo MAI por pruebas bioquímicas y *M. simiae* por Geno Type *Mycobacterium* AS.

La especie *M. scrofulaceum* y *M. simiae* pertenecen a grupos diferentes respecto a la clasificación de Runyon, los resultados de las pruebas bioquímicas de estas especies son iguales. Según las características de cultivo, el comportamiento bioquímico y por seroaglutinación, de las cepas de *M. simiae* se pueden clasificar en 2 subespecies: serotipo 1 que producen ureasa y son variables en la producción de nicotinamidasas y pirazinamidasas,

mientras que las del serotipo 2 solamente producen ureasa. La identificación de *M. simiae* mediante métodos convencionales es difícil y puede conducir a confusión con otras especies similares, especialmente con el Complejo *MAI*, *M. flavescens* o *M. scrofulaceum*^{95,96}. Por otra parte, estudios filogenéticos recientes han permitido redefinir la vía evolutiva de las micobacterias. En estos momentos, se considera que *M. simiae* está genéticamente relacionado con *M. scrofulaceum* y también con el Complejo *MAI*¹.

El *M. simiae* en medio sólido crece formando colonias lisas, de color crema, amarillas tras exposición prolongada a la luz (fotocromógenas), algunas cepas pueden crecer a 42°C, no hidroliza el tween 80; no produce nitratorreductasa, ni arilsulfatasa, ni fosfatasa, produce catalasa a 68°C, ureasa, nicotinamidasas, pirazinamidasas⁹¹.

El otro aislado identificado como *Complejo MAI* por pruebas bioquímicas y *M. simiae* por GenoType *Mycoacterium* AS. Estas dos especies también pertenecen a grupos diferentes según clasificación de Runyon, por las pruebas bioquímicas solo se diferencian en la enzima ureasa, donde en el complejo *MAI* es negativa, y en la especie *M. simiae* es positiva.

En un estudio realizado por Barrera y cols en Argentina en el 2010 donde estudiaron aislamiento de MNT. En cuatro de los aislados analizados no desarrollaron pigmentación, por la morfología de las colonias y características bioquímicas, pudieron ser confundidos con otras especies micobacterianas más frecuentes en patología humana, como las del Complejo *MAI*. Este

análisis retrospectivo muestra que la identificación rápida de las micobacterias del grupo *M. simiae*, por métodos moleculares, es de utilidad clínica para advertir al médico, especialmente cuando la enfermedad se presenta en pacientes gravemente inmunodeprimidos que tienen una evolución desfavorable⁹⁷.

Durante el desarrollo de este trabajo, se pudieron constatar en la práctica las ventajas de la aplicación de las técnicas moleculares diagnósticas GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS frente a las pruebas bioquímicas. Algunas de estas ventajas incluyen poco tiempo requerido para la obtención de resultados, la relativa facilidad de realización e interpretación de la prueba, y la limitada manipulación de material infectante que se traduce en disminución de riesgo biológico.

En relación al grado de dificultad, si bien ambos métodos necesitan un adiestramiento previo, las pruebas bioquímicas son más laboriosas y requieren de una inversión de tiempo considerable porque deben ser observadas prácticamente de forma diaria por varias semanas, además de lo engorroso de trabajar con material biológico por mucho tiempo, también a que cada laboratorio conforman diversos protocolos de identificación bioquímica de acuerdo a sus disposiciones. Los sistemas GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS requieren de 2-3 días de trabajo y sólo se mantiene contacto con material infeccioso durante la extracción de ADN. La técnica utiliza menor número de soluciones, las mismas se pueden preparar

con anterioridad en grandes volúmenes, y almacenadas por tiempo prolongado.

Las pruebas GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS son herramientas adecuadas (rápidas, sensibles, operativas) para la identificación de aislados clínicos de las especies más comunes de MNT, en las actuales condiciones de trabajo del LNRI-TBLM del IPK y podría llegar a constituir un verdadero avance para el acortamiento en los tiempos de diagnóstico, lo que implica mayor oportunidad de aplicación de tratamiento específico sólo en los casos en que éste sea requerido.

- Se logró evaluar las técnicas moleculares GenoType *Mycobacterium* CM y *Mycobacterium* AS para la identificación de MNT en el LNRI-TLM del IPK, apreciándose las bondades en cuanto a baja complejidad, tiempo de ejecución corto y precisión en los resultados.
- Hubo un predominio de las especies *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium avium-intracellulare* como lo reportado históricamente en Cuba y otras partes del mundo.
- El hallazgo de cuatro aislados de *Mycobacterium simiae* en las muestras analizadas, podría indicar un incremento de la frecuencia de aparición de esta especie en Cuba.
- Se encontró una buena concordancia entre los métodos moleculares y la identificación convencional, lo que apoya su incorporación inmediata al algoritmo de diagnóstico del LNRI-TLM del IPK.

- Incluir el uso de estas técnicas moleculares en el algoritmo de la identificación de MNT en el LNRI-TLM del IPK.
- Estudiar un mayor número de aislados de MNT.

1. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev. 2014; 27:727–52.
2. Riedel S, Dionne K, Ellis C, Duffield A, Carroll KC, Parrish NM. *Mycobacterium szulgai*: an unusual cause of disseminated mycobacterial infections. Infection 2012; 40:463-8.
3. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. Eur Respir J 2013; 42(6):1604-13.
4. Mederos LM, Fleites G, Capó V, De Armas Y, Acosta MA, Montoro EH. Infección diseminada por *Mycobacterium szulgai* con compromiso pulmonar y ganglionar en un paciente con sida. SIIC 2012;18 (8):776-80.
5. Mederos LM, Reyes A, Rodríguez P, Váldez L, Sardiñas M, Martínez MR et al. Coinfección por *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium tuberculosis* en paciente con el síndrome de inmunodeficiencia humana. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2014; 31(4):788-92.
6. Mederos LM, Fleites G, Acosta MA, Romero JM, Valdés L, León R et al. Micobacteriosis peritoneal por *Mycobacterium avium - intracellulare* en paciente con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. SIIC 2017; 22: 352-6.
7. Godoy MJ, Orozco L, Hernández C, Da Mata O, De Waard J, González S. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. Rev Soc Ven Microbiol 2008; 28(2): 1315-2556.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 1997; 35:79-85.
9. Leiva C T. Evaluación de una técnica de hibridación reversa para identificación rápida de micobacterias en Chile. *Rev Chil Enf Respir* 2012; 28: 9-15.
10. GenoType *Mycobacterium* CM VER 2.0 Disponible en: www.hain-lifescience.de
11. GenoType *Mycobacterium* AS VER 1.0 Disponible en: www.hain-lifescience.de
12. Castillo A, Díaz M, Mederos L M, Pérez A, Pomier O, Victoria A et al. Infección pulmonar por micobacterias ambientales en pacientes VIH/SIDA atendidos en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, enero 2006 – junio 2008. *Rev Panam Infectol* 2013; 15(1-4):33-40.
13. Mederos L M, Sardiñas M, León G, Guerra JC, Martínez MR, Díaz R. Aspectos clínicos y aislamientos de micobacterias ambientales en muestras pulmonares y extrapulmonares. *SIIC* 2014,21:40-4.
14. Mederos Cuervo LM, Martínez Romero MR, Sardiñas Aragón M, García León G, Concepción Acosta CM, Díaz Rodríguez R. Utilidad del cultivo rápido en medio líquido Bact/Alert 3D en el diagnóstico micobacteriano de muestras clínicas. *AVFT* 2016; 35(3):77-82.
15. Yzquierdo S, Mederos LM, Díaz A, Echemendía MA, Montoro E. Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. *Rev Chil Infect* 2007; 24 (5): 391-6.
16. Irgens LM. The discovery of the leprosy bacillus. *TidssKr Nor Laegeforen* 2002; 122: 708-9.

17. Azizi MH, Bahadori M. A brief history of tuberculosis in Iran during the 19th and 20th centuries. Arch Iran Med 2011; 14 (3): 215-19.
18. Fenga Y, Xub H, Wanga H, Zhanga C, Zonga W, Wua Q. Outbreak of a cutaneous *Mycobacterium marinum* infection in Jiangsu Haian, China. Diag Microbiol Infect Dis 2011; 71: 267–72.
19. Del Solar M, Salomón M, Bravo F, Seas C, Gotuzzo E, Culqui D, et al. Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética. Reporte de casos y revisión de la literatura. Folia Dermatol. Peru 2005; 16 (3): 127-35.
20. Falkinham JO, Norto CD, LeChevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl Environ Microbiol 2001; 67(3):1225-31.
21. Bi S, Fei Shu H, Hai Ying Y, Kai Jin X, Bei Wen Z, Zhong Kang J et al. Nontuberculous mycobacterial osteomyelitis. Infect Dis (Lond) 2015; 47(10): 673–85.
22. Brown Elliott BA, Griffith DE, Wallace RJ. Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria. Infect Dis Clin of North América 2002; 16(1): 187-219.
23. Salicio Y, Álvaro AI, Bermejo AI, Navascués A, Ojer M, Ruz A et al. Relevancia clínica de los aislamientos de micobacterias no tuberculosas. An Sist Sanit. Navar 2008; 31 (1): 33-42.
24. Grandjean S, Fellag M, Magan C, Drancourt M. *Mycobacterium malmøense* pulmonary infection in France: a case report. BMC Res Notes 2017; 10:436.

25. Casal M. Microbiología Clínica de las enfermedades por micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis). Facultad de Medicina: Universidad de Córdoba, España, 1990.
26. Dawson, DJ. Mycobacterial Terminology. J Clin Microbiol 2000; 38:3913-16.
27. Montoro E, Suárez O, Valdivia JA. Micobacterias. En: Llop A, Valdés Dapena M, Suazo JL, editores. Microbiología y Parasitología Médica. 1ra ed. La Habana: Ciencias Médicas; 2001.p:363–85.
28. Daniel W. Fitzgerald DW, Sterling TRHaas DW. *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bennett JE, Dolin R, Blaser, MJ, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth Edition. Philadelphia: Elsevier Inc; 2015. p: 2787-818.
29. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2003; 2(83): 91-7.
30. Mederos LM, Montoro EH, Bernabéu A, Linares C, Valero-Guillén PL. Structural Studies of cord factors from *Mycobacterium simiae* related to the capacity for tumour necrosis factor alpha (α -TNF) induction. Microbiology 2010; 156: 3744-53.
31. Casal M. Cómo denominar a las micobacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* y a *M. leprae*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21 (6): 296-8.
32. Stuart B , Bailey TC, Bhatnagar J, Ritter JM, Emery BD, Jassim OJ et al. *Mycobacterium ulcerans* Infection Imported from Australia to Missouri USA, 2012. Emerg Infect Dis 2014; 20(11):80-7.
33. Runyon, E. Anonymous Mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am 1959; 43: 273-90.

34. Camarena J, González R. Micobacterias atípicas y su implicación en patología infecciosa pulmonar. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(5):66-75.
35. Máiz L, Barbero E, Nieto R. Infecciones respiratorias por micobacterias no tuberculosas Review Article. *Medic Clín* 2018; 150(5):191-7.
36. Porvaznik I, Solovic I, Mokry J. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. *Adv Exp Med Biol* 2017; 944:19-25.
37. Aksamit TR, PhilleyJV, Griffith DE. Nontuberculous mycobacterial (NTM) lung disease: The top ten essentials. *Respiratory Medic* 2014; 108:417-25.
38. Garza Velasco R, Monroy Zamorate F, Perea Mejía LM. Micobacterias no tuberculosas: actual importancia clínica y principales factores de virulencia. *Lab acta* 2007; 19(3): 67-76.
39. Martínez Moragón E, Menéndez R, Palasí P, Santos M, López Aldeguer J. Enfermedades por micobacterias ambientales en pacientes con y sin infección por el VIH: características epidemiológicas, clínicas y curso evolutivo. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 281-6.
40. Quinteros R, López V, Gutiérrez D, Cardemil F. Infecciones por micobacterias en otorrinolaringología. Revisión de la literatura. *Rev Otorrinolaringol Cir. Cabeza Cuello* 2016; 76: 111-20.
41. Ruiz I, Bustillo M, Monforte ML, Burgués P, Guerrero C. Linfadenitis por micobacterias no tuberculosas: experiencia de 15 años *An Pediatr* 2017; 86:115-21.

42. Mederos LM, Pomier O, Trujillo A, Fonseca C, Montoro EH. Micobacteriosis sistémica por *Mycobacterium avium* en paciente con SIDA. AVFT 2000; 28 (2): 53-6.
43. Toyohiro H, Koichi M, Yutaka I, Takeshi K, Seshino I, Shuji T. Environmental risk factors for pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* complex disease. Chest 2011;140(3): 723-9.
44. Karakousis P, Moore R, Chaisson R. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretro viral therapy. Lancet Infect Dis 2004; 4(9): 557-65.
45. Arano M, García J A, Concepción G. Diagnóstico y tratamiento de las Infecciones por Micobacterias no tuberculosas. Epidemiología. Salud 2014. Disponible en: www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html
46. Thomson RM. Changing Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria Infections. Emerg Infect Dis 2010; 16(10): 1576–83.
47. Jorge MC, Traversa MJ, Schettino DM. Presentaciones clínicas en felinos por micobacterias no tuberculosas. Rev Vet Arg 2011; Vol XXVIII (278). Disponible en: <http://www.veterinariargentina.com/revista/2011/06/presentaciones-clinicas-en-felinos-por-micobacterias-no-tuberculosas/>.
48. Organización Panamericana de la Salud. Normas y Guía Técnica. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I. Baciloscopía. 2008.
49. Chandra TJ, Selvaraj R, Allam RR, Sharma YV. Same day sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: modified ZN staining versus LED FM. Int J Curr Microbiol App Sci 2015; 4(4):75-81.

50. Martínez MR, Sardiña M, García G, Díaz M, Llanes MJ, Montoro EH. Evaluación del control de calidad de la baciloscopia en el diagnóstico de la tuberculosis en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2006; 58(3):194-9.
51. Misleidis Sardiñas, Grechen García, María Rosarys Martinez, Lilian M. Mederos. Importancia del control de la calidad de la baciloscopia en los laboratorios de diagnóstico de tuberculosis. *Rev Chil Infectol* 2016; 33(3):282-6.
52. Teran R, de Waard JH. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. *eJIFCC* 2015; 26(4):310-25.
53. Imaz M, Allassia S, Aranibar M, Gunia A, Poggi S, Togneri A et al. Rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras respiratorias en laboratorios periféricos de Argentina. *Biomédica* 2017; 37(2):164-74.
54. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte II. Cultivo. 2008.
55. Fagundo R, Cerros MA, Herrera E. Ventajas del cultivo en un equipo automatizado y la prueba de PCR para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Mex Patol Clin* 2004; 51(2):70-4.
56. Piffardi S, Luna A, Sakurada A, Lepe R. Evaluación comparativa del método automatizado BACTEC MGIT 960 con el método de las proporciones para determinar susceptibilidad a drogas antituberculosas en Chile. *Rev Chil Enf Respir* 2004; 20:139-43.

57. Fúnez R, Varela-Martínez C. Métodos Diagnósticos en Tuberculosis: lo convencional y lo nuevo. Rev Med Honduras 2006; 74:93-101.
58. Fernández de Vega FA, Moreno JE, González Martín J, Palacios Gutiérrez JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. España; 2005. p: 12-39.
59. Barrera L. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía teórica. Parte II. Cultivo. INEI, ANLIS Dr. Carlos Malbrán. Argentina. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2008.
60. Sampaio JL, Chimara E, Ferrazoli L, da Silva Telles MA, Del Guercio VM, Jericó ZV. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. Clin Microbiol Infect 2006; 12:142-9.
61. Castro CM, Puerto G, García LM, Orjuela DL, Polo CL, Garzón MC et al. Identificación molecular de Micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995-2005. Biomédica 2007; 27:439-46.
62. Alcaide Fernández de Vega F. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24(1):53-7.
63. Araya P, Velasco M, Fernández J. Rapid identification of non tuberculous mycobacteria by restriction pattern analysis. Rev Med Chile 2006; 134 (7):868-73.
64. Hernández Toloza JE, Rincón Serrano MP, Celis Bustos YA, Aguillón CI. Identificación de *Mycobacterium* spp a través de métodos moleculares en el

- Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34(1):17–22.
65. Da Silva Rocha A, Werneck Barreto AM, Campos CE, Villas Boas da Silva M, Fonseca L, Saad MH et al. Novel allelic variants of *Mycobacteria* isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of hsp65. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4191-6.
66. Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1010-5.
67. Hall L, Doerr KA, Wohlfel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1447-53.
68. Padilla E, González V, Manterola JM, Perez A, Quesada MD, Gordillo S, et al. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA *Mycobacteria* and genotype *Mycobacterium* assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3083-8.
69. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gwendolyn LG. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType *Mycobacterium* CM / AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol* 2009; 58:900–4.
70. Singh A K, Maurya AK, Umrao J, Kant S, Singh RA, Laskshmi V et al. Role of GenoType *Mycobacterium* Common *Mycobacteria*/Additional Species Assay for

- Rapid Differentiation Between *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Different Species of Non-Tuberculous Mycobacteria. J Lab Physicians 2013; 5(2):83–9.
71. Lachnik J, Ackermann B, Bohrsen A, Maass S, Diephaus C, Puncken A et al. Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 2002; 40(9):3364-73.
72. Chen J, Cheng V, She K, Wing Cheong Y, Kwok Yung Y. Application of a dual target PCR-high resolution melting (HRM) method for rapid nontuberculous mycobacteria identification. J Microbiol 2017; 132:1–3.
73. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. Infectio 2018; 22(1): 35-45.
74. Valdivia JA, Suárez MR, Echemendía MA. *Mycobacterium habana*: probable nueva especie dentro de las Micobacterias no clasificadas. Bol Hig Epid 1971; 9: 65-73.
75. Mederos LM, Valdivia JA, Valero-Guillén PL. Lipids of 'Mycobacterium habana', a synonym of *Mycobacterium simiae* with vaccine potential. Tuberculosis (Edinb). 2006; 86(3-4):324-9.
76. Valdivia Alvarez JA, Ferrá Salazar C, Olivares E, Gutiérrez Castro AM. Micobacterias no tuberculosas en pacientes sintomáticos de Ciudad de La Habana. Rev Cub Med Trop 1985; 37 (3):231-7.
77. Ferrá C, Montoro E, Gutierrez AM, Valdivia JA, Jiménez CA. Estudio de micobacterias no tuberculosas aisladas en Cuba. Rev Cub Med Trop 1992; 44:205-7.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

78. Mederos LM, Fofana S, Perovani MA, Sardiñas M, Montoro EH. Identificación de especies micobacterianas en Cuba. Arch Venezolano Farm Terap 2007; 2:142-5.
79. Díaz R, Montoro E, Maestre JL, Echemendía M, Valdivia JA. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Mem do Inst Oswaldo Cruz 1994; 89(2):211-2.
80. Paneque A. Identificación de micobacterias no tuberculosas por métodos moleculares y convencionales. Cuba, 2004 [Tesis de Maestría]. Ciudad de la Habana: Instituto Pedro Kourí.
81. GenoLyse VER 1.0 Disponible en: www.hain-lifescience.de
82. Montufar FE, Madrid CA, Montufar MC, Aguilar C, Carolina Saldarriaga C, Mesac MA et al. Caracterización de pacientes hospitalizados con infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas, en un hospital de alta complejidad en Colombia. Infect 2014; 18(4):135-4.
83. Nasiri MJ, Dabiri H, Fooladi A A I, Amini S, Hamzehloo G, Feizabadi MM. High rates of nontuberculous mycobacteria isolation from patients with presumptive tuberculosis in Iran. New Microbes New Infections 2018; 21: 12-18.
84. Hamieh A, Tayyar R, Tabaja HEL, Zein S, BouKhalil P, Kara N et al. Emergence of *Mycobacterium simiae*: A retrospective study from a tertiary care center in Lebanon. PLoSONE 2018; 13(4): e0195390.
85. Mederos LM, Blanco O, Fleites G, Acosta MA, Castro O. Escrofulosis inguinal bilateral diseminada por *Mycobacterium avium-intracellulare* en paciente inmunocompetente. SIIC 2013; 20(2): 304-06.
86. Surco Luna V. MICOBACTERIAS. Rev Actualización Clín 2014; 49:2619-24.

87. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Böttger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 1990; 40(4):323-30.
88. Díaz R, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during an outbreak of HIV-infected patients by DNA fingerprinting. *American J Trop Med Hyg* 1995; 53(2):S155-6.
89. Sotolongo A. Identificación de micobacterias mediante reacción en cadena de la polimerasa y análisis con enzimas de Restricción. Cuba, 2001 [Tesis de Maestría]. Ciudad de la Habana: Instituto Pedro Kourí.
90. Karasova V, Weissfeiler JG, Krasnay J. Occurrence of atypical mycobacterial in *Macacus rhesus*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1965;12:275-82.
91. García Martos P, García Agudo L, González Moya E, Galán F, Rodríguez Iglesias M. Infecciones por *Mycobacterium simiae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33 (8):e37–e43.
92. Richter E, Rusch Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* Assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1769-75.
93. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Selentis Y. Use of the GenoType *Mycobacterium* CM and AS to analyze 76 nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece. *J Clin Microbiol* 2006, 44: 2244-6.
94. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 296-303.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

95. Weiszfeiler JG, Karasseva V, Karczag E. *Mycobacterium simiae* and related mycobacteria. *Reviews Infect Dis.* 1981; 3: 1040–5.
96. Rynkiewicz GD, Cage WR, Butler NM. Ampel Clinical and microbiological assessment of *Mycobacterium simiae* isolates from a single laboratory in Southern Arizona. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 625-30.
97. Barrera I, Palmero D, Paul R, Lopez B. Enfermedad por *Mycobacterium simiae* y “*Mycobacterium sherrisii*” en La Argentina. *MEDICINA* 2010; 70: 343-6.

ANEXO 1. Preparación del medio de cultivo Löwenstein Jensen (L-J)

1. Se adicionó a 600 mL de agua destilada los siguientes componentes:

KH_2PO_4 2,4 g

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g

Citrato de magnesio..... 0,6 g

Asparagina.....3,6 g

2. Se aplicó calor y se agitó alternadamente hasta evidenciar una disolución total.

3. Se adicionaron 12 mL de glicerol y se agitó por varios segundos.

4. Se aplicó calor y se agitó alternadamente hasta evidenciar una disolución total.

5. Se pesaron 0,4 g de verde malaquita y se adicionaron agitando por varios segundos. Luego se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6. Una vez preparada y esterilizada la solución salina se le adicionaron 1000 mL de huevos (previamente batidos en licuadora), se distribuyeron de medio de cultivo elaborado 6,5 – 7 mL en tubos 150x20 mm y se colocaron en posición inclinado en un horno de tiro forzado a 85°C por 1 hora.

7. Se dejó enfriar lentamente dentro del horno y luego se ajustaron las tapas antes de guardarlos.

ANEXO 2. Protocolo de identificación

Prueba de producción de pigmento y tiempo de crecimiento

Se inocularon dos tubos con suspensión bacteriana en medio L-J de cada aislado, uno de ellos se cubrió con papel de aluminio. Luego se incubaron a 37°C expuestos a la luz durante 12 horas. Posteriormente, se incubaron durante 7 días. Lectura: si el crecimiento de las colonias en los dos tubos es pigmentado son escotocromógenas. Si el crecimiento de las colonias en el tubo tapado no es pigmentado y en el otro tubo sí, estas son fotocromógenas. Si el crecimiento de las colonias en los dos tubos no tienen pigmentos son no cromógenas. Se realizó las lecturas a partir del 4to día. Se definió como crecimiento rápido: cuando apareció crecimiento de colonias en el término de 4 - 7 días después de la incubación y de crecimiento lento cuando el crecimiento de las colonias apareció pasado 7 días.

Catalasa estable a 68°C

Se dispensaron 0,5 mL de solución tampón pH7 en tubos de 13 x 100 mm, y se tomó una asada con varias colonias de los aislados y se incubaron en baño de agua a 68°C por 20-30 minutos. Después se dejó enfriar la suspensión a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0,5 mL de la solución de Tween peróxido de hidrógeno 20% y se observó la formación o no de burbujas. Se esperaron 20 minutos antes de interpretar como negativo.

Interpretación: Presencia de burbujas es positiva. No presencia de burbujas es negativa.

Reducción de nitratos a nitritos

Se preparó el sustrato de la siguiente forma: NaNO_3 (0,85 g); KH_2PO_4 (1,17 g); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,36 g); H_2O destilada (1000 mL); pH-7. Se distribuyó en tubo de tapa de rosca y se autoclavearon por 15 min a 120°C **Reactivos reveladores: Reactivo A:** HCL (50 mL de H_2O +50 mL de HCL); **Reactivo B:** Sulfanilamida (0,2g en 100 mL de H_2O destilada); **Reactivo C:** n-1naphtil etilendiamina dihidro clorhidrato (0,1g en 100 de H_2O destilada). Se dispensaron 2 mL del sustrato en tubos con tapa de rosca (13x100 mm) e inocularon varias colonias de los aislados. Se incubaron a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ en incubadora o baño de agua, por 2 horas. Pasado este tiempo se agregó: 1 gota del reactivo A, 2 gotas del reactivo B y 2 gotas del reactivo C.

Interpretación: Observación de cambio de color inmediato rosado a púrpura es positivo. No cambio de color (transparente) es negativo. **Nota:** La confirmación de los negativos se realizó añadiendo una pizca de polvo de Zinc.

Pirazinamidasa

Se preparó el reactivo de la siguiente forma: Pirazinamida (0,1 g), ácido pirúvico (0,2 g). Se disolvieron en 1L de Agar Dubos. Se distribuyeron 5 mL en tubos con tapa de roscas 16x150 mm, se autoclaveó por 15 minutos a 121°C . Se dejó solidificar en posición vertical. **Reactivo revelador:** Se preparó inmediatamente antes de usar disolviendo una solución de Sulfato de amonio ferroso al 1% en H_2O destilada. Se inocularon los tubos con un inóculo similar al tubo de la escala 1 de Mac Farland. Se incubó a $35\text{-}37^\circ\text{C}$. Se realizó la lectura a los 4 -7 días, se revelo la presencia de la enzima pirazinamidasa

agregando 1 mL del sulfato férrico amoniacal al 1%. (Importante: *M. avium* da positivo a los 4 días).

Interpretación: Formación de un anillo color rosa en la superficie del tubo se interpretó como: positivo. No formación del anillo: negativo

Arilsulfatasa

Se preparó el sustrato de la siguiente forma: fenolftaleína disulfida tripotasio (65 mg); glicerol (1 mL) en 100 mL de agar Dubos. Se distribuyeron 2 mL en tubos 13x100 mm y se autoclavearon por 15 minutos a 121°C. Se dejó solidificar en posición horizontal. **Reactivo revelador:** NaCO₃ (10,6 g) en 100 mL de H₂O destilada.

Se inoculó un tubo por cada aislado analizado con un inóculo similar de la escala 1 de Mac Farland y se incubó a 37°C. Se reveló a los 3-14 días agregando 1 mL del reactivo revelador.

Interpretación: formación de color rosado a rojo: positivo. No formación de color: negativo. **Control** positivo: *M. fortuitum*

Hidrólisis de Tween 80

Se adicionaron 0,5 mL de Tween 80 y 2 mL de solución rojo neutro al 0,1% a 100 mL de buffer fosfato pH=7, se distribuyeron 2 mL en tubo de tapa de rosca 16x150 mm y se autoclaveó por 15 minutos a 121°C. El color del sustrato es ámbar. Se conservó por 3 semanas a 4°C. Se inocularon dos tubos con el sustrato de Tween con colonias. Se incubó a 35 - 37 °C por 5 y 10 días.

Interpretación: Cambio de color ámbar a rosa o rojo: positivo. No hay cambio: negativo. **Control** positivo: *M. kansasii*.

Ureasa

Se preparó el medio de la siguiente forma: Peptona (1 g); Destrosa (1 g); Cloruro de Sodio (5 g); Fosfato de monopotasio (2 g); Urea (20 g); Rojo Fenol (0,012 g); Agua destilada (100 mL). Se esterilizó por filtración y se diluyó 1:10 con agua destilada estéril, luego se distribuyeron 2 mL en tubos con tapa de rosca 100x13 mm. Se inoculó cada tubo con una asada de aislados analizado y se incubó a 37 °C por 3 días.

Interpretación: Cambio de color naranja a rosa-rojo: positivo. No cambio de color: negativo. **Control** positivo: *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*.

Reducción de Telurito

Se preparó medio Middlebrook 7H9 suplementado con 0,5 mL de Tween 80 por cada 1000 mL de medio (no usar glicerol). Autoclaveó y luego se suplemento con ácido oleico, albumina, destrosa, catalasa (OADC). Se distribuyeron 2,5 mL en tubos con tapas 16x150 mm .Se inocularon los tubos con una gota de suspensión bacteriana e incubaron a 37°C por 7-10 días, al cabo de ese tiempo se adicionó a los tubos 2 gotas de solución de telurito al 2%. Se realizó la primera lectura a los 3 días y la segunda lectura a los 9 días.

Interpretación: Formación de un precipitado color negro metálico es positivo. No formación del precipitado o formación de un precipitado verde metálico o carmelita: negativo. **Control** positivo: *Complejo MAI*, negativo: *M. terrae*.

Tolerancia al Cloruro de sodio 5%

Se preparó el medio adicionando NaCl hasta una concentración final de 5%. Se distribuyeron 2 mL en tubos de 16x150 mm y se coagularon a 80°C por 45 minutos de forma inclinada. Se inocularon 0.2 mL de la suspensión bacteriana concentración similar al tubo de la escala 1 de Mac Farland y se incubaron a 37°C por 3-4 semanas. **Interpretación:** Aparición de crecimiento en el medio con NaCl: positivo. No aparición crecimiento en el medio con NaCl: negativo.

Utilización de Hierro

Se le adicionaron 5 g de citrato férrico amoniacal en 200 mL de medio L-J antes de coagular. Se distribuyeron 6,5 mL en tubos de 16x150 mm y se coagularon a 85°C por 45 minutos de forma inclinada. Se inocularon 0.2 mL de la suspensión bacteriana concentración similar al tubo de la escala 1 de Mac Farland en el medio de hierro amoniacal y se incubaron a 37°C de 3 a 4 semanas.

Interpretación: Aparición de crecimiento de colonias de color carmelita, positivo. Aparición de crecimiento de colonia sin color, negativo. **Control** positivo: *M. fortuitum*

ANEXO 3 .Tablas de Identificación de Micobacterias no tuberculosas (MNT)

Especies No Cromógenas

Especie	Nit	Cat 68°C	TW		Nacl 5%	Aril	Fe	TEL		Urea	Pira
			3d	10d				3d	9d		
<i>M.avium</i>	-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>M.gastri</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+/-	-
<i>M.intracellulare</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>M.malmoense</i>	-	- +	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-
<i>M.nochromogenicum</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+/-
<i>M.shimoidei</i>	-	+/-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>M.terrae</i>	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+/-
<i>M.triviale</i>	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	-	+/-
<i>M.celatum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M.haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Especies Fotocromógenas

Especie	Nit	Cat 68°C	TW		Nacl 5%	Aril	Fe	TEL		Urea	Pira
			3d	10d				3d	9d		
<i>M.kansasii</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>M.marinum</i>	-	+/-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>M.simiae</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>M.asiaticum</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>M.intermedium</i>	+	+	+	+	ND	ND	-	ND	ND	+	-

Especies Escotocromógenas

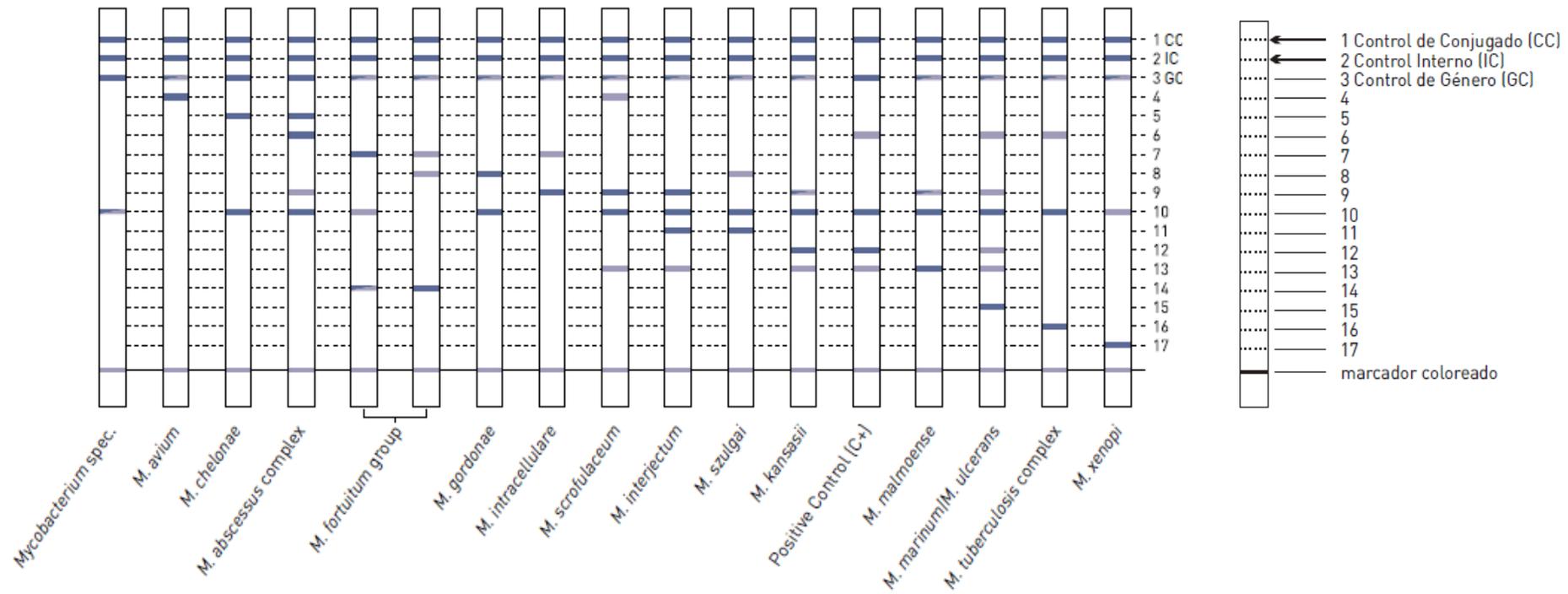
Especie	Nit	Cat 68°C	TW		Nacl 5%	Aril	Fe	TEL		Urea	Pira
			3d	10d				3d	9d		
<i>M.flavescens</i>	+	+	+	+	+	+	-	- +	- +	+	+
<i>M.gordoniae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+/-
<i>M.scrofulaceum</i>	-/+	+	-	-	-	ND	-	-	+	+	+
<i>M.szulgai</i>	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+	+/-
<i>M.xenopi</i>	-	+/-	-	-	-	+	-	-	+	-	+/-
<i>M.interjectum</i>	-	+	-	-	-	ND	-	-	-	+	+
<i>M.cookii</i>	+		-	-	-	+	-	-	-	-	-

Especies de Crecimiento Rápido

Especie	Nit	Cat 68°C	TW		Nacl 5%	Aril	Fe	TEL		Urea	Pira
			3d	10d				3d	9d		
<i>M.fortuitum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
<i>M.peregrinum</i>	+	+	-	-	-/+	+	+	+	+	+	+
<i>M.chelonae</i>	-	+/-	-/+	-/+	-	+	-	+	+	+	+
<i>M.abscessus</i>	-	-	-/+	-/+	+	+	-	+	+	+	+
<i>M.mucogenicum</i>	+/-	ND	+	+	-	+	ND	ND	ND	+	ND
<i>M.smegmatis</i>	+	-	+	+	+	-	+	ND	ND	+	ND
<i>M.phlei</i>	+	+	+	+	+	-	+	ND	ND	+	ND
<i>M.vaccae</i>	-	-	+	+	+	-/+	+	ND	ND	+	ND
<i>M.parafortuitum</i>	+/-	-	ND	ND	+	+/-	+	ND	ND	ND	ND

Leyenda:

(+) : >85% de los aislados son positivos, (-): <15% de los aislados son negativos, (+/-): 50-85% positivos, (-/+): 15-85% positivos, ND: no determinado, Nit: Reducción de nitrato a nitrito, Cat 68°C: catalasa estable 68°C, TW: Hidrolisis de Tween 80, Nacl 5%: Tolerancia al Cloruro de sodio 5%, Aril: Arilsulfatasa, Fe: Toma de Hierro, TEL: Reducción del Telurito de potasio, Urea: Ureasa, Pira: Pirazinamidas.

ANEXO 4. Tabla de interpretación de los resultados del GenoType *Mycobacterium* CM

ANEXO 5. Tabla de interpretación de los resultados del GenoType *Mycobacterium* AS

