

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Utilización de Técnicas Moleculares para la Identificación y
Caracterización Genotípica de Cepas de *Mycobacterium* Aisladas
en Cultivo, y Presentes en Muestras Clínicas**

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a book, a banner with the motto "TODO-LO-ILUMINAN", and a figure. The shield is surrounded by a wreath and the text "UNIVERSIDAD DE SONORA" and "1942".

TRABAJO DE TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q.B. Carla Isabel López Madrigal

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hermosillo, Sonora, por prestarnos sus instalaciones para llevar a cabo una parte de este trabajo, en especial al M. C: Román Escobar López.

Al Dr. Enrique Bolado Martínez por su enorme paciencia conmigo, su disposición siempre incondicional, gracias por sus consejos y enseñanzas, sin él este trabajo no se hubiera realizado, lo admiro y aprecio mucho.

A la Dra. María del Carmen Candia Plata (mi mamá de Hermosillo), por todas sus enseñanzas, consejos, aportaciones tanto a mi vida como a este trabajo, la quiero y admiro mucho.

A mis sinodales M.C. Magali Avilés Acosta y M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña, por su tiempo y contribución en este trabajo, muchas gracias.

A las chicas de Agentes Patógenos del LESP en especial a la Q.B. Rosario Aguayo por su disposición en proporcionarnos las cepas y material para la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio por brindarme su apoyo y amistad, y por compartir toda esta experiencia conmigo.

DEDICATORIA

A mi madre Yolanda Isabel Madrigal Coyoit, gracias por darme la vida,
por apoyarme siempre, los logros que he obtenido en mi formación profesional
te los debo a ti.

A mis hermanos José de Jesús y Julio, los quiero.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
OBJETIVOS	xi
Objetivo General	xi
Objetivos Particulares	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Género <i>Mycobacterium</i>	4
Características Microbiológicas	5
Tuberculosis	9
Diagnóstico en el Laboratorio	9
Identificación de Especies de <i>Mycobacterium</i>	11
Técnicas Moleculares	14
PCR para loci independientes	17
PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	20
PCR-RFLP del gen <i>gyrB</i>	21
ERIC-PCR	21
MATERIALES Y MÉTODOS	24

Cepas Utilizadas	24
Extracción de ADN	24
Identificación de Especie	25
PCR-RFLP del gen <i>gyrB</i>	25
PCR para Loci Independientes	27
PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	28
ERIC-PCR	29
Análisis de Patrones	30
Secuenciación de Productos de PCR	30
Aislamiento de ADN a Partir de Muestras Clínicas	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Caracterización Fenotípica de las Cepas	32
Extracción de ADN Bacteriano	32
Aislamiento de ADN a Partir de Muestras Clínicas	34
PCR-RFLP del gen <i>gyrB</i>	35
PCR para Loci Independientes	39
PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	41
Medio de Bromocresol	47
ERIC-PCR	50
Análisis de Secuencias	53
Análisis de Patrones	53
Análisis Fenotípico	53
Análisis Genotípico	57

Análisis Polifásico	60
Identificación de Especies en Muestras Clínicas	62
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Identificación mediante pruebas bioquímicas de cepas estudiadas por Godoy y colaboradores (2008)	12
II Identificación mediante pruebas bioquímicas de las cepas estudiadas	33
III Cepas identificadas por PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Morfología microscópica de <i>M. tuberculosis</i> (fotografía electrónica), <i>M. bovis</i> (tinción Ziehl Neelsen), <i>M. avium</i> (fotografía de cultivo) y <i>M. leprae</i> (fotografía de muestra clínica)_____	7
2 Representación esquemática de la pared celular micobacteriana_____	8
3 Crecimiento en medio Löwenstein-Jensen de <i>M. tuberculosis</i> (A) y crecimiento en medio Bromocresol de <i>M. bovis</i> (B), <i>M. fortuitum</i> (C) y <i>M. tuberculosis</i> (C)_____	13
4 Amplificación, mediante PCR, del gen <i>gyrB</i> _____	36
5 Análisis de restricción de los productos de PCR del gen <i>gyrB</i> con las enzimas de restricción <i>TaqI</i> y <i>SacII</i> _____	37
6 Amplificación, mediante PCR, de loci independientes_____	40
7 Amplificación, mediante PCR, del gen <i>hsp65</i> _____	42
8 Análisis de restricción, con las enzimas <i>BstEII</i> y <i>HaeIII</i> , de los productos de PCR del gen <i>hsp65</i> _____	44
9 Crecimiento de distintas especies de micobacterias en el medio de Bromocresol_____	49
10 Perfiles de bandas obtenidos, para distintas especies de micobacterias, mediante ERIC-PCR_____	51
11 Árbol de homología, en base a caracterización fenotípica, de 31 cepas de micobacterias provenientes de aislamientos clínicos_____	54

Figura	Página
12 Árbol de homología, en base a caracterización genotípica por ERIC-PCR, de 31 cepas de micobacterias provenientes de aislamientos clínicos _____	58
13 Árbol de homología basado en la información derivada de la caracterización fenotípica y genotípica, de 31 cepas de micobacterias provenientes de aislamientos clínicos _____	61
14 Análisis de restricción, con las enzimas <i>BstEII</i> y <i>HaeIII</i> , de los productos de PCR del gen <i>hsp65</i> _____	64

OBJETIVOS

Objetivo General

Utilizar técnicas moleculares, incluyendo la técnica de ERIC-PCR, para la diferenciación a nivel genotípico de cepas de micobacterias, incluyendo las pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de cultivo y de muestras clínicas.

Objetivos Particulares

1. Observar las características de desarrollo, de especies de *Mycobacterium*, en el Medio Bromocresol.
2. Extraer ADN de micobacterias de muestras clínicas, y de cepas preservadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hermosillo, Sonora.
3. Identificar micobacterias a nivel de especie mediante las técnicas PCR-RFLP del gen *gyrB*, evaluación de Loci Independientes, PCR-RFLP-*hsp65*, y ERIC-PCR.
4. Diferenciar cepas de *Mycobacterium* de acuerdo a similitudes en los patrones de bandas obtenidas.

RESUMEN

En la actualidad, el diagnóstico de la tuberculosis se basa, fundamentalmente, en la observación del bacilo en muestras clínicas y en su posterior desarrollo en medios de cultivo selectivos, así como diversas pruebas fenotípicas. No obstante lo anterior, existe un creciente interés en el desarrollo y aplicación de técnicas más sensibles y específicas que reduzcan notablemente el tiempo requerido para el diagnóstico eficaz. En el presente trabajo se realizó la caracterización genotípica y polifásica de 31 cepas silvestres de micobacterias, aisladas de muestras clínicas humanas y de origen bovino, así como de tres cepas previamente tipificadas. Primeramente se evaluó el desarrollo de las cepas en el medio de Bromocresol el cual contribuyó a la identificación de cepas de *M. tuberculosis* mediante el cambio del color del medio. Para la extracción de ADN, se evaluó un procedimiento con Chelex 100, mismo que permitió la obtención rápida, económica y de material de buena calidad para el subsiguiente análisis genotípico. Para la genotipificación se utilizaron las técnicas de PCR-RFLP del gen *gyrB*, PCR-RFLP del gen *hsp65*, PCR-Loci independientes y ERIC-PCR. La utilización combinada de las técnicas moleculares mencionadas y de pruebas fenotípicas realizadas previamente, permitió identificar 22 cepas de *M. tuberculosis*, cinco cepas de *M. fortuitum*, dos cepas de *M. bovis*, una cepa de *M. massiliense* y una cepa de *M. flavescens*. Por otro lado, se logró identificar a *M. tuberculosis*, a partir de la extracción directa de ADN en tres muestras clínicas y la aplicación de las técnicas de PCR-RFLP del gen *gyrB*, PCR-RFLP del gen *hsp65*, PCR-Loci independientes. Finalmente, si bien la técnica de ERIC-PCR no permitió el agrupamiento preciso de cepas por especie, si proporcionó suficiente información para la diferenciación a nivel de especie y de cepa.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infecto-contagiosa de naturaleza crónica, que afecta a seres humanos de todas las edades, es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que afecta particularmente los pulmones, pero que puede afectar también otros órganos del cuerpo (Palma-Nicolás y col., 2007). Aproximadamente un tercio de la población mundial en la actualidad se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, y de 7 a 8 millones de nuevos casos de Tb se desarrollan cada año (Weldingh y col., 2005).

El género *Mycobacterium* comprende un grupo de microorganismos muy diverso, de amplia distribución en la naturaleza (Cortinas y col., 2002; Jiménez-Pajares y col., 2005). Además de comprender al complejo *M. tuberculosis* existen otras micobacterias conocidas como atípicas, de las cuales el 10-30% de las micobacterias aisladas en laboratorios clínicos corresponden a este tipo (Dorronsoro y col., 2007).

El diagnóstico tradicional de la tuberculosis está basado en pruebas de laboratorio como la baciloscopía para demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, seguido por el cultivo para la identificación de especie por pruebas fenotípicas (Palma-Nicolás y col., 2007). Sin embargo existen numerosos esfuerzos para desarrollar nuevas pruebas diagnósticas que superen la baja sensibilidad y especificidad y la enorme pérdida de tiempo asociada con las pruebas diagnósticas actuales (Cho, 2007). Adicionalmente, los métodos rutinarios requieren suficiente crecimiento bacteriano y no permiten una identificación específica de las especies micobacterianas (Chimara y col., 2008; Niemann y col., 2000b).

Cabe destacar que la identificación de micobacterias a nivel de especie es crucial para la obtención, de información útil sobre la epidemiología y facilita el éxito del tratamiento de los pacientes. Al respecto, las técnicas moleculares

ofrecen una manera rápida, específica y menos costosa para la identificación de especies de micobacterias (Bannalíkar y col., 2006).

Entre las técnicas moleculares para la identificación rápida de micobacterias a nivel de especie, se encuentra una basada en la evaluación de productos amplificados, mediante PCR, del gen que codifica la proteína de choque térmico de 65 kDa (Telenti y col., 1993). Esta técnica es útil para la identificación de especies de micobacterias no tuberculosas y parece ser lo suficientemente confiable como una metodología de rutina en laboratorios de referencia (Chimara y col., 2008).

La evaluación de ciertos loci independientes (PCR-Loci-independientes) del genoma de *M. tuberculosis* permite la diferenciación individual a nivel de las subespecies del complejo así como distinguirlas de otras micobacterias no tuberculosas de importancia clínica. Sin embargo la principal limitante de este procedimiento consiste en no poder diferenciar a *M. tuberculosis* de *M. africanum* subtipo II (Huard y col., 2006).

El análisis del polimorfismo en el tamaño de restricción del producto amplificado por PCR del gen *gyrB* (*gyrB*-RFLP), es una técnica rápida y fácil de utilizar para discriminar entre los diversos miembros del complejo *M. tuberculosis* (Richter y col., 2003). Sin embargo, la aplicación de *gyrB*-RFLP para estudios epidemiológicos es aún limitada, ya que no permite diferenciar *M. tuberculosis* de *M. africanum* subtipo II, a *M. canetti* y *M. africanum* subtipo I de *M. pinnipedii*, y a *M. bovis* de *M. bovis* BCG (Chimara y col., 2004).

Por otro lado, la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de las regiones inter- intergénicas repetitivas de las enterobacterias (ERIC, por sus siglas en inglés), ha permitido obtener bandas de diferente tamaño que representan polimorfismos en las distancias entre los elementos repetitivos (Shuhaimi y col., 2001). Estas regiones consenso (ERIC), son secuencias conservadas a nivel de nucleótidos pero sus localizaciones cromosómicas difieren entre especies (Hulton y col.,

1991) por lo que son útiles para distinguir algunas especies pertenecientes al género *Mycobacterium* (Mello y col., 2006).

Actualmente se requieren técnicas moleculares alternativas que permitan una rápida identificación de los miembros del género *Mycobacterium*. Una opción adecuada sería la utilización de ERIC-PCR, técnica utilizada ampliamente para la identificación de distintos géneros bacterianos pero muy poco explotada en micobacterias. Este procedimiento presenta un gran poder de discriminación entre cepas estrechamente relacionadas a nivel genómico y solo requiere un par de iniciadores universales. Por otro lado, es factible realizar el protocolo en un solo día de trabajo, lo que permite la identificación en un periodo corto de tiempo y a menor costo.

El objetivo del presente trabajo consistió en utilizar la técnica de ERIC-PCR para la diferenciación de cepas de *Mycobacterium* incluso a las estrechamente relacionadas del complejo *M. tuberculosis*, previamente aisladas de muestras clínicas y conservadas en congelación, así como el uso de las técnicas moleculares PCR-RFLP del gen *gyrB*, PCR-RFLP del gen *hsp65* y PCR-loci independientes para la identificación de especies y diferenciación de cepas aisladas y directamente del ADN obtenido a partir de muestras clínicas.

ANTECEDENTES

Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* comprende un grupo de microorganismos muy diverso, de amplia distribución en la naturaleza. Se han descrito más de 100 especies, 25 de las cuales han sido identificadas como agentes infecciosos frecuentes para el humano (Cortinas y col., 2002; Jiménez-Pajares y col., 2005). Además de los microorganismos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, existen especies saprófitas, que pueden actuar como patógenos oportunistas y causar enfermedad pulmonar o infecciones en otras localizaciones anatómicas (Cortinas y col., 2002).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende micobacterias de crecimiento lento causantes de tuberculosis en animales y humanos, difíciles de diferenciar por métodos bacteriológicos convencionales. El grupo incluye *M. tuberculosis* causante de tuberculosis en humanos; *M. bovis* que infecta principalmente el ganado bovino, pero también causa tuberculosis en humanos; *M. bovis* BCG, el derivado atenuado de la cepa de *M. bovis* comúnmente utilizado como vacuna contra *M. tuberculosis*; *M. africanum*, especie causante de tuberculosis humana en el continente africano, y *M. cannetti*, una subespecie de *M. tuberculosis* reportada en tuberculosis humana (Arráiz y col., 2006; Richter y col., 2003); *M. caprae* y *M. microti* que infectan al ganado caprino y a pequeños roedores, respectivamente, y *M. pinnipedi* es la especie que causa tuberculosis en pinnípedos y por el momento no se han descrito casos de enfermedad en el humano (Herrera-León y col., 2009).

Las micobacterias no tuberculosas pueden ser saprófitas, patógenas u oportunistas, entre ellas se incluyen especies de rápido y de lento crecimiento (Kasai y col., 2000). A diferencia de *M. tuberculosis* y *M. leprae* éstas no son patógenos obligados, por lo cual su hábitat general es el medio ambiente

(Castro y col., 2007; Da Mata Jardín y col., 2009). Se han encontrado en el agua, el suelo y la vegetación; sin embargo, algunas tienen la habilidad de infectar a los animales y al humano, ya que poseen capacidad infecciosa (Castro y col., 2007).

Las especies de *Mycobacterium* más comúnmente encontradas a nivel mundial son *M. avium*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*. Entre las enfermedades producidas por las micobacterias no tuberculosas se encuentran las asociadas a infecciones posquirúrgicas, entre las que se encuentran los procedimientos estéticos, como mesoterapias y lipo-esculturas, la aparición de abscesos después de una inyección (Da Mata Jardín y col., 2009), infecciones asociadas con catéteres, enfermedades cutáneas diseminadas, enfermedad pulmonar y enfermedades del sistema nervioso central que afectan especialmente a los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y a los niños (Castro y col., 2007).

La disminución en la prevalencia de tuberculosis en el mundo desarrollado durante los últimos años se ha visto acompañada por un aumento en la frecuencia de infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas. No está muy claro si esto corresponde con un aumento real en la prevalencia de la enfermedad o se debe a que las micobacteriosis están siendo reconocidas con más frecuencia por los médicos, aunado a una mayor capacidad de los microbiólogos para detectar e identificar las micobacterias más inusuales y de difícil aislamiento (Godoy y col., 2008).

Características Microbiológicas

Las especies que pertenecen al género *Mycobacterium*, son bacilos no móviles que poseen un genoma con alto contenido de G+C (Godoy y col., 2008; Hansted y col., 2007); su pared celular contiene concentraciones elevadas de lípidos los cuales son los responsables de la tinción resistente al ácido que

toman las bacterias con el colorante rojo carbol fucsina, razón por la que a estos microorganismos se les llama también ácido-alcohol resistentes (Figura 1) (Abbas y col., 2004).

La superficie micobacteriana consta de una pared gruesa, conformada por cuatro capas, la más interna es el glicopéptido o peptidoglicano, ésta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez (Ramírez y col., 2002); hacia el exterior, se encuentran otras tres capas compuestas la primera por polímeros de arabinosa y galactosa, la segunda por ácidos micólicos (Ramírez y col., 2002) (a los cuales se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura) (Gorocica y col., 2005); y la tercera formada por lípidos como los sulfolípidos que se caracterizan por estar altamente glicosilados, lo que da lugar a moléculas como los lipoarabinomananos (LAM) (Ramírez y col., 2002), moléculas complejas que se extienden desde la membrana plasmática hasta la superficie celular y que tiene un papel fundamental en la patogénesis de la bacteria (Gorocica y col., 2005) (Figura 2).

La mayoría de las especies de *Mycobacterium* se adaptan fácilmente al crecimiento en sustratos muy simples, y utilizan amoníaco o aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Por otro lado, generalmente son capaces de utilizar glicerol como fuente de carbono, en presencia de sales minerales. La temperatura óptima de crecimiento varía ampliamente según la especie desde 25 a más de 40°C (Ryan y col., 2004).

Algunas especies pueden ser difíciles de cultivar y puede llevar más de dos meses desarrollar su cultivo; también pueden tardar más de 20 días para completar su ciclo de división, por lo que las micobacterias que forman colonias claramente visibles a corto plazo (en un período de 7 días) se denominan de crecimiento rápido, mientras que las que requieren períodos prolongados para su desarrollo se denominan de crecimiento lento (Ryan y col., 2004).

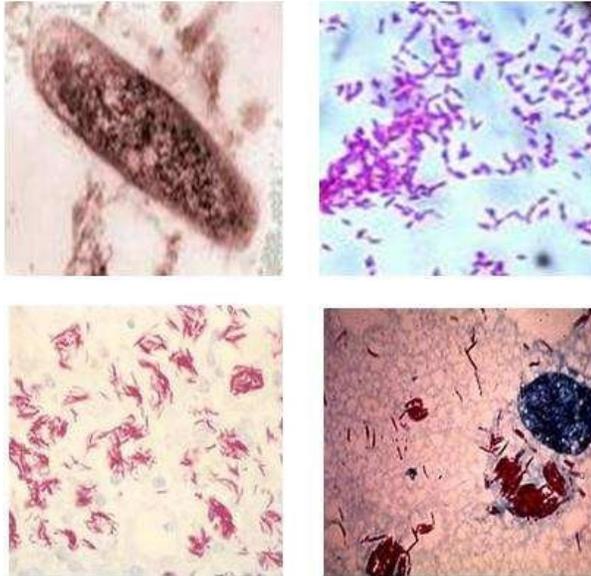


Figura 1. Morfología microscópica de *M. tuberculosis* (fotografía electrónica), *M. bovis* (tinción Ziehl Neelsen), *M. avium* (fotografía de cultivo) y *M. leprae* (fotografía de muestra clínica).

Fuente: www.educa.madrid.org/.../Bacilo_tuberculosis.gif

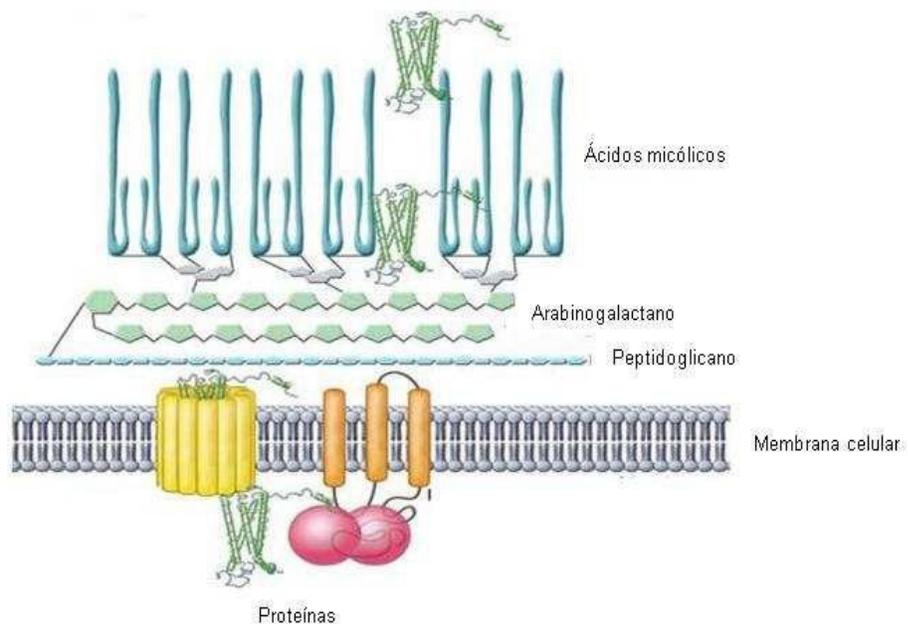


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular micobacteriana.

Fuente: Ernst y col., 2007.

Tuberculosis

La TB, es la enfermedad de origen infeccioso que más daño ha causado a la especie humana, en número de enfermos y en número de muertes, a lo largo de toda su historia (Blomm y col., 1992; Caminero, 2007). Es una infección bacteriana crónica, causada principalmente por *M. tuberculosis*, una bacteria que afecta particularmente los pulmones, pero puede afectar también otros órganos del cuerpo. Así, *M. tuberculosis*, es responsable del 26 % de todas las muertes prevenibles y 7 % de todas las muertes a nivel mundial (Gay y col., 2006).

Utilizando la prueba cutánea de la tuberculina, los epidemiólogos han estimado que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, con 9 millones de casos de tuberculosis activa y más de 1.7 millones de muertes cada año (Domínguez y col., 2008; Gay y col., 2006).

Esta prevalencia global podría incrementarse dramáticamente en los próximos años por la pandemia de síndrome de inmunodeficiencia adquirida, el incremento en el número de usuarios de drogas intravenosas, los cambios en la estructura social, el incremento de la migración de personas de países con altas tasas de incidencia hacia países desarrollados, el envejecimiento de la población mundial, la transmisión activa en sitios con altos niveles de hacinamiento, como prisiones, y el decaimiento de los sistemas de salud (Gay y col., 2006).

Diagnóstico en el Laboratorio

El diagnóstico tradicional de la tuberculosis recae de manera importante en la observación de extendidos y del cultivo a partir de muestras clínicas, pero existen numerosos esfuerzos para desarrollar nuevas pruebas diagnósticas que

superen la baja sensibilidad y especificidad y la enorme pérdida de tiempo asociada con los períodos de incubación del cultivo (Cho, 2007; Domínguez y col., 2008).

Los dos principales problemas de los métodos tradicionalmente usados para la diferenciación de especies del complejo *M. tuberculosis*, son el tiempo que se requiere para obtener una identificación completa y la diversidad de técnicas requeridas para alcanzar resultados confiables (Telenti y col, 1993). Además, los métodos rutinarios requieren suficiente crecimiento bacteriano, no permiten una identificación específica de las especies micobacterianas y no pueden realizarse en laboratorios de rutina (Chimara y col., 2008; Niemann y col., 2000a).

La tuberculosis es diagnosticada por el examen clínico, a través del historial del paciente y pruebas diagnósticas *in vitro*. Por muchos años, la prueba intradérmica de la tuberculina ha permitido diagnosticar la tuberculosis latente y activa. Sin embargo, ésta tiene especificidad y sensibilidad nosográfica bajas (del 75 al 90% de los cultivos confirman la enfermedad activa). Esto produce muchos resultados falsos negativos y falsos positivos (Hansted y col., 2007).

El método considerado como estándar de oro para la identificación de tuberculosis es el cultivo de esputo, apoyado por un estudio radiológico. Sin embargo, estos procedimientos no permiten la detección del 100 % de los casos de tuberculosis pulmonar y su nivel de detección disminuye considerablemente en pacientes con tuberculosis extrapulmonar (Hansted y col., 2007).

La identificación rápida y precisa de las micobacterias a nivel de especie a partir de un cultivo positivo conlleva importancia clínica y epidemiológica. Además, permite la diferenciación entre patógenos habituales y oportunistas, definiendo la conducta terapéutica a seguir (Richter y col., 2003).

Identificación de Especies de *Mycobacterium*

Tradicionalmente, la identificación de especies de *Mycobacterium* depende de características fenotípicas (biológicas y bioquímicas) tales como velocidad de crecimiento, producción de pigmento, prueba de niacina, prueba de reducción de nitratos y prueba de hidrólisis de Tween80, entre otras (Cho, 2007; Godoy y col., 2008; Richter y col., 2003).

Estas pruebas precisan de 3 a 6 semanas para lograr la obtención de resultados, lo que repercute en un manejo terapéutico empírico prolongado, además de que el resultado puede ser ambiguo o llegar a ser erróneo debido a que las técnicas son poco reproducibles; la expresión fenotípica dentro de una misma especie es variable y, entre otros casos, varias especies pueden tener las mismas características bioquímicas (Cortinas y col., 2002; Richter y col., 2003). Esto puede apreciarse en la Tabla I, donde se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a aislados, y las diferencias en las expresiones bioquímicas que se presentaron, incluso en cepas de la misma especie.

La identificación de *M. bovis* tradicionalmente se ha basado en claras diferencias fenotípicas y propiedades bioquímicas cuando se compara con otros miembros pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. *M. bovis* muestra una colonia de forma disgónica en el medio Löwenstein-Jensen, es negativo para la acumulación de niacina y para la reducción de nitrato; en contraste *M. tuberculosis* muestra crecimiento eugónico, es positivo para la acumulación de niacina y reducción de nitrato (Kubica y col., 2006). También se ha observado que los aislados de *M. tuberculosis*, pero no los de *M. bovis*, inducen un cambio de color en el medio púrpura de bromocresol, del medio azul a amarillo (como se muestra en la figura 3) dependiente del pH (Kubica y col., 2006).

El desarrollo de las pruebas fenotípicas, mencionadas anteriormente, es incómodo, laborioso, requiere demasiado tiempo y en ocasiones los resultados

Tabla I. Identificación mediante pruebas bioquímicas de cepas estudiadas por Godoy y colaboradores (2008).

Número de muestra	Especies	Vel	Catalasa		N	A3	U	Fe	T80	T	Sal	MC	C	I	M	Pp
			TA / 68°C													
1	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	L	+	-	+	-	-		+	+	-	-	+	+	+	-
2	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	L	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3	Complejo <i>M. avium</i>	L	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
4	Complejo <i>M. avium</i>	L	+	+	-	-	-		+	+	-	-	-	-	-	-
5	<i>M. fortuitum</i>	R	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
6	<i>M. fortuitum</i>	R	+	+	+	-	-		-		+	+	-	-	-	-
7	<i>M. goodii</i>	L	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	EC
8	<i>M. goodii</i>	L	+	+	-	-	-		+		+	+	-	+	-	EC
9	<i>M. marinum</i>	R	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
10	<i>M. marinum</i>	R	+	+	-	-	-		-	+	+	+	-	+	-	+
11	<i>M. chelonae</i> subespecie <i>abscessus</i>	R	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
12	<i>M. chelonae</i> subespecie <i>abscessus</i>	R	+	+	-	-	-		+	+	+	+	-	-	-	-

Vel=Velocidad de crecimiento; R=Crecimiento Rápido; L=Crecimiento Lento; TA=Temperatura Ambiente; N=Nitratos; A3=Arilsulfatasa de 3 días; U=Ureasa; Fe=Captación de Hierro, T80=Tween 80; T=Telurito; Sal=Cloruro de Sodio; MC= Crecimiento en McConkey; C=Citrato; I=Inositol; M=Manitol; Pp=Producción de pigmento; EC=Escotocromógena. Fuente: Godoy, 2008.

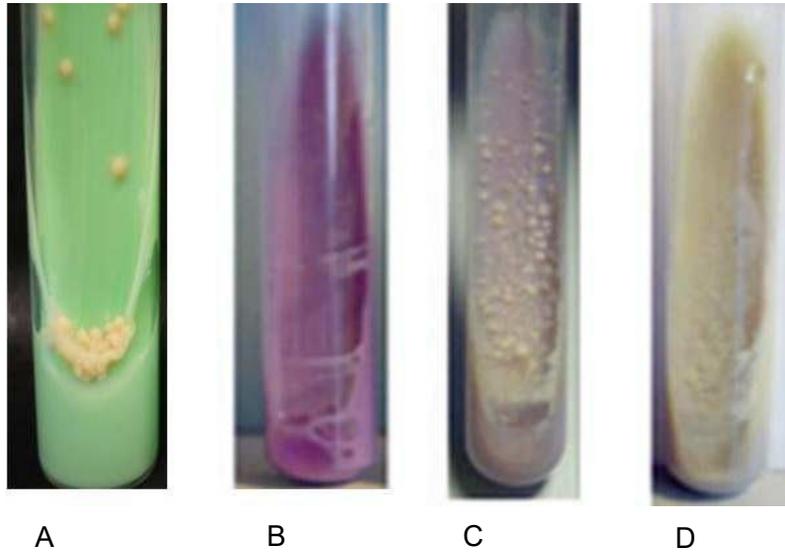


Figura 3. Crecimiento en medio Löwenstein-Jensen de *M. tuberculosis* (A) y crecimiento en medio Bromocresol de *M. bovis* (B), *M. fortuitum* (C), y *M. tuberculosis* (D). Fuente: Kubica y col, 2006

son inexactos. Esta situación ha condicionado que otros métodos, como el análisis de ácidos micólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), y los sistemas de identificación de especies basados en la secuenciación de bases han sido desarrollados y utilizados ampliamente. El análisis de ácidos micólicos por HPLC proporciona un poder de discriminación entre 50 especies y puede utilizarse en equipos semi-automáticos con un mínimo de muestra, sin embargo el instrumento es costoso al igual que su mantenimiento (Cho, 2007).

Otras técnicas como la cromatografía de capa fina, la cromatografía de gases-líquidos, han sido aplicadas en la identificación de especies de micobacterias. Sin embargo estos procedimientos suelen ser engorrosos, no son lo suficientemente discriminativos y son costosos, por lo que sólo son accesibles para laboratorios clínicos de referencia. Las técnicas serológicas pueden ser de gran utilidad en determinadas ocasiones pero, tanto su especificidad como sensibilidad son insatisfactorias (Yzquierdo y col., 2007).

Técnicas Moleculares

Actualmente, los métodos alternativos de identificación provienen del desarrollo de técnicas moleculares para la identificación genotípica. Estas técnicas están basadas en la amplificación de ADN bacteriano mediante PCR, seguidas por la digestión con diferentes enzimas de restricción y finalmente, el estudio de los polimorfismos generados por la digestión enzimática, la hibridización con sondas específicas, o la secuenciación de cadenas nucleotídicas (Cortinas y col., 2002; Katoch, 2004).

La introducción de técnicas moleculares para la identificación de *Mycobacterium* en la rutina del laboratorio clínico ha proporcionado ventajas respecto a la identificación fenotípica como lo son la reducción del tiempo del análisis de los aislamientos clínicos (36 a 72 horas en lugar de 3 a 6 semanas)

y la identificación definitiva no depende de criterios subjetivos (Cortinas y col., 2002).

Las técnicas moleculares parecen ser una opción para la detección de nuevos casos de tuberculosis (Cho, 2007), sin embargo no se usan masivamente para confirmar la presencia de *M. tuberculosis* en las muestras biológicas positivas a bacterias del complejo *M. tuberculosis* (Ernst y col., 2007). Aunque *M. tuberculosis* es el principal agente causal de la tuberculosis humana, cada especie y subespecie del complejo *M. tuberculosis* tiene la capacidad potencial de infectar al humano (Huard y col., 2003). Una posible explicación de este fenómeno se basa en el alto grado de conservación evolutiva de los diferentes miembros del complejo (*M. canetti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*) (Ernst y col., 2007).

La estrecha relación entre los miembros del complejo *M. tuberculosis* ha sido demostrada mediante técnicas de hibridación ADN-ADN, electroforesis de enzimas y secuenciación del ARN ribosomal 16S, así como de la región espaciadora 16S a 23S del ARN ribosomal. No obstante esta cercana relación genética entre las distintas especies micobacterianas, en diversos estudios se han demostrado claras diferencias en su patogenicidad, distribución geográfica, preferencia de hospedero e importancia para la enfermedad en el humano (Chimara y col., 2004; Niemann y col., 2000a). Además existe escasa evidencia que sugiera la transferencia horizontal de genes entre miembros de este complejo (Chimara y col., 2004; Ernst y col., 2007).

Al respecto, diversos estudios han encontrado asociaciones entre el genotipo de las micobacterias y los fenotipos humanos. Por ejemplo, una etnia china en San Francisco, California, tiene mayor probabilidad de adquirir y desarrollar tuberculosis causada por una cepa de *M. tuberculosis* de linaje proveniente del este asiático que de cualquier otro linaje filogeográfico (Ernst y col., 2007).

No obstante lo anterior, en la actualidad se desconoce la medida en que estas asociaciones hospedero-patógeno se forman por factores sociológicos y/o epidemiológicos *versus* determinantes biológicas (Ernst y col., 2007). De ahí la importancia de contar con las herramientas necesarias para la identificación de especies mediante pruebas genotípicas y de no correr el riesgo de obtener resultados variables por el uso exclusivo de los métodos de identificación fenotípica. Por ejemplo, este problema se presentó con las cepas de micobacterias aisladas de 8 pacientes residentes de Kazajastán, que mostraron marcadores moleculares de *M. bovis* pero pruebas bioquímicas y de crecimiento intermedios entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Kubica y col., 2006).

De todos los avances de laboratorio que se han producido en las últimas décadas, los más prometedores siguen siendo las técnicas de amplificación genética. Las técnicas que utilizan ARN, que son las más sensibles, no consiguen una sensibilidad superior al 85% en los casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopía negativa, y al 75% en los de tuberculosis extrapulmonar (Caminero, 2007).

Por otro lado, la amplificación específica *in vitro*, de regiones del genoma del patógeno, permite un diagnóstico rápido de tuberculosis con un mayor grado de sensibilidad y especificidad que los métodos tradicionales (Gay y col., 2006). Una de las ventajas de las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre las técnicas cromatográficas y otros métodos, es su aplicabilidad directa a las muestras clínicas, tales como muestras de expectoración, cuando las muestras poseen suficientes bacilos para dar positiva la tinción ácido-resistente (Cho, 2007).

Las técnicas de amplificación genética son altamente sensibles (70-100%) y específicas (80-100%), y bajo condiciones óptimas pueden detectar de 1 a 10 organismos; y si los sistemas están estandarizados adecuadamente, evaluados y se toman precauciones para evitar la contaminación, los ensayos

pueden ser muy útiles en la confirmación temprana en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar (Katoch, 2004).

La identificación de micobacterias a nivel de especie es crucial, ya que proporciona una gran cantidad de información útil sobre la epidemiología y facilita el éxito sobre el tratamiento de los pacientes. Las técnicas moleculares ofrecen una manera rápida, específica y menos costosa la identificación de especies de micobacterias (Bannalikal y col., 2006).

Un elemento adicional, que señala la importancia de identificar a las especies dentro del género *Mycobacterium* es el constante incremento de las infecciones por micobacterias no tuberculosas, particularmente entre pacientes ancianos o infectados por el VIH (Cho, 2007).

PCR para loci independientes. El genoma de las especies del complejo *M. tuberculosis* se caracteriza por la presencia de numerosas secuencias de ADN repetitivas, mismas que pueden ser empleadas para el análisis epidemiológico de los microorganismos. La metodología de tipificación más utilizada, dada la gran homología del ADN existente entre las distintas especies del complejo *M. tuberculosis*, es el análisis del polimorfismo en el tamaño de restricción del producto amplificado (RFLP, por sus siglas en inglés) con estas secuencias repetidas (Retamal y col., 2003).

Existe un método estandarizado de RFLP, basado en la secuencia de inserción IS6110, para la genotipificación de estos microorganismos. Aunque existe una gran variedad de patrones de RFLP-IS6110, estos tienden a parecerse entre cepas confinadas a una localidad geográfica, o aisladas desde brotes epidémicos con un origen común. No obstante, se han descrito algunas cepas que no contienen esta secuencia de inserción o bien la presentan en un bajo número de copias, disminuyendo el poder de discriminación de RFLP-IS6110 por lo que se requiere de técnicas adicionales para su adecuada genotipificación (Retamal y col., 2003).

La metodología RFLP-IS6110 es la técnica de referencia para la genotipificación de *M. tuberculosis* y fue estandarizada por Van Embden y col.

Este método está basado en las variaciones encontradas en el número de copias y localización en el genoma de la secuencia de inserción IS6110 que ocurren de una cepa a otra, patrones diferentes de RFLP sugieren cepas epidemiológicamente no relacionadas y patrones idénticos representan la transmisión reciente de la cepa dentro de la población (Hernández y col., 2008). Varios estudios señalan que IS6110 está presente en un porcentaje variable de cepas de *M. bovis* y han expresado la utilidad de la técnica con las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 para la identificación y tipificación de cepas del complejo *M. tuberculosis*, ya que ambas secuencias son específicas de las especies bacterianas que pertenecen a este complejo, pero su presencia y número de copias varía entre cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Retamal y col., 2003). La secuencia de inserción IS6110 se encuentra en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* y en mayor número de copias, mientras que IS1081 se encuentra generalmente con mayor frecuencia y en mayor número en cepas de *M. bovis* (Retamal y col., 2003).

Por esta razón, en escenarios epidemiológicos donde no se conocen las características genotípicas de las secuencias de inserción en la población de cepas circulantes se necesitan estudios previos de estos agentes con el objetivo de seleccionar las secuencias de ADN más apropiadas para la investigación epidemiológica molecular (Retamal y col., 2003)

La evaluación de ciertos loci independientes permite la diferenciación individual a nivel de las subespecies del complejo *M. tuberculosis* y permite su diferenciación de otras micobacterias no tuberculosas de importancia clínica. El panel de tipificación mediante PCR evalúa loci independientes que varían debido a deleciones regionales cromosómicas unidireccionales, sin embargo la principal limitante es que no puede diferenciar a *M. tuberculosis* de *M. africanum* subtipo II. Se sabe que *M. africanum* subtipo II posee ciertas

características fenotípicas y biogeográficas únicas, en comparación con *M. tuberculosis*, pero actualmente no existe ningún protocolo sencillo, basado en el análisis del ADN, capaz de identificar todas las cepas de *M. africanum* subtipo II (Huard y col., 2003).

Por otro lado los aislados del complejo de *M. tuberculosis* pueden ser diferenciados por el polimorfismo de secuencias largas o regiones de diferencia (RD, por sus siglas en inglés), y de acuerdo con su distribución en el genoma; la presencia o ausencia de deleciones particulares ha sido propuesto como un punto discriminativo como lo es la falta de la región RD12 para *M. bovis* (Kubica y col., 2006).

Estas regiones de diferencia (RD) a menudo representan cambios irreversibles en la composición genética que probablemente sean resultado de los errores en la replicación del ADN, o del cambio de elementos genéticos. Los loci RD pueden ser cambios neutrales o mutaciones positivas, como la deleción de *katG* como un medio de resistencia adquirida hacia el fármaco isoniazida en algunas cepas de *M. tuberculosis*, o como lo es también la inserción o escisión de los elementos IS6110 (Huard y col., 2006).

Una comparación entre los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* revela que las secuencias RD1, RD2 y RD3 están presentes en *M. bovis*, y que el antígeno de secreción ESAT6 y la proteína de filtrado de cultivo CFP10 han sido identificadas como antígenos inmunodominantes encontrados en RD1, la proteína 21 (CFP21) y la proteína MPT64 de *M. tuberculosis* en RD2, antígenos que han mostrado ser blancos importantes para estudios de reactividad inmune en varios modelos de investigación (Kalra y col., 2009).

Así, podría concluirse que los ensayos de PCR para loci independientes ayudan a una identificación rápida de micobacterias patógenas incluyendo a *M. tuberculosis* de aislados de cultivo o bien directamente de muestras clínicas (Katoch, 2004).

PCR-RFLP del gen *hsp65*. El uso de la PCR en la detección de *M. tuberculosis* ha sido una herramienta muy útil para el diagnóstico de la Tb. Secuencias específicas de DNA de la bacteria han sido utilizadas, incluyendo el gen que codifica a la proteína de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) de 65 kDa, la secuencia de inserción IS6110 y el gen codificante para la proteína de 38 kDa, entre otros (Negi y col., 2007).

El método para la identificación rápida de micobacterias a nivel de especie, basado en la evaluación de productos amplificados mediante PCR del gen que codifica la proteína *hsp65* de 65 kDa fue desarrollado por Telenti y col., (1993). Este procedimiento se basa en la amplificación por PCR de un segmento polimórfico de 440 pb que posteriormente es digerido con las enzimas de restricción *BstE* II y *Hae* III en reacciones individuales (Araya y col., 2006; Telenti y col., 1993). Esta técnica molecular, referida como PRA-*hsp65*, ofrece la promesa de la identificación exacta y de bajo costo para la especies de micobacterias no tuberculosas y parece ser lo suficientemente confiable como una metodología de rutina en laboratorios de referencia (Chimara y col., 2008).

El gen que codifica para la proteína de 65 kDa está presente en todas las especies de micobacterias y contiene epítomos que son únicos, así como comunes a varias especies de micobacterias. (Bannalikal y col., 2006), y esto le ha proporcionado cierta invalidez para distinguir entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, lo cual puede ser atribuido a la homología en el ADN entre estas dos especies (Bannalikal y col., 2006).

Aunque el PRA del gen *hsp65* no puede diferenciar entre los miembros del complejo *M. tuberculosis*, diversos grupos de investigación han adoptado la técnica para la diferenciación de especies de micobacterias no tuberculosas, como lo son los miembros del complejo de *M. avium*, e incluso en la diferenciación de *M. cannetti* la cual se encuentra dentro del complejo *M. tuberculosis* (Bannalikal y col., 2006; Castro y col., 2007).

PCR-RFLP del gen *gyrB*. El análisis del polimorfismo en el tamaño de restricción del producto amplificado por PCR (PCR-RFLP) del gen *gyrB* (*gyrB*-RFLP), es una técnica rápida y fácil de utilizar para discriminar entre los diversos miembros del complejo *M. tuberculosis* (Niemann y col., 2000a; Richter y col., 2003), ya que permite la diferenciación de *M. bovis* subespecie *bovis*, *M. bovis* subespecie *caprae*, *M. microti* y *M. africanum* subtipo I (Richter y col., 2003).

Los iniciadores utilizados permiten la amplificación de un segmento de 1,020 pb del gen *gyrB* (Richter y col., 2003); e incluye la digestión de éste producto con las enzimas de restricción RsaI, TaqI, y SacII (Niemann y col., 2000a). Sin embargo, la aplicación de *gyrB*-RFLP para estudios epidemiológicos es aún limitada, debido a que no permite diferenciar *M. tuberculosis* de *M. africanum* subtipo II, a *M. canetti* y *M. africanum* subtipo I de *M. pinnipedii*, y a *M. bovis* de *M. bovis* BCG (Chimara y col., 2004).

ERIC-PCR. Las regiones consenso intergénicas repetitivas de las enterobacterias (ERIC, por sus siglas en inglés), que fueron primeramente descritas en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, también están presentes en *M. tuberculosis* (Sechi y col., 1998). Las ERIC poseen una longitud de 126 pb y parecen estar presentes a lo largo del genoma, tanto en regiones que son transcritas, como en aquellas que no lo son. Las secuencias ERIC son altamente conservadas a nivel nucleotídico pero su distribución a lo largo del cromosoma bacteriano difiere entre especies (Hulton y col., 1991).

Además, con la amplificación mediante PCR de las regiones inter-ERIC (ERIC-PCR), se han obtenido bandas de diferente tamaño, que representan polimorfismos en las distancias entre los elementos repetitivos (Shuhaimi y col., 2001) lo que ha permitido la diferenciación a nivel de especie en bifidobacterias (Ventura y col., 2003) y a nivel de cepa en lactobacilos (Bolado-Martínez y Acedo-Félix, 2009). Los iniciadores utilizados están diseñados de tal forma que

la amplificación se produce entre las copias de la secuencia ERIC, si las posiciones de las copias varían entre cepas diferentes; los productos amplificados ofrecen una huella digital única cuando son observados en un gel, lo cual indica que las secuencias ERIC exhiben variación específica en sus ubicaciones (Wilson y col., 2006).

La técnica basada en ERIC-PCR ha sido utilizada como una herramienta para la tipificación de aislamientos de *M. tuberculosis*, y ha mostrado su utilidad para diferenciar *M. avium* subespecie *paratuberculosis* de especies relativamente cercanas, incluyendo a las del grupo *M. chelonae-abscessus* (Mello y col., 2006; Sampaio y col., 2006).

En aislamientos de *M. tuberculosis* se encontró que los niveles de diferenciación obtenidos mediante ERIC-PCR son mayores a los obtenidos mediante el análisis de la región IS6110 (Sechi y col., 1998). Estos autores estudiaron 71 aislamientos clínicos, de los cuales se obtuvieron 59 perfiles distintos, lo que permite apreciar el gran poder de discriminación de ERIC-PCR entre cepas estrechamente relacionadas a nivel genómico y su potencial aplicación masiva para la tipificación de las cepas en estudios de epidemiología molecular (Sechi y col., 1998).

Otra de las ventajas de la técnica ERIC-PCR es que requiere de sólo un par de iniciadores universales y puede realizarse en un sólo día de trabajo, permitiendo así la diferenciación de cepas a partir de muestras clínicas en un periodo muy corto de tiempo y a un bajo costo, en comparación con las otras técnicas moleculares anteriormente mencionadas (Sechi y col., 1998).

Además, la identificación de especies en micobacterias no tuberculosas es una etapa crítica en el manejo de los pacientes infectados, ya que del resultado obtenido depende la posibilidad de descartar o confirmar una patología concordante con micobacteriosis. La identificación correcta de las micobacterias no tuberculosas, sumada al estudio de susceptibilidad, permite la elección de un esquema terapéutico adecuado, si se trata de una especie

potencialmente patógena, aislada en forma repetida y en cantidad abundante (Araya y col., 2006). Es por tanto importante, el desarrollo de métodos que proporcionen resultados rápidos y confiables que puedan ser utilizados en los Laboratorios de Referencia de Micobacterias (Araya y col., 2006). Uno de estos procedimientos podría ser ERIC-PCR, que además de ser un método de simple y con alta reproducibilidad, puede discriminar a pesar de la estrecha relación genética entre las especies de micobacterias (Mello y col., 2006).

El objetivo de este trabajo fue el de utilizar las técnicas moleculares PCR-RFLP del gen *hsp65*, PCR-RFLP del gen *gyrB*, PCR-para loci independientes, y en particular interés la técnica de ERIC-PCR para la diferenciación a nivel genotípico de cepas de micobacterias, incluyendo a las pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de cultivo y de muestras clínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Utilizadas

Para el presente trabajo se utilizaron tres cepas Tipo: *Mycobacterium avium-intracellulare* (proporcionada al Laboratorio Estatal de Salud Pública por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica), *Mycobacterium bovis* AN5 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Estas cepas se mantienen en ultracongelación a -70°C en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) de Hermosillo, Sonora. Adicionalmente se utilizaron 31 aislamientos de micobacterias obtenidas de muestras clínicas humanas y de origen bovino. Todas las cepas han sido caracterizadas previamente mediante técnicas fenotípicas por el Laboratorio de de agentes patógenos del LESP del Estado de Sonora y se mantienen en ultracongelación a -70°C.

Extracción de ADN

En primer lugar se procedió al cultivo de los microorganismos en el medio sólido de bromocresol e inmediatamente después se incubaron a 37°C hasta el desarrollo adecuado de los microorganismos (aproximadamente 2 semanas). A continuación se procedió con la extracción y purificación del ADN utilizando la resina quelante Chelex 100 (Iralu y col., 1993; Sampaio y col., 2006; Yang y col., 2008). Cada muestra (de 3 a 4 asadas del cultivo) fue suspendida en TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1mM), posteriormente la alícuota se centrifugó a 4,000 g por 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida agregando 100 µL de resina Chelex 100, Sigma (10% p/v), se incubó a 56°C por 30 minutos; pasado este tiempo se volvió a incubar a 95°C por 30 minutos.

Por último, la suspensión se centrifugó a 10,000 g por 5 minutos para luego transferir el sobrenadante a otro tubo y guardarlo en congelación hasta su utilización.

Cabe mencionar que también se preservaron alícuotas, en el medio skim milk (Sigma, USA), de las cepas desarrolladas en el medio de bromocresol. Estas se conservan a temperatura de ultracongelación (-70°C) para su conservación y para posibles estudios posteriores.

Identificación de Especie

PCR-RFLP del gen *gyrB*

Debido a que la mayoría de los aislamientos clínicos pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, primero se procedió al análisis del polimorfismo en los tamaños de restricción del producto amplificado por PCR (PCR-RFLP) del gen *gyrB* (Chimara y col., 2004; Niemann y col., 2000a).

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µL y contenía 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (Promega, USA), MgCl₂ 1.5 mM, Green GoTaq Flexi Buffer 1X (Promega, USA), 800 nM de cada uno de los iniciadores MTUB-F (5' -TCGGACGCGTATGCGATATC- 3') y MTUB-R (5' -ACATACAGTTCCGACTTGCG- 3') (Sigma Genosys, USA), 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega, USA) y 5 µL de ADN. Para la amplificación se utilizó un ciclo inicial de desnaturalización de 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de amplificación de 94°C por 60 segundos, 65°C por 60 segundos, y 72°C por 90 segundos, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos (i-Cycler BioRad, USA).

Para observar la presencia del amplicón y verificar su tamaño e integridad se realizó una electroforesis (MGU 502-T CBS Scientific Co., USA)

horizontal en gel de agarosa (Sigma, USA) al 2% (p/v) en buffer TBE 5X (Tris 50 mM, ácido bórico 40 mM, EDTA 0.5 M), con Sybr safe (Invitrogen, USA). Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder; Promega, USA). El producto de amplificación se visualizó en un transiluminador (TFX-20.MC, Vilber Lourmat, Francia) y se capturó la imagen con una cámara fotográfica (EP H.7 Gel Cam, Polaroid, USA).

Una vez verificada la presencia del producto de amplificación, se procedió a digerir el mismo con las enzimas de restricción *TaqI*, *SacII* y *RsaI* (NE Biolabs, USA) en reacciones individuales para cada enzima de restricción. Un volumen total de 4 μ L del producto de amplificación obtenido, fue digerido con una mezcla de reacción que contenía el amortiguador NEbuffer 4 y la enzima correspondiente (25 U de *RsaI*, 15 U *SacI* y 60 U *TaqI*). La digestión enzimática se llevó a cabo por 60 minutos a 37°C para *RsaI*, 60 minutos a 37°C para *SacII*, y 60 minutos a 65°C para *TaqI*.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión, se procedió a realizar la electroforesis de los productos en un gel de agarosa al 2% (p/v) en buffer TBE 5X con Sybr safe. En cada corrida se incluyeron 2 carriles con marcadores de peso molecular 50 y 100 pb DNA Ladder (NE Biolabs, USA). Los patrones de bandas, obtenidos por las digestiones parciales, se visualizaron en el transiluminador, y se fotografiaron. La estimación del tamaño, de cada una de las bandas que conforman el patrón de restricción, se realizó por comparación con la distancia de migración del marcador, utilizando el programa Bionumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). La identificación se realizó al comparar los patrones obtenidos en cada caso con patrones descritos en la literatura.

PCR para Loci Independientes

Para la amplificación de Rv3120 (RD12), la mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50 μ L y contenía 200 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, $MgCl_2$ 3 mM, DMSO al 5% (v/v), Green GoTaq Flexi Buffer 1X, 2 μ M de cada uno de los iniciadores Rv3120F (5'-GTCGGCGATAGACCATGAGTCCGTCTCCAT -3') y Rv3120R (5'-GCGAAAAGTGGGCGGATGCCAGAATAGT-3') (Sigma Genosys, USA), 1 U de Taq ADN polimerasa y 5 μ L de ADN (Huard y col., 2003).

Para la amplificación de Rv3877/8 (RD1), la mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50 μ L y contenía 200 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, $MgCl_2$ 3 mM, DMSO al 5% (v/v), Green GoTaq Flexi Buffer 1X, 2 μ M de cada uno de los iniciadores Rv3877/8F (5'-CGACGGGTCTGACGGCCAAACTCATC-3') y Rv3877/8R (5'-CTTGCTCGGTGGCCGGTTTTTCAG-3') (Sigma Genosys, USA), 1 U de Taq ADN polimerasa y 5 μ L de ADN (Huard y col., 2003).

Para ambos procedimientos de amplificación se utilizó un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por 2 minutos, 25 ciclos de amplificación de 94°C por 60 segundos, 60°C por 60 segundos, y 72°C por 60 segundos, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos.

La presencia e integridad de los amplicones se verificó en un gel de agarosa al 2% (p/v) en buffer TBE 5X, con Sybr safe. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb. La estimación del tamaño de cada una de las bandas que conforman el patrón de restricción, se realizó por comparación con la distancia de migración del marcador utilizando el programa Bionumerics.

PCR-RFLP del gen *hsp65*

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50 µL y contenía 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, MgCl₂ 1.5 mM, Green GoTaq Flexi Buffer 1X, 800 nM de cada uno de los iniciadores Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') y Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') (Sigma Genosys USA), 1.25 U de Taq ADN polimerasa, y 5 µL de ADN. Para la amplificación se utilizó un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 45 ciclos de amplificación de 94°C por 60 segundos, 60°C por 60 segundos, y 72°C por 60 segundos, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos.

La presencia de un amplicón de tamaño e integridad se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (p/v) en buffer TBE 5X, con Sybr safe. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 bp (Ladder; NE BioLabs, USA). El producto de amplificación obtenido se visualizó en un transiluminador y se capturó la imagen fotográfica.

Una vez verificada la presencia del producto de amplificación, se procedió a digerir el mismo con las enzimas de restricción *BstEII* (Invitrogen, USA) y *HaeIII* (Promega, USA) en reacciones individuales para cada enzima de restricción. Un volumen total de 4 µL del producto de amplificación obtenido fue digerido con una mezcla de reacción que contenía el buffer apropiado para cada enzima y la enzima correspondiente (Buffer D y 5 U de *BstEII*; Buffer React 2 y 5 U *HaeIII*). La digestión enzimática se llevó a cabo por 60 minutos a 60°C para *BstEII*, y 60 minutos a 37°C para *HaeIII*.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión, se procedió a realizar la electroforesis de los productos en un gel de agarosa al 4% (p/v) en buffer TBE 5X con Sybr safe. En cada corrida se incluyeron 2 carriles con marcadores de peso molecular de 50 y 100 pb (Ladder; NE Biolabs, USA). Los patrones de bandas, obtenidos por las digestiones parciales, se visualizaron en el

transiluminador, y se fotografiaron. La estimación del tamaño de cada una de las bandas que conforman el patrón de restricción, se realizó por comparación con la distancia de migración del marcador utilizando el programa Bionumerics. La identificación se realizó al comparar los patrones obtenidos en cada caso con patrones descritos en la literatura (Chimara y col., 2008; Telenti y col., 1993).

ERIC-PCR

A partir del ADN purificado se procedió a la amplificación mediante PCR de las regiones inter-ERIC (ERIC-PCR). Para ello se utilizaron las mismas condiciones utilizadas previamente en aislamientos de *M. tuberculosis* (Sechi y col., 1998).

Para la amplificación, la mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50 µL y contenía 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, MgCl₂ 3 mM, Green GoTaq Flexi Buffer 1X, 1 µM de cada uno de los iniciadores ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Sigma Genosys, USA), 1 U de Taq ADN polimerasa, y 5 µL de ADN. Para la amplificación se utilizó un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de amplificación de 94°C por 45 segundos, 52°C por 60 segundos, y 70°C por 10 minutos, finalizando con una extensión de 70°C por 20 minutos.

Una vez transcurrida la amplificación, se procedió a realizar la electroforesis de los productos en un gel de agarosa al 2% (p/v) en buffer TBE 5X con Sybr safe. En cada corrida se incluyeron 2 carriles con marcadores de peso molecular de 100 bp (Ladder; NE Biolabs, USA) y el marcador Lambda DNA/HindIII (Ladder; Promega, USA). Los patrones de bandas, obtenidos se visualizaron en el transiluminador y se fotografiaron. El análisis de los patrones de se realizó utilizando el programa Bionumerics.

Análisis de Patrones

Una vez obtenidos los patrones de restricción de las técnicas de PCR-RFLP del gen *gyrB*, *PRA-hsp65* y los patrones de bandas de ERIC-PCR, las imágenes fueron capturadas en el programa Bionumerics y se procedió al análisis de imágenes para la identificación de patrones. La formación de agrupamientos de acuerdo a similitudes y diferencias genotípicas, se realizó por el método de apareamiento sin ponderación utilizando medias aritméticas (UPGMA) y un análisis de agrupamientos de bandas utilizando el algoritmo DICE (Carriço y col., 2005).

Secuenciación de Productos de PCR

En casos muy específicos, la identificación final no fue posible por los métodos descritos anteriormente, por lo que se llevó a cabo la purificación de productos de PCR para su posterior envío a secuenciación. Primeramente, se utilizó el equipo comercial ilustra GFX PCR DNA (GE Healthcare, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones purificados fueron enviados al laboratorio MacroGen Korea para su secuenciación, los resultados fueron depurados utilizando el programa Chromas y las secuencias depuradas se alinearon con aquellas depositadas en la base de datos GenBank.

Aislamiento de ADN a Partir de Muestras Clínicas

Una vez concluida la etapa de identificación de aislamientos, se procedió a evaluar los procedimientos de identificación directamente en muestras clínicas. Para ello se utilizaron nueve muestras de expectoración enviadas, para cultivo de micobacterias, al Laboratorio Estatal de Salud Pública. Los especímenes se

sometieron a un tratamiento de descontaminación (Aldous y col., 2005) con N-acetil-L-cisteína (NALC) y NaOH al 2%, utilizando el equipo comercial Mycoprep (BD BBL, USA).

A la muestra se le añadió un volumen igual de NALC-NaOH, y se dejó reposar 15 minutos. Después se agregó amortiguador de fosfatos (0.01 M Na_2HPO_4 , 0.03 M KH_2PO_4) y se centrifugó por 20 minutos a 3,000 g. Posteriormente la pastilla fue resuspendida con amortiguador de fosfatos y nuevamente se centrifugó por 15 minutos a 13,000 g, la pastilla obtenida en este paso se resuspendió en 500 μl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), para después centrifugar 15 minutos a 13,000 g (Sigma), y por último el pellet obtenido en este paso se sometió a la extracción y purificación del ADN utilizando la resina Chelex 100 (Iralu y col., 1993; Sampaio y col., 2006; Yang y col., 2008). Para continuar con los procedimientos de identificación utilizados en los aislamientos clínicos y descritos anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Fenotípica de las Cepas

Como ya se mencionó las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas en el Laboratorio de Agentes patógenos del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora (LESP). Para ello se emplearon los ensayos de catalasa a temperatura ambiente y a 68°C, reducción de nitratos, producción de niacina, crecimiento en agar sangre, crecimiento en el medio de bromocresol. Estas pruebas son utilizadas en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), para la identificación rutinaria de micobacterias; en la tabla II se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas.

Extracción de ADN Bacteriano

Todos los procedimientos que involucraron la manipulación de la cepa, desde el cultivo hasta la obtención del ADN bacteriano, se llevaron a cabo en el LESP. Se extrajo el ADN genómico de los 31 aislamientos de micobacterias obtenidas de muestras clínicas humanas y de origen bovino; así como de las tres cepas Tipo: *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium bovis* AN5 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

En este trabajo se utilizó el método de extracción utilizando chelex 100, es una resina que captura iones metálicos polivalentes en solución. El efecto de este adsorbente es prevenir a través de su acción quelante la ruptura del ADN a altas temperaturas catalizada por los iones involucrados en las muestras de trabajo, quedando inactivadas las nucleasas y protegiendo el ADN (Buttler 2001; Zhang y col., 2001). Adicionalmente, la extracción con chelex 100 es

Tabla II. Identificación mediante pruebas bioquímicas de las cepas estudiadas.

Cepa	Especie	MBC	Nt	Nc	AS24h	AS48h	CTA	C68°C
H1709	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H2409	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H3109	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H3409	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H3509	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H5109	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H7509	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H8309	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H5909	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H7709	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H9709	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H4108	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H8708	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H11208	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H14308	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H21408	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H10407	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H10507	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H13407	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H8206	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H8306	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H13006	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	+	-	-	+	-
H37Rv	<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
H21308	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+
H28308	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+
H15309	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+
H16009	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+
B2109	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+
B1409	<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	+	-
B1709	<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	+	-
AN5	<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	+	-
B5509	<i>M. avium-intracellulare</i>	-	+	-	-	-	+	+
H11709	<i>M. avium-intracellulare</i>	+	+	-	+	+	+	+
INDRE	<i>M. avium-intracellulare</i>	-	+	-	+	+	+	+

MBC=Medio de Bromocresol; Nt=Nitratos; Nc=Niacina; AS24h=Agar sangre 24 horas; AS48h=Agar sangre 48 horas; CTA=Catalasa a Temperatura Ambiente; C68°C=Catalasa a 68°C.

menos costosa que otros métodos tradicionalmente empleados y todavía menos costosa que los equipos comerciales (De Armas y col., 2006; Yang y col., 2008). Esta resina ha sido utilizada para la extracción de ADN de especies de micobacterias a partir de aspirados gástricos y nasofaríngeos en niños, muestras de sangre y de tejidos embebidos en parafina (De Armas y col., 2006; Iralu y col., 1993; Wolf y col., 2008). El material genético de micobacterias obtenido utilizando chelex ha sido evaluado en diversos procedimientos como PCR-RFLP IS6110 (De Armas y col., 2006; Wolf y col., 2008). Por otro lado, el ADN bacteriano obtenido con este método, a partir de la microbiota intestinal también ha proporcionado buenos resultados al evaluar la técnica de ERIC-PCR (Yang y col., 2008).

Aislamiento de ADN a Partir de Muestras Clínicas

Las muestras clínicas (esputo, lavado bronquial o traqueal) son enviadas a los laboratorios de referencia con la finalidad de confirmar la infección por micobacteria(s) utilizando cultivos. No obstante, este tipo de muestras clínicas generalmente están contaminadas con microbiota normal, por lo que es necesaria la descontaminación de las muestras. Es por ello que en este trabajo se utilizó el equipo de Mycoprep, mismo que incluye N-acetil-L-cisteína (NALC), agente mucolítico que al combinarse con hidróxido sódico (NaOH) proporciona una efectiva digestión y descontaminación (Tomita y col., 2008).

La calidad del ADN obtenido por ésta técnica ha sido evaluada por medio de la comparación con otros métodos de extracción. En el trabajo realizado por Tomita y col., 2008, compararon la descontaminación utilizando el equipo BBL Mycoprep y por otro lado sólo usaron el NaOH 2%. Estos autores lograron obtener mejores resultados en la identificación de especies de micobacterias utilizando el equipo comercial en 19 muestras recolectadas y previamente descontaminadas.

Debido a lo anteriormente expuesto, en éste trabajo se llevó a cabo primero la descontaminación de las expectoraciones utilizando el equipo BBL Mycoprep y posteriormente la extracción de ADN utilizando la resina Chelex 100. Este procedimiento permitió obtener buenos resultados en la extracción del ADN y por consiguiente, amplificaciones mediante PCR, que en algunos casos proporcionó la identificación de la especie presente en tres muestras clínicas. No obstante, es importante mencionar, que en las seis muestras clínicas restantes, la identificación final no fue posible. Esto pudo deberse a que no fue satisfactoria la eliminación de otros microorganismos presentes en la microbiota. Cabe mencionar que el reactivo comercial utilizado (NALC-NaOH) está ajustado a concentraciones de NaOH, que permitan el desarrollo posterior de las micobacterias en cultivo. Sin embargo, ya que en este tipo de procedimientos no es necesario mantener viables a las micobacterias, el incremento en la concentración de NaOH, probablemente, permitiría una eliminación adecuada de la microbiota acompañante y la obtención de un ADN que permita la identificación de la micobacteria presente.

PCR-RFLP del gen *gyrB*

Una vez extraído el ADN genómico, se inició con la amplificación, mediante PCR, de una región del gen *gyrB* en 25 cepas recuperadas de muestras clínicas y en las 2 cepas de referencia que corresponden al complejo *M. tuberculosis*. Como se puede apreciar en la figura 4, se obtuvo el segmento esperado de 1,045 pb en todas las cepas probadas (Niemann y col., 2000a).

Los productos de 1,045 pb fueron digeridos con las enzimas de restricción *TaqI* y *SacII*. Con la enzima *TaqI* se obtuvieron 2 perfiles diferentes, los cuales corresponden a *M. tuberculosis* (250/440 bp) y a *M. bovis* (440 bp) (Niemann y col., 2000a), como puede apreciarse en la figura 5.

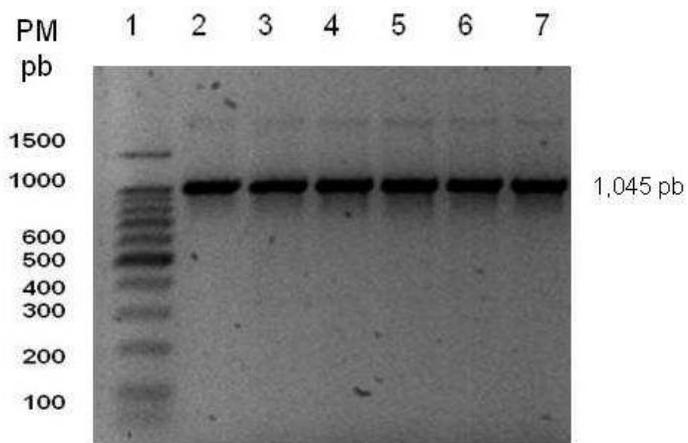


Figura 4. Amplificación, mediante PCR, del gen *gyrB*. Carril 1: Marcador Peso Molecular. Carriles 2-4: *M. tuberculosis*. Carriles 5-7: *M. bovis*.

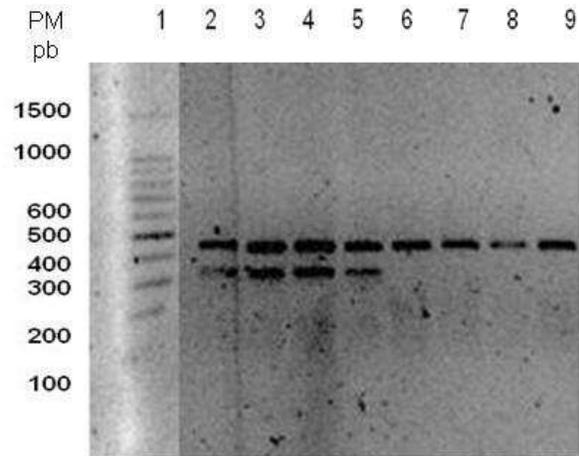


Figura 5. Análisis de restricción de los productos de PCR del gen *gyrB* con las enzimas de restricción *TaqI* y *SacII*. Carril 1: Marcador Peso Molecular. Carriles 2-5: *M. tuberculosis* (Enzima *TaqI*). Carriles 6-9: *M. bovis* (Enzima *SacII*).

Esta diferencia en los perfiles obtenidos se debe a que cada especie, presenta diferencias a nivel de secuencias del operón. De las 25 cepas que fueron digeridas, 22 cepas coincidieron con el perfil de *M. tuberculosis* y dos correspondieron al perfil de *M. bovis*.

Por otro lado la digestión enzimática realizada con *SacII*, no produjo fragmentos. Este resultado coincide con lo obtenido hasta este punto, ya que para las especies de *M. tuberculosis* y *M. bovis* la enzima no es capaz de realizar la digestión del amplicón obtenido. Los perfiles obtenidos con *TaqI* para *M. tuberculosis* y *M. bovis* en este estudio coinciden con los que obtuvieron en su estudio Niemann y col. (2000a).

Sin embargo en otros estudios se han obtenido patrones de restricción diferentes. Chimara y colaboradores (2004) realizaron una diferenciación de las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* utilizando la amplificación del gen *gyrB*, acompañada de la digestión con las enzimas *SacII*, *TaqI* y *RsaI*. Para *M. tuberculosis* se obtuvieron los siguientes patrones de bandas: la digestión con *RsaI* (560-385-100 pb), para la digestión con *TaqI* (440-270-130-100-80 pb), y con *SacII* no se obtuvieron productos de digestión. En el caso de *M. bovis* se detectaron los siguientes patrones: con *RsaI* (480-385-100-80 pb), la digestión con *TaqI* (440-160-130-105-100-80 pb) y con *SacII* no se obtuvieron productos de digestión. A diferencia de los patrones obtenidos por Chimara y col., los patrones obtenidos en el presente trabajo, tanto para *M. tuberculosis* como para *M. bovis* incluyeron bandas de bajo PM, de 100 y 80 pb. Los factores que podrían estar involucrados en esta discrepancia entre resultados son la resolución del gel de agarosa en esas regiones, así como la concentración del gel y el tiempo de corrida, como ha sido reconocido previamente (Godoy y col., 2008).

Es importante mencionar que debido a la gran homología genética existente entre *M. tuberculosis* y *M. africanum* (Cousins y col., 2003), es difícil diferenciar entre ambas especies, esto es importante mencionar ya que en el

presente trabajo se llevó a cabo el crecimiento de *Mycobacterium* en Medio de Bromocresol para la diferenciación entre cepas de *M. tuberculosis* y la posible presencia de cepas de *M. africanum*, tal y como se ha recomendado previamente (Kubica y col., 2006).

En otro estudio similar Herrera-Léon y col. (2009), analizaron 251 cepas del complejo *M. tuberculosis*, con éstas mismas enzimas, coincidiendo sus resultados con los perfiles obtenidos en el presente trabajo para *M. tuberculosis*. Sin embargo, estos mismos autores señalan que la técnica debe ser utilizada en conjunto con otras técnicas que lleven a la identificación individual de todas las especies del complejo *M. tuberculosis*, como la son la PCR-RFLP *hsp65* y PCR-RFLP RD1.

PCR Para Loci Independientes

Del ADN extraído, se amplificó mediante PCR una región del loci Rv3877/8 (RD1) para las 25 cepas de muestras clínicas y las dos cepas de referencia mencionadas en el punto anterior. Esta amplificación generó un segmento de aproximadamente 999 pb para aquellas cepas clasificadas como *M. bovis*, como puede apreciarse en la figura 6. Por otro lado, la amplificación del loci Rv3120 (RD12) permitió identificar un producto de aproximadamente 404 pb para las cepas identificadas como *M. tuberculosis* (fig 6).

De las 25 cepas analizadas, 22 cepas amplificaron un producto de 404 pb de la región RD12. Puesto que estos resultados coinciden con los obtenidos mediante el procedimiento PCR-RFLP del gen *gyrB*, puede confirmarse su clasificación taxonómica como *M. tuberculosis*. Por otro lado, en dos cepas se obtuvo un producto de 999 pb de la región RD1, lo que permite su ubicación taxonómica como cepas pertenecientes a *M. bovis*. Las cepas restantes consideradas como atípicas, en base a los resultados de las pruebas fenotípicas realizadas, fueron posteriormente ensayadas con la técnica de

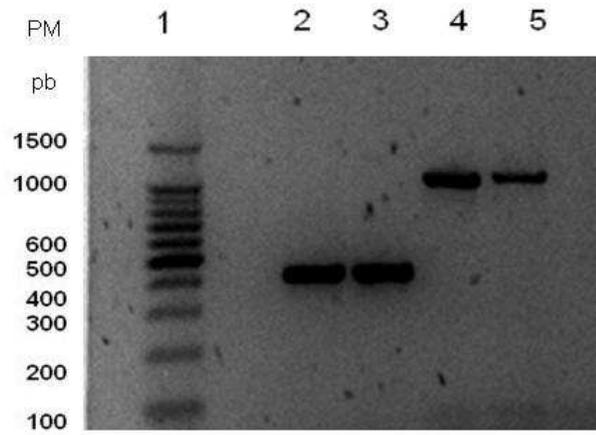


Figura 6. Amplificación, mediante PCR, de loci independientes: Carril 1: Marcador Peso Molecular. Carriles 2-3 Rv3120 (RD12): *M. tuberculosis*. Carriles 4-5 Rv3877/8 (RD1): *M. bovis*.

PCR-RFLP del gen *hsp65* y el producto de amplificación fue digerido con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*, para su identificación genotípica.

En el presente trabajo, la utilización combinada de PCR-RFLP del gen *gyrB* y la amplificación de RD12 y RD1, fue suficiente para diferenciar claramente entre las especies de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esto se puede observar también en el trabajo que realizaron Huard y col. (2003), en el que por medio del uso de PCR-para loci independientes, diferenciaron especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canettii*).

Cabe destacar que Huard y colaboradores obtuvieron perfiles de bandas para *M. tuberculosis* y para *M. bovis*, similares a los que se obtuvieron en el presente trabajo, utilizando sólo los loci RD1 y RD12. Es importante mencionar que los autores utilizaron un conjunto de locus RD (16S rRNA, Rv0577, IS1561, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8, Rv3120), que les permitió obtener un patrón, por lo que la diferenciación se observó claramente entre las diferentes especies evaluadas. Si bien en este trabajo solo se usaron dos locus RD, sólo RD1 está presente en *M. bovis* (Kalra y col., 2009), lo que permite así diferenciar entre ambas especies, y confirmar lo obtenido en PCR-RFLP del gen *gyrB*.

PCR-RFLP del gen *hsp65*

En el presente trabajo se incluyeron ocho cepas que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis*. Siete de ellas fueron recuperadas de muestras clínicas y fueron identificadas, mediante pruebas fenotípicas convencionales (véase Tabla II), como *M. fortuitum* (cinco cepas), *M. avium-intracellulare* (dos cepas). A partir del ADN obtenido de cada una de ellas y de la micobacteria atípica proporcionada por el INDRE (*M. avium-intracellulare*), se llevó a cabo la amplificación por PCR del gen *hsp65*. El producto obtenido, de aproximadamente 441 pb, se observa en la figura 7.

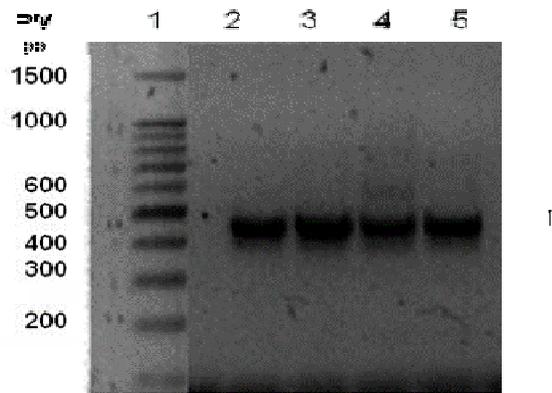


Figura 7. Amplificación, mediante PCR, del gen *hsp65*. Carril 1: Marcador Peso Molecular. Carril 2. *M. massiliense*, Carril 3. *M. fortuitum*, Carril 4: *M. flavescens*, Carril 5: *M. avium-intracellulare*.

Los productos de 441 pb, fueron digeridos con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*. Con la enzima *BstEII* se obtuvieron diferentes perfiles, mismos que correspondieron a *M. fortuitum* 240/120/85 pb, *M. avium-intracellulare* 245/120/100 pb; *M. massiliense* 235/210 pb, *M. flavescens* 440/245/220 pb (Bannalíkar y col., 2006; Godoy y col., 2008; Konomi y col., 2002; Silva y col., 2009). Al realizar la digestión con la enzima *HaeIII*, nuevamente se pudieron apreciar diferentes patrones de restricción que correspondieron a: *M. fortuitum* 145/120/55 pb, *M. avium-intracellulare* 155/140/60 pb, *M. massiliense* 200/70/60/50 pb, *M. flavescens* 175/140/115/60/55 pb (Bannalíkar y col., 2006; Godoy y col., 2008; Konomi y col., 2002; Silva y col., 2009), como se puede apreciar en la figura 8.

Por lo tanto, de las siete cepas analizadas por este procedimiento, cinco fueron identificados como *M. fortuitum* por PCR-*hsp65* y por los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas. Una cepa se identificó como *M. massiliense* sólo por el patrón obtenido en las digestiones enzimáticas, ya que el perfil fenotípico obtenido correspondió a *M. fortuitum*. En otra cepa, previamente identificada como *M. avium-intracellulare*, finalmente por el patrón obtenido con las digestiones enzimáticas se identificó como *M. flavescens*. Es importante destacar que la identificación final de las cepas clasificadas como *M. massiliense*, y *M. flavescens*, requirió la purificación y envío a secuenciación del producto amplificado mediante PCR.

Brunello y col. (2001), llevaron a cabo la identificación de 50 especies por PCR-RFLP del gen *hsp65*, obteniendo patrones similares a los obtenidos en éste trabajo. Una dificultad que se encontró, al momento de realizar el análisis de los patrones de restricción, se relaciona con los tamaños de las bandas obtenidos. Los patrones obtenidos no coincidían exactamente con patrones publicados, especialmente para las cepas que finalmente fueron identificadas como *M. massiliense* y *M. flavescens*, esto ya se ha reportado en otros estudios como el de Godoy y col., 2008, sin embargo hay diversos factores que se

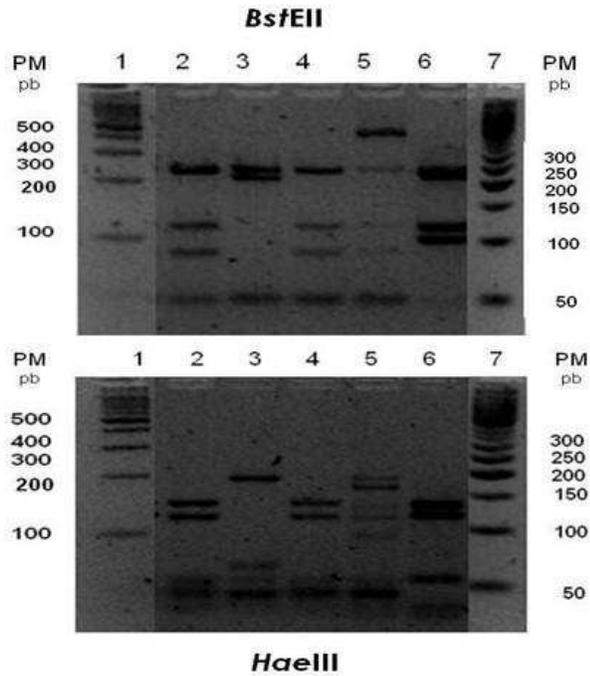


Figura 8. Análisis de restricción, con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*, de los productos de PCR del gen *hsp65*. Carril 1: Marcador Peso Molecular, Carril 2: *M. fortuitum*, Carril 3: *M. mageritense*, Carril 4: *M. fortuitum*, Carril 5: *M. flavescens*, Carril 6: *M. avium-intracellulare* (cepa de referencia), Carril 7: Marcador de Peso Molecular.

atribuyen a estas diferencias de patrones como lo son la resolución del gel o las condiciones del corrimiento de electroforesis. En estos casos los patrones de bandas contenían bandas con diferencias de tamaño entre ellas (5 a 10 pb).

En los patrones de las cepas identificadas como *M. fortuitum* se observaron bandas de bajo peso molecular, esto pudo ser asociado a la interferencia del buffer de carga o probablemente a la baja resolución del gel de agarosa. Este tipo de dificultades se ha mencionado en otros trabajos publicados como el de Araya, 2006 y Godoy, 2008. En este último se expone que estas diferencias en los patrones pueden deberse a la interpretación de éstos debido a que la fotodocumentación se realiza manualmente, por lo tanto si se establecen condiciones como la estandarización de las condiciones de electroforesis utilizando los mismos reactivos, así como la fotodocumentación, pueden establecerse patrones de bandas específicos para cada especie de micobacteria.

Por otro lado es importante mencionar que una de las cepas que estaba identificada como *M. avium-intracellulare* (B5509), en base a las pruebas bioquímicas realizadas para la caracterización fenotípica (Tabla III), al ser analizada mediante PCR del gen *hsp65* fue identificada como *M. fortuitum* y como se verá más adelante finalmente agrupó con las cepas de esta especie. Adicionalmente, una cepa finalmente identificada como *M. massiliense* correspondía con un patrón fenotípico de *M. fortuitum*(H16009). De manera similar, la cepa identificada como *M. flavescens* presentó características bioquímicas típicas del complejo *M. avium-intracellulare*(H11709). Este tipo de situaciones se han presentado previamente y han sido bien documentadas (Godoy y col., 2008).

Las diferencias entre los patrones generados con los productos de restricción y las pruebas bioquímicas pueden deberse a que los ensayos fenotípicos son susceptibles de presentar variaciones en los resultados al modificar factores como la preparación de los medios de cultivo y los reactivos,

Tabla III. Cepas identificadas por PCR-RFLP del gen *hsp65*.

Cepa	Identificación presuntiva (fenotípica)	MBC	Nt	Nc	AS24h	AS48h	CTA	C68°C	PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	
H21308	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+	<i>M. fortuitum</i>	
H28308	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+	<i>M. fortuitum</i>	
H15309	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+	<i>M. fortuitum</i>	
H16009	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+	<i>M. massiliense</i>	
B2109	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	-	+	+	<i>M. fortuitum</i>	
B5509	<i>M. avium-intracellulare</i>	-	+	-	-	-	+	+	<i>M. fortuitum</i>	
H11709	<i>M. avium-intracellulare</i>	+	+	-	+	+	+	+	<i>M. flavescens</i>	

MBC=Medio de Bromocresol; Nt=Nitratos; Nc=Niacina; AS24h=Agar sangre 24 horas; AS48h=Agar sangre 48 horas; CTA=Catalasa a Temperatura Ambiente; C68°C=Catalasa a 68°C.

hasta la interpretación del observador. Por otro lado se encuentra el factor del número de bacterias viables para producir un resultado que pueda ser detectable, y el tiempo que requiere el crecimiento de algunas especies es de varias semanas. Adicionalmente, las bases de datos de características fenotípicas solo presentan especies comunes y no son actualizadas con frecuencia, por lo que algunas especies relativamente nuevas no pueden ser identificadas por estas pruebas (Cortinas y col., 2002; Godoy y col., 2008).

En el caso de la cepa de *M. flavescens*, se identificó como *M. avium-intracellulare*(H11709) por pruebas bioquímicas, ya que se obtuvieron resultados positivos para la prueba de nitrato, niacina, crecimiento en agar sangre a 24 y 48 horas, catalasa positiva a temperatura ambiente y a 68°C (Tabla III). Sin embargo *M. flavescens*, también presenta positivas las pruebas de reducción de nitrato y catalasa a 68°C (Tortoli y col., 2004). Para lograr un perfil fenotípico completo se requieren de pruebas adicionales como tolerancia a NaCl 5% (Mederos y col., 1995), hidrólisis de Tween 80 y prueba de ureasa (Tortoli y col., 2004), entre otras.

Por otro lado la cepa identificada como *M. massiliense* se había clasificado como *M. fortuitum* (H16009) en base a los resultados obtenidos en la producción de nitratos, catalasa a temperatura ambiente y a 68°C (Tabla III). No obstante, otras pruebas con resultado positivo que ayudarían a la caracterización completa de la especie son, tolerancia NaCl al 5% en medio Lowenstein Jensen, arilsulfatasa de 3 días (Tortoli, 2006), pirazinamidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, α -glucosidasa, N-acetyl- β -glucosaminidasa.

Medio de Bromocresol

Se llevó a cabo el desarrollo de las 31 cepas de aislamientos clínicos, así como de las cepas de referencia, en el medio de Bromocresol. Originalmente el propósito de utilizar el medio de Bromocresol era la diferenciación entre *M.*

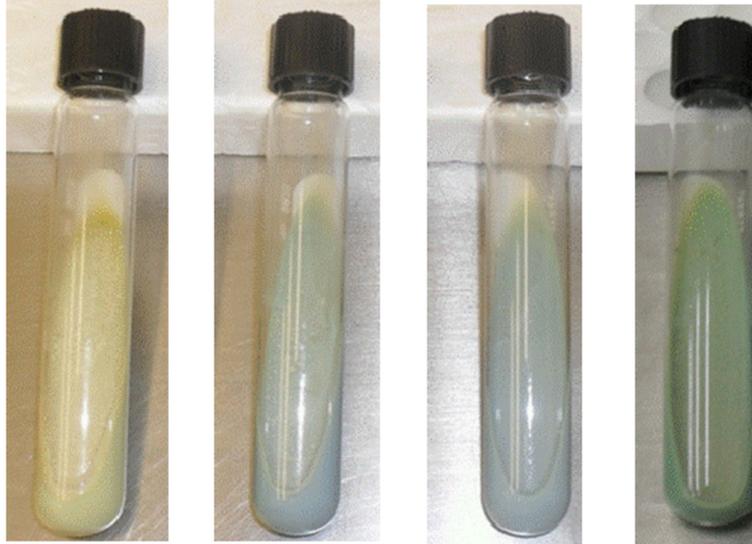
tuberculosis y *M. africanum* subtipo II. Estas dos especies presentan una alta homología en los ensayos bioquímicos aplicados en la caracterización fenotípica. Adicionalmente, los ensayos de PCR para la caracterización genotípica, no permiten una discriminación adecuada. El crecimiento en éste medio permite confirmar la identificación de las cepas de *M. tuberculosis* ya que el crecimiento de ésta bacteria en el medio es característica debido al cambio de color del medio azul a amarillo, como se puede apreciar en la figura 9.

En 1951 Wagener y Mitscherlich propusieron la utilización de otro medio de cultivo alternativo, para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*: el medio de púrpura de bromocresol (Mira, 1973). Este medio de cultivo ha sido utilizado en diversos países, como parte de la caracterización fenotípica rutinaria, en la identificación de *M. tuberculosis*. Se considera que sólo este microorganismo induce un cambio de color en el medio, dependiente de pH, de azul a amarillo (Kubica y col., 2006; Niemann y col., 2002).

Si bien las micobacteriosis más comunes son ocasionadas por *M. tuberculosis* en humanos y *M. bovis* en bovinos, se ha tratado de establecer pruebas que permitan una identificación clara entre ambas especies para un diagnóstico preciso. Entre estas se incluyen la caracterización genotípica y fenotípica de cada micobacteria. Una de las características fenotípicas más utilizadas es el crecimiento de la bacteria en medio sólido, generalmente en el medio Löwenstein Jensen (Niemann y col., 2002).

El diagnóstico diferencial entre ambas micobacterias sólo puede realizarse por el cultivo, seguido de la tipificación por métodos bioquímicos. Cabe mencionar que otros medios de cultivo alternativos también han sido utilizados: el medio Stonebrink en el cual *M. tuberculosis* crece al igual que en el medio Lowenstein-Jensen. Por el contrario, *M. bovis* prefiere el medio de Stonebrink y con poca frecuencia puede desarrollarse en Lowenstein-Jensen (Valerga y col., 2005).

Los resultados obtenidos en éste trabajo fueron satisfactorios ya que el



M. tuberculosis H37Rv *M. bovis* AN5 *M. avium-intracellulare* *M. fortuitum*

Figura 9. Crecimiento de distintas especies de micobacterias en el medio de Bromocresol. En esta imagen puede observarse el cambio de color en el tubo de *M. tuberculosis* H37Rv, en los tubos donde se desarrollaron *M. bovis* AN5 y *M. avium-intracellulare* no se observó ningún cambio de color del medio. Para *M. fortuitum* se presentó un cambio parcial en la pigmentación del medio (superficie).

medio de bromocresol permitió el crecimiento óptimo de las micobacterias. Por otro lado, el cambio de color del medio característico para *M. tuberculosis*, se detectó en otras especies de *Mycobacterium* (*M. fortuitum*). Esto podría estar influido por la presencia simultánea de varias cepas y/o especies de micobacterias en el aislamiento original, puesto que se conoce que un paciente puede estar infectado por varias cepas de *Mycobacterium* simultáneamente (Kubica y col., 2006).

ERIC-PCR

A partir del ADN genómico de las 34 cepas, 31 provenientes de aislamientos clínicos y tres cepas de referencia, se realizó la técnica de ERIC-PCR. En la figura 10 se puede observar que se obtuvieron diferentes perfiles para cada cepa, lo cual permitió identificar a cada una de las especies evaluadas y adicionalmente diferenciar genotípicamente prácticamente cada cepa estudiada.

En la figura 10 se observa similitud en los patrones de banda obtenidos entre las especies de *M. tuberculosis*, como se verá más adelante esto tiene importancia, ya que en el árbol de homología derivado de los patrones obtenidos mediante ERIC-PCR, se observa un agrupamiento de las cepas identificadas como *M. tuberculosis*, y debido a la diferencia en los patrones de las demás cepas *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. avium-intracellulare*, *M. flavescens*, *M. massiliense*. Por otro lado, es importante destacar la variabilidad observada entre cepas pertenecientes a la misma especie. En la figura 10 se puede apreciar que a pesar de que las cepas analizadas en los carriles 3 y 4 pertenecen a la especie *M. tuberculosis*, ambas cepas no presentan patrones de bandas idénticos. Lo mismo se puede apreciar en los carriles 5 y 6 para *M. bovis* y en los carriles 7 y 11 para *M. fortuitum*. Esto permite confirmar que la

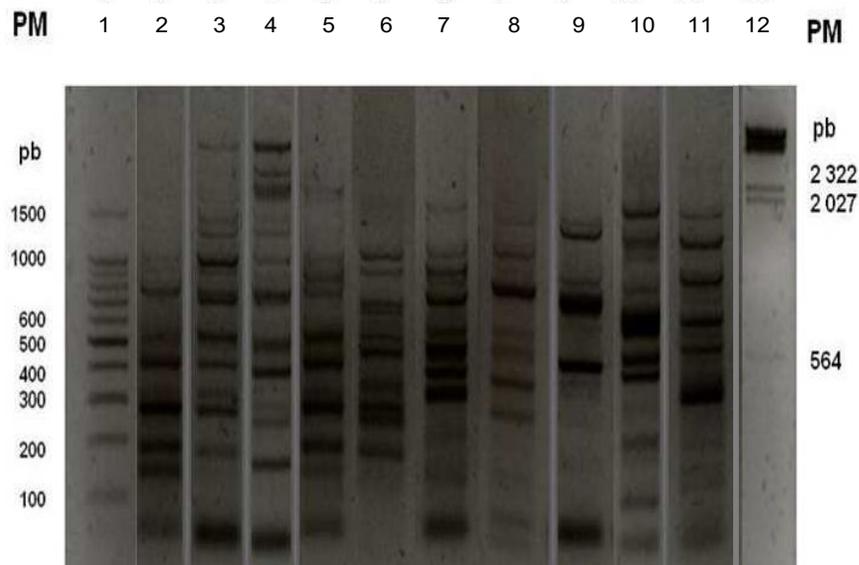


Figura 10. Perfiles de bandas obtenidos, para distintas especies de micobacterias, mediante ERIC-PCR. Carril 1. Marcador de Peso Molecular, Carril 2: *M. tuberculosis* H37Rv, Carriles 3 y 4: *M. tuberculosis*, Carril 5: *M. bovis* AN5, Carril 6: *M. bovis*, Carril 7: *M. fortuitum*, Carril 8: *M. massiliense*, Carril 9: *M. avium-intracellulare* Cepa de Referencia, Carril 10: *M. flavescens*, Carril 11: *M. fortuitum*, Carril 12: Marcador de Peso Molecular.

técnica de ERIC-PCR permitió una clara diferenciación de cepas, con patrones de pruebas bioquímicas idénticos, en base a diferencias genotípicas.

La mayoría de las técnicas moleculares para identificación de especies de *Mycobacterium* se basan en el análisis de elementos de inserción presentes en el genoma. Actualmente un método de genotipificación para cepas de *Mycobacterium* utilizado es el RFLP-IS6110 (Orgakov y col., 2002), sin embargo recientemente se ha observado que cepas de *M. tuberculosis* no tienen o presentan un bajo número de copias de esta secuencia de inserción, y que esto genera problemas en la eficiencia de la técnica (Krishnan y col., 2007).

Las regiones consenso intergénicas repetitivas de las enterobacterias (ERIC) han sido bien caracterizadas en enterobacterias particularmente en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. En micobacterias esta técnica fue utilizada en cepas *M. aurum* por Versalovic y col., 1991. Posteriormente, Sechi y colaboradores (1998) usaron la técnica de ERIC-PCR como un método para identificar a *M. tuberculosis*, pero años después investigadores como Englund y colaboradores usaron la técnica para diferenciar *M. avium* subespecie *paratuberculosis* de especies estrechamente relacionadas como lo son las del grupo *M. chelonae-abscessus* (Mello y col., 2006).

La técnica de ERIC-PCR ha permitido no sólo diferenciar especies del complejo *M. tuberculosis*, sino también diferenciar especies de micobacterias no tuberculosas, ejemplo de ellas son las que ocasionan infecciones cutáneas asociadas a mesoterapia: *M. immunogenum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* (Correa y col., 2010; Del Castillo y col., 2009). Así, a pesar de que diversos estudios han demostrado que el análisis por ERIC PCR es adecuado para la tipificación de cepas de *Mycobacterium* (Cortinas y col., 2002; Orgakov y col., 2002) en México no se han llevado a cabo estudios en los cuales se haya ensayado este procedimiento, con el fin de establecer patrones específicos de especie y de cepa.

Análisis de Secuencias

Para la secuenciación y análisis de ADN, los amplicones purificados fueron enviados al laboratorio MacroGen (Korea) para la secuenciación de ambas cadenas. Las secuencias se analizaron y depuraron utilizando el programa Chromas (versión 2.01). Las secuencias obtenidas, se alinearon en la base de datos GenBank (NCBI, Centro Nacional de Información Biológica), mediante el programa Blast (Basic Logical Alignment Search Tools). El análisis final de los alineamientos obtenidos, permitió lograr la identificación de las cepas seleccionadas por comparación de secuencias, a través de un porcentaje de homología (Zhang y col., 2000).

Análisis de Patrones

Análisis Fenotípico

El análisis de homología, como se mencionó anteriormente, se llevó a cabo en el programa Bionumerics. Para ello se utilizó el método de apareamiento sin ponderación utilizando medias aritméticas (UPGMA) y un análisis de agrupamientos de bandas utilizando el algoritmo DICE (Carriço y col., 2005). Para la construcción de dendogramas de homología, los aislamientos primeramente se agruparon de acuerdo a las características fenotípicas: Crecimiento en MBC, Nitratos, Niacina, Agar sangre 24/48 horas, Catalasa TA/68°C, que el Departamento de Agentes Patógenos del Laboratorio Estatal de Salud Pública les realizó (Figura 11).

En este primer agrupamiento, se identificaron 3 grupos, que pueden diferenciarse en base a una homología no menor al 70%. El grupo I está formado por ocho cepas, | de las cuales se observa que las identificadas como

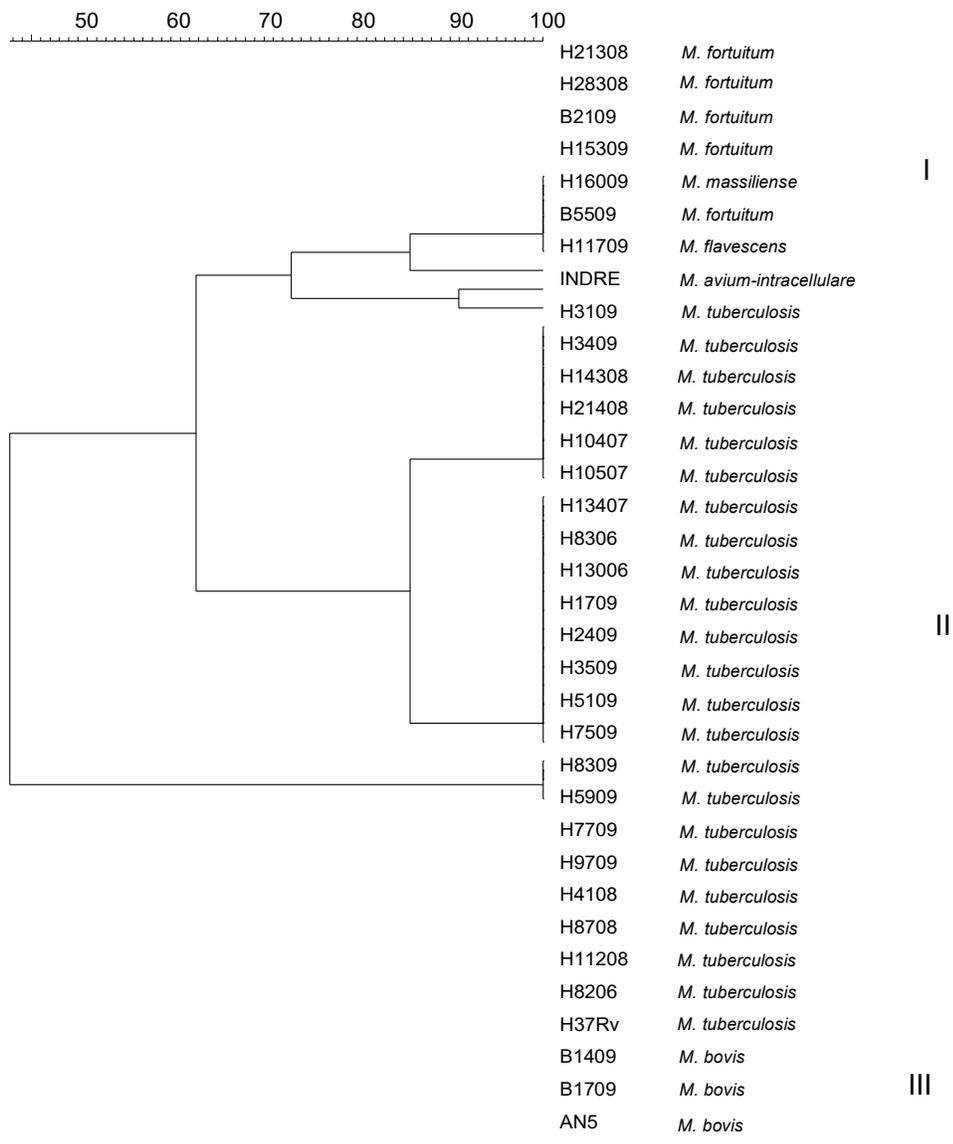


Figura 11. Árbol de homología, en base a caracterización fenotípica, de 31 cepas de micobacterias provenientes de aislamientos clínicos.

M. fortuitum presentan un alto porcentaje de homología y forman un subgrupo claro, a excepción de la cepa B5509 (origen bovino). Esto es lógico ya que las cepas identificadas como *M. fortuitum* presentaron los mismos resultados en las pruebas bioquímicas y lo más característico de esta especie: colonias de color marrón oscuro en medio de Löwenstein-Jensen (León y col., 2002).

También se puede observar en el grupo I la presencia de otras cepas identificadas como *M. massiliense* y *M. flavescens*, con un porcentaje de homología menor. Si bien ambas cepas (*M. massiliense* y *M. flavescens*) también pertenecen a la clasificación de micobacterias atípicas, no se consideran estrechamente relacionadas (Viana-Niero y col., 2008; Young y col., 2010).

M. fortuitum se considera negativo para la prueba de producción de niacina, no desarrolla en agar sangre a 24 y 48 horas. Por otro lado *M. massiliense*, al igual que *M. fortuitum*, proporciona un resultado positivo en la prueba de catalasa a temperatura ambiente y a 68°C, y por lo general se considera negativo a la reducción de nitratos (Adékambi y col., 2004; Cardoso y col., 2009; Silva y col., 2009).

Cabe aclarar que en el caso de la cepa H16009, el patrón fenotípico obtenido correspondió a *M. fortuitum*, por lo que se identificó de esta manera. Sin embargo después de la caracterización genotípica con los ensayos de PCR descritos previamente y después de secuenciar el producto de la amplificación del gen *hsp65*, la identificación final correspondió a *M. massiliense*.

La cepa H11709 se identificó como *M. avium-intracellulare*, sin embargo los ensayos genotípicos no coincidieron con lo observado a nivel fenotípico. Para esta cepa, se enviaron a secuenciación los productos de amplificación de los genes *gyrB* y *hsp65*. La identificación final como *M. flavescens* permite comprender su ubicación dentro del grupo I. La caracterización fenotípica inicial se basó en que los ensayos mostraron resultados positivos en las pruebas a reducción de nitratos y catalasa a temperatura ambiente y a 68°C, y negativo a

niacina, en estas pruebas coincide con *M. flavescens*, sin embargo no son suficientes para discriminar entre ambas especies, por ejemplo una prueba que puede diferenciarlas es crecimiento con NaCl 5% la cual es positivo para *M. flavescens* (Bernardelli, 2007; Borjalil y col., 1962; Dean-Ross y col., 1996).

El grupo II está formado por 23 cepas, las cuales fueron identificadas como *M. tuberculosis*, y presentaron un alto grado de homología. Las pruebas bioquímicas que caracterizaron a este grupo fueron: resultado positivo para la reducción de nitratos, producción de niacina, negativo al crecimiento en agar sangre a 24 y 48 horas, positivo a catalasa a temperatura ambiente, pero negativo a 68°C (Bernardelli, 2007; Godoy y col., 2008).

Es importante mencionar que para este agrupamiento (Figura 11) se incluyó el crecimiento de las cepas en el medio de Bromocresol (MBC), prueba que no ha sido aplicada por Laboratorios de Referencia del país. Sin embargo al incluir el desarrollo en MBC en la batería de pruebas bioquímicas utilizadas como herramienta básica para la identificación de especie, el cambio de color durante el crecimiento permitió la identificación de *M. tuberculosis* y un agrupamiento de las cepas con alta homología.

El grupo II se subdivide a su vez, en dos grandes subgrupos, esta separación se debe al crecimiento en el medio de Bromocresol, el primer subgrupo dio negativo al cambio de color total en el medio y mientras que el segundo subgrupo dio positivo al cambio del color del medio. Cabe notar que ambos grupos presentan una homología del 100% entre las cepas agrupadas, lo que impide la diferenciación a nivel de cepa, como era de esperarse. No obstante estas diferencias en el vire del indicador del medio podrían asociarse con diferentes capacidades metabólicas de los organismos aislados (Cortinas y col., 2002; Jiménez-Pájaros y col., 2005; Kubica y col., 2006).

El grupo III está formado por tres cepas identificadas como *M. bovis* las cuales dieron negativas a las pruebas de reducción de nitrato y producción de niacina, negativo a crecimiento en agar sangre a 24 y 48 horas, y a catalasa a

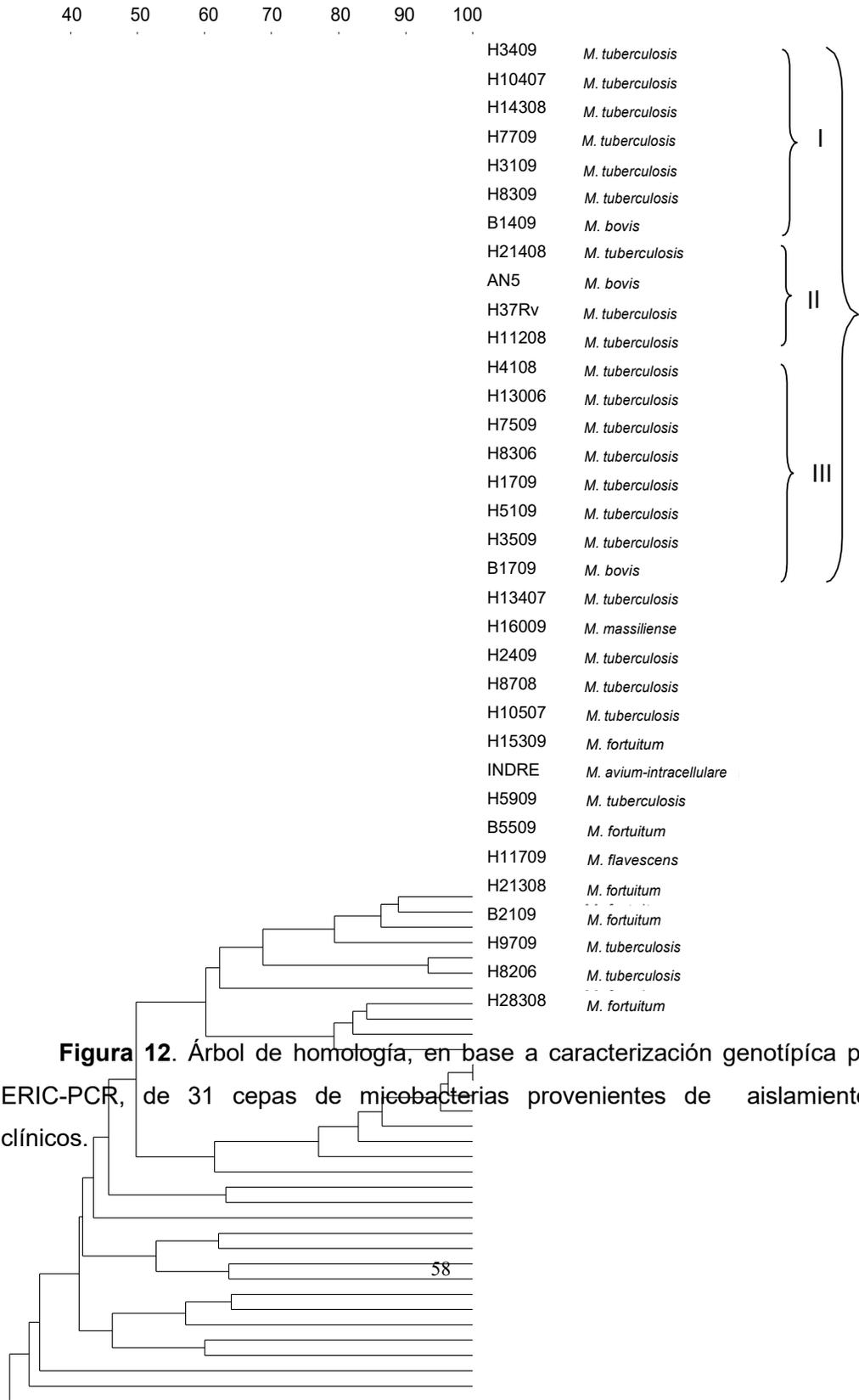
68°C, sin embargo es positivo a catalasa a temperatura ambiente lo que permite la diferenciación de *M. tuberculosis* (Bernardelli y col., 2007; Kubica y col., 2006).

Análisis Genotípico

Como se mencionó anteriormente, las imágenes de los geles obtenidos en los ensayos de ERIC-PCR, fueron digitalizadas y posteriormente capturadas en el programa Bionumerics. Utilizando la ponderación UPGMA y el algoritmo DICE, se obtuvo un dendograma en el que no se pueden apreciar grupos bien definidos para la mayoría de las cepas (Figura 12).

Se observa un grupo grande, con menos de 50% de homología que incluye tres subgrupos que agrupa la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* y tres cepas de *M. bovis*. El subgrupo I, únicamente incluye cepas de *M. tuberculosis*, mientras que en los subgrupos II y III se encuentran cepas de *M. bovis*. Es importante considerar que el número de cepas de *M. bovis* es pequeño, en comparación con el número de cepas de *M. tuberculosis*, por lo tanto podría considerarse que al incrementar el número de cepas de *M. bovis* se modifique el grado de homología entre las cepas y se dé lugar a agrupamientos más característicos por especie.

Es importante mencionar que sólo dos cepas (H4108 y H13006) mostraron patrones de bandas idénticos (figura 12). Uno de los primeros estudios donde se llevó a cabo el uso de ERIC-PCR para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* se enfocó en 46 cepas con una gran homología entre ellas, sin embargo, aun así se lograron identificar 36 patrones de bandas diferentes (Sechi y col., 1998). Por otro lado, ningún estudio publicado a la fecha ha utilizado la técnica de ERIC-PCR para diferenciar, simultáneamente, distintas especies de micobacterias.



En la figura 12 se puede apreciar que no es posible obtener agrupamientos para otro conjunto de cepas, puesto que se observa una gran variabilidad genómica entre el resto de los organismos estudiados. Esta variabilidad de patrones de bandas, no permitió una diferenciación precisa de especies con la técnica molecular ERIC-PCR, como se pretendía en el presente trabajo.

No obstante lo anterior, debe considerarse que se contó con un número reducido de aislamientos de *M. bovis* y de micobacterias atípicas, por lo que al incrementar el número de especies y de microorganismos para cada especie, probablemente se podrían obtener mejores agrupamientos.

Como se mencionó previamente, se ha utilizado la técnica de ERIC-PCR para la identificación de especies micobacterianas atípicas y se observa una variabilidad en los patrones de bandas obtenidos. Por ejemplo en el estudio de Mello-Sampaio y colaboradores (2006), donde los autores llevaron a cabo la identificación de cepas de *M. chelonae* y *M. abscessus*, ensayaron un mayor número de cepas de ambas especies, y de igual forma obtuvieron una variabilidad en los patrones de bandas. Sin embargo, los autores lograron observar la formación de subgrupos para cada especie con una mayor homología, respecto al resto de las cepas.

Otro ejemplo es el estudio realizado por Correa y colaboradores (2010), donde llevaron a cabo la identificación de cepas de *M. chelonae*, *M. abscessus*, y *M. fortuitum*. Si bien en este estudio el número de cepas analizadas fue menor, los perfiles obtenidos para *M. chelonae* fueron homólogos excepto para dos de sus cepas, y para el resto de las especies se obtuvo un patrón de perfil diferente por lo que realizaron otros ensayos como PRA-*hsp65* y sensibilidad a antibióticos, para comprobar su identidad.

Análisis Polifásico

Con el fin de lograr un agrupamiento polifásico, que incluyera la caracterización fenotípica y genotípica, se realizó un agrupamiento que incluyera ambas caracterizaciones. En la figura 13 puede apreciarse como los patrones de agrupamiento se modifican dramáticamente y se logra la formación de 3 grupos bien definidos y que incluyen, prácticamente sólo a miembros de la misma especie. No obstante, también puede apreciarse que no existen dos cepas con 100% de homología entre sus patrones fenotípico y genotípico combinados.

El grupo I, no presenta un grado mayor de homología (>70%) entre las cepas sin embargo incluye a las cepas de *M. fortuitum*, *M. massiliense*, *M. flavescens* y *M. avium-intracellulare*. En el grupo II agruparon las cepas identificadas como *M. tuberculosis* y en éste se aprecia un grado de homología mayor. Finalmente, en el grupo III se agruparon las cepas identificadas como *M. bovis*.

La revisión de la literatura no permitió identificar estudios en los cuales se hayan identificado, simultáneamente, cepas de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. avium-intracellulare*, *M. massiliense* y *M. flavescens* a partir de aislamientos clínicos, es decir que permitan la diferenciación e identificación de cepa y especie al mismo tiempo, como se realizó en este trabajo. La mayoría de los estudios, se han llevado a cabo con el fin de lograr la identificación de una especie o de especies muy cercanas genéticamente entre sí como en el caso de *M. chelonae* y *M. abscessus* (Correa y col., 2010).

En un estudio similar Mello-Sampaio y colaboradores (2006), llevaron a cabo la caracterización genotípica únicamente de cepas de *M. immunogenum*. Si bien, los autores no descartaron la posibilidad de identificar cepas pertenecientes a especies estrechamente relacionadas como *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. massiliense*, por lo que también realizaron pruebas fenotípicas y PCR-RFLP del gen *hsp65*.

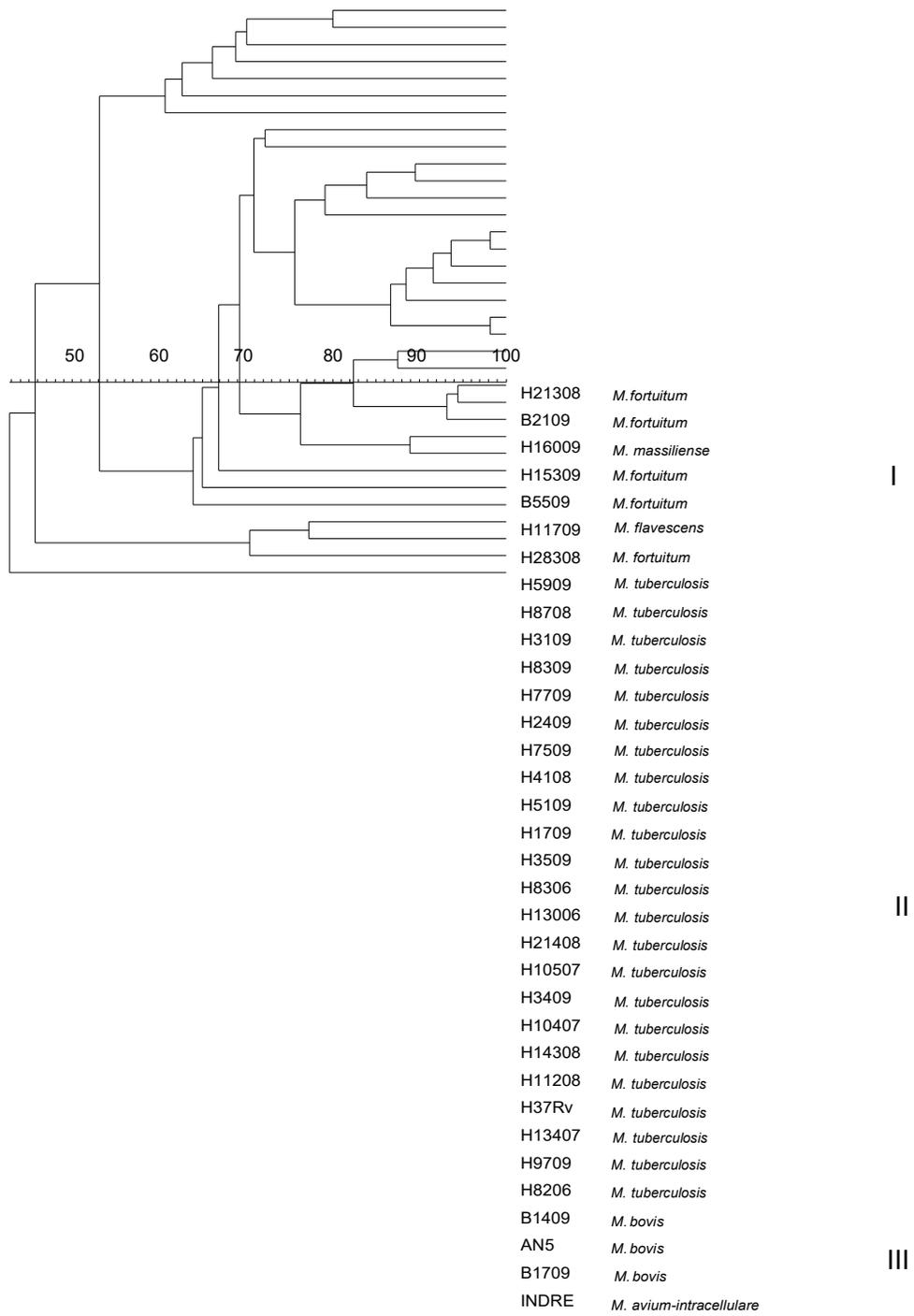


Figura 13. Árbol de homología basado en la información derivada de la caracterización fenotípica y genotípica, de 31 cepas de micobacterias provenientes de aislamientos clínicos.

Estos resultados proporcionan información sobre la importancia de las pruebas bioquímicas en la identificación de especie en aislamientos clínicos. No obstante, éstas pueden ser reforzadas por pruebas genotípicas como lo son las técnicas moleculares descritas y utilizadas en este trabajo. Esto se demuestra en otros trabajos como el de Godoy y col. (2008) en el cual se identificaron 30 cepas de micobacterias. Al utilizar, pruebas bioquímicas, se logró identificar el 92% de las cepas, mientras que la técnica molecular (PRA) permitió identificar el 96.2% de las mismas cepas. Estos investigadores recomiendan utilizar técnicas moleculares en laboratorio para identificación de micobacterias.

Mello-Sampaio y colaboradores (2006), además de llevar a cabo una identificación, utilizando la técnica de ERIC-PCR, también realizaron un análisis del polimorfismo del gen *hsp65*. De manera similar, Accioly y colaboradores (2005), llevaron a cabo la identificación de cepas de *M. abscessus* en pacientes con queratitis utilizando las técnicas de ERIC-PCR y PRA.

Es importante señalar que la técnica de ERIC-PCR ha sido aplicada para la identificación de especies de *Mycobacterium* en otros países como China y Rusia (Decui y col., 2008; Ogarkov y col., 2002). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en México no existen trabajos publicados en los cuales den a conocer la utilización de este procedimiento. Adicionalmente, esta técnica posee un par de ventajas: (1) rapidez para la obtención de resultados, (2) bajo costo, ya que sólo requiere un par de iniciadores y no requiere enzimas de restricción.

Identificación de Especies en Muestras Clínicas

Una vez concluida la etapa de identificación de especie de los aislamientos clínicos, se procedió a la identificación de especies a partir directamente de muestras clínicas (expectoración), proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hermosillo, Sonora.

A partir del ADN, obtenido directamente de las muestras de expectoración, se realizó PCR-RFLP del gen *gyrB*. De las nueve muestras ensayadas, se logró obtener un producto de amplificación de 1,049 pb en tres muestras, por lo que se prosiguió con la identificación de éstas. La digestión del amplicón con la enzima *TaqI*, permitió obtener el mismo perfil para las tres muestras: 270/450 pb que corresponde a *M. tuberculosis*. Al utilizar la enzima *SacII* no se obtuvo digestión del amplicón, lo cual también coincide con el perfil de *M. tuberculosis*. Finalmente, la digestión con *RsaI* produjo un perfil de 360/628 pb, que nuevamente confirma que las tres muestras contienen ADN de *M. tuberculosis*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los obtenidos en el estudio realizado por Herrera-León y colaboradores en el 2009. Así, la digestión enzimática con *TaqI* permitió obtener un patrón de 440/250 pb y con *RsaI* 360/560 para *M. tuberculosis*. Si bien ya se ha mencionado que se han obtenido diferencias en los tamaños de las bandas y ligeras diferencias entre los patrones de bandas, mismas que pueden deberse a variaciones menores en las condiciones de ensayo utilizadas.

Con el fin de verificar la identificación de estas cepas, el ADN se sometió a la prueba de PCR-RFLP del gen *hsp65*. Después de la amplificación se obtuvo un producto de 441 pb, por lo tanto se continuó la digestión del producto con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*. En la digestión con *BstEII* se obtuvo el patrón 245/125/80 pb en las 3 cepas (figura 14), mismo que corresponde a *M. tuberculosis*, y con la enzima *HaeIII*, se obtuvo el patrón 154/120/75 pb, también correspondiente a *M. tuberculosis*.

Los resultados de los perfiles obtenidos en este trabajo fueron similares a los obtenidos en los estudios de: Bannalikal y colaboradores (2006), con las enzimas *BstEII* 245/120/80 y *HaeIII* 160/140/70, para *M. tuberculosis*. En otro estudio similar se obtuvieron los siguientes perfiles, para *BstEII* 245/120/80 pb, y para *HaeIII* 152/127/71, ambos corresponden con la caracterización

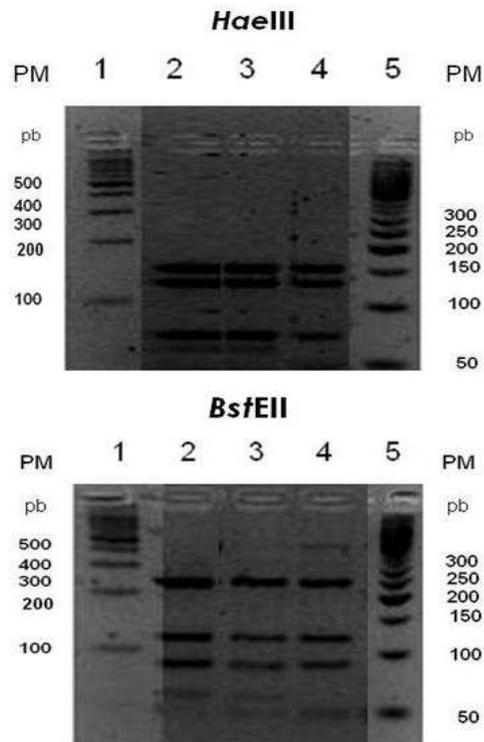


Figura 14. Análisis de restricción, con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*, de los productos de PCR del gen *hsp65*. Carril 1: Marcador Peso Molecular, Carril 2:-4: *M. tuberculosis*, Carril 5: Marcador de Peso Molecular.

genotípica de *M. tuberculosis* (Brunello y col., 2001).

La técnica de ERIC-PCR, también se utilizó en las muestras clínicas. No obstante, no se obtuvieron perfiles de bandas nítidos para una discriminación precisa de las mismas o que permitiera una identificación a nivel de especie. Esto puede atribuirse a una calidad inadecuada del ADN obtenido, puesto que no se realizó un procedimiento de aislamiento de los microorganismos. Sin embargo, en tres de las nueve muestras, la micobacteria que estaba presente logró identificarse mediante PCR-RFLP del gen *gyrB* y PCR-RFLP de *hsp65*.

El proceso de extracción con el equipo comercial Mycoprep, podría no ser lo suficientemente agresivo para una descontaminación adecuada de las muestras de expectoración. Cabe mencionar que la finalidad de este equipo comercial no es la obtención de ADN, sino la recuperación de micobacterias viables para el desarrollo en medios de cultivo. En base a lo anteriormente expuesto, sería interesante una estandarización del proceso llevado a cabo con el fin de lograr una extracción de ADN adecuada y de buena calidad, a partir de muestras clínicas, utilizando el equipo Mycoprep.

El incluir un mayor número de muestras clínicas podría proporcionar más datos referentes a la problemática que se está presentando en la extracción y purificación del ADN a partir de muestras clínicas. Adicionalmente, podrían evaluarse distintos protocolos para el tratamiento de las muestras, tales como emplear solventes orgánicos (Castro y col., 2007), sonicación de la muestra seguida de la incubación con detergentes (De Armas y col., 2006), calentamiento en agua destilada (Hosek y col., 2006), o el uso de equipos comerciales diseñados para este propósito específico (De Armas y col., 2006; Wolf y col., 2008).

CONCLUSIONES

Mediante el uso combinado de técnicas moleculares se logró la identificación a nivel de especie de 31 cepas de micobacterias y del 30% de las muestras clínicas estudiadas.

El desarrollo de las cepas en el Medio de Bromocresol, contribuyó de manera importante en la identificación de cepas de *M. tuberculosis*.

La técnica de ERIC-PCR permitió la diferenciación, a nivel de especie y a nivel de cepa, en aislamientos clínicos y en cepas tipo pertenecientes a diferentes especies del género *Mycobacterium*.

La taxonomía polifásica, mediante el uso de pruebas bioquímicas y patrones de bandas generados por ERIC-PCR, permitió la identificación y separación de especies del género *Mycobacterium*.

REFERENCIAS

Abbas A., Lichtman A. H. 2004. Inmunología celular y molecular. Cap. 15 Inmunidad frente a los microbios. Elsevier (Ed), p. 354. Madrid, España.

Accioly de G. F., Alvarenga L., Barbosa L., Sampaio J., Cardoso L. S., Hofling-Lima A. L., de Freitas D. 2005. Deep stromal mycobacterial keratitis: viable bacteria after six months of treatment: case report and literatura review. *Arq Bras Oftalmol.* 68(4):551-553.

Adékambi T., Reynaud G. M., Greub G., Gevaudan M. J., La Scola B., Raoult D., Drancourt M. 2004. Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol.* 42(12):5493-5501.

Aldous W. K., Pounder J. I., Cloud J. L., Woods G. L. 2005. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 43(5):2471-2473.

Araya R. P., Velasco R. M., Fernández O. J. 2006. Rapid identification of non tuberculous mycobacteria by restriction pattern analysis. *Rev Med Chil.* 134(7):868-873.

Arráiz N., Romay Z., Faría N., Mujica D. 2006. Identificación diferencial de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* por un ensayo de PCR múltiple. *Rev Cient.* 16(6): 622-628.

Bannalikal A. S., Verma R. 2006. Detection of *Mycobacterium avium* and *M.tuberculosis* from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of *hsp65* gene and *pncA* PCR. *Indian J Med Res.* 123(2):165-172.

Bernardelli A., 2007. Manual de procedimientos. Clasificación fenotípica de micobacterias. Dirección de laboratorio y Control técnico (Ed), p.45.

Bloom B. R., Murray C. J. 1992. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science*. 257(5073):1055-1064.

Bojalil L. F., Cerbo J., Trujillo A. 1962. Adansonian classification of mycobacteria. *J gen Microbiol*. 28:333-346.

Bolado-Martínez E., Acedo-Félix E. 2009. Differentiation of porcine wild-type lactobacilli strains, with ERIC-PCR and PFGE band patterns included in polyphasic taxonomy. *Czech J Anim Sci*. 54(7):307-314.

Brunello F., Ligozzi M., Cristelli E., Bonora S., Tortoli E., Fontana R. 2001. Identification of 54 Mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* Gene. *J Clin Microbiol*. 39(8):2799–2806.

Buttler J. M. 2001. Forensic DNA typing. Chap.3 Sample collection and preparation (DNA extraction and quantification). Academic Press (Ed), p. 30-31. USA.

Caminero J. A. 2007. La vieja batalla entre la especie humana y el bacilo de Koch. ¿Es posible soñar con erradicar la tuberculosis?. *An Sist Sanit Navar*. 30(2):163-180.

Cardoso L. S., Tortoli E., Viana-Niero C., Mizuka U. S., Batista L. K., Lopes M. L., Yubero J., Menendez M. C., Garcia M. J. 2009. Characterization of Mycobacteria from a major brazilian outbreak suggest that revision of the

taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* group is needed. *J Clin Microbiol.* 47(9):2691-2698.

Carriço J. A., Pinto F. R., Simas C., Nunes S., Souza N. G., Frazão N., de Lencastre H., Almeida J. S. 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 43(11):5483-5490.

Castro C. M., Puerto G., García L. M., Orjuela D. L., Llerena P. C., Garzón M. C., Ribón W. 2007. Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción Colombia 1995-2005. *Biomed.* 27(003):439-46.

Chimara E., Ferrazoli L., Leão S.C . 2004. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(7):745-748.

Chimara E., Ferrazoli L., Yoko S., Ueky M., Martins M. C., Durham A. M., Arbeit R. D., Leão S. C. 2008. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiol.* 20(8):48.

Cho S. N. 2007. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. *Yonsei Med J.* 48(3):347-359.

Correa N. E., Cataño J. C., Mejía G. I., Realpe T., Orozco B., Estrada S., Vélez A., Barón P., Guzmán A., Robledo J. 2010. Outbreak of mesotherapy-associated cutaneous infections caused by *Mycobacterium chelonae* in Colombia. *Jpn J Infect Dis.* 63(2):143-145.

Cortinas M. N., Fernández M., Valeta M. I., Uriarte M. R., Mogdasy M. C. 2002. Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. *Rev Med Urug.* 18(3):230-238.

Cousins D. V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe Sh., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D. M., Butler W. R., Dawson D., Rodríguez D., Loureiro J., Romano M. I., Alito A., Zumarraga M., Bernadelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinipedii* sp. nov. *Int J Syst and Evol Microbiol.* 53(5):1305-1314.

Da Mata Jardín. O., Hernández P. R., Corrales H., Cardoso L. S., De Waard H. J. 2009. Seguimiento de un brote de infección en tejido blando causado por *Mycobacterium abscessus* posterior a la mesoterapia en Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* En prensa.

Dean-Ross D., Cerniglia C. E. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46(3):307-312.

De Armas Y., Capó V., González E., Mederos L., Díaz R. 2006. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. *Rev Esp Patol.* 39(3):171-174.

Decui P., Xiang W., Jinyong W, Ya W., Shulan W. 2008. Development of DNA fingerprint of *Mycobacterium tuberculosis* ERIC-PCR. *Zhongguo Redai Yixue.* 8(2): 179-180.

Del Castillo M., Palmero D. J., López B., Paul R., Ritacco V., Bonvehi P., Clara L., Ambroggi M., Barrera L., Vay C. 2009. Mesotherapy associated outbreak

caused by *Mycobacterium immunogenum*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 15(2):357-359.

Domínguez J., Blanco S., Lacoma A., García-Sierra N., Prat C., Ausina V. 2008. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 26(9):33-41.

Dorronsoró I., Torroba L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar*. 30(2): 67-84.

Ernst J.D., Trevejo-Nuñez G., Banaiee N. 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest*. 117(7):1738-1745.

Gay D.R., Rufino-Netto A., Augusto B.L., Santiago S.D. 2006. The resumption of consumption – a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(7):697-714.

Godoy M. J., Orozco L., Hernández C., Da Mata O., De Waard J., González R. S. 2008. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Rev Soc Ven Microbiol*. 28:96-104.

Gorocica P., Jiménez M. M., Garfias Y., Sada I. Lascurain R. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 18(2):142-153.

Hansted E., Šitkauskienė B., Kėvalas R., Tattersall A., Day T. 2007. Research for practice: a new *in vitro* test for identification of tuberculosis infection. *Med Kaunas*. 43(7):519-522.

Herrera-León L., Pozuelo-Díaz R., Molina M. T., Valverde C. A., Saiz V. P., Jiménez P. S. 2009. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27(9):496-502.

Hernández J. E., Murcia M. I., de la Hoz F. 2008. Molecular epidemiology of tuberculosis in Bogotá in clinical isolates obtained over 11 year period. *Rev Salud Pública*. 10(1):126-136.

Hosek J., Svastova P., Moravkova M. Pavlik I., Bartos M. 2006. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterin Med*. 51(5):180-192.

Huard R. C., Lazzarini L. C., Butler W. R., van Soolingen D., Ho J. L. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*. 41(4):1637-1650.

Huard R. C., Fabre M., de Haas P., Lazzarini L. C., van Soolingen D., Cousins D., Ho J. L. 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol*. 188(12):4271-4287.

Hulton C. S., Higgins C. F., Sharp P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol*. 5(4):825-834.

Instructivo BBL MycoPrep. 2007. Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA, Cat 240862.

Iralu J. V. Sritharan V. K., Pieciak W. S., Wirth D. F. Maguire J. H. Barker R. H. 1993. Diagnosis of *Mycobacterium avium* bacteremia by polymerase chain reaction. *Clin Microbiol.* 31(7): 1811-1814.

Jiménez-Pájares M. S., Herrera L., Valverde A., Saiz P., Sáez-Nieto J. A. 2005. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Mycobacterium kansasii* aisladas en España (2000-2003). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23(5):254-8.

Kalra M., Khuller G. K., Sheikh. J. A., Verma I. 2009. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* specific RD antigens for delayed type hypersensitivity responses in guinea pig. *Indian J Exp Biol.* 48(2):117-123.

Kasai H., Ezaki T., Harayama Sh. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J Clin Microbiol.* 38(1): 301-308.

Katoch V. M. 2004. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res.* 120(4):418-428.

Krishnan M. Y., Radhakrishnan I., Joseph B. V., Latha G. K., Kumar R., Mundayoor S. 2007. Combined use of amplified fragment length polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, South India. *BMC Inf Dis.* 7(86):1471-1475.

Kubica T., Agzamova R., Wright A., Rakishev G., Rüş-Gerdes S., Niemann S. 2006. *Mycobacterium bovis* isolates with *M. tuberculosis* specific characteristics. *Emerg Infect Dis.* 12(5):763-765.

León V., Merchán M., Ugalde J., Villavicencio D., Guillen P. 2002. Infección cutánea por micobacteriosis atípica secundaria a mesoterapia. Reporte de un caso clínico y revisión de literatura. *Dermatología*. 15(2):44-48.

Mederos C. L. M., Ferraza S. C., Valdivia J. A. 1995. Utilización del medio de cultivo UIT-A en la obtención de biomasa para la identificación bioquímica micobacteriana. *Rev Cub Med Trop*. 47(2):375-379.

Mello- Sampaio. J. L., Nassar J. D., de Freitas D., Höfling-Lima A. L., Miyashiro K., Lopes A. F., Cardoso L. S. 2006. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. *J Clin Microbiol*. 44(9):3201-3207.

Mello S. J., Viana-Niero C., de Freitas D., Höfling-Lima A. L., Leão S. C. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 55(2):107-118.

Mira G. J. 1973. El diagnóstico bioquímico de las micobacterias. Cap. 11 Sensibilidad a los colorantes incorporados al medio de cultivo. Publicación de la Universidad de Sevilla. p. 145-151. Sevilla, España.

Negi S. S., Anand R., Pasha S. T., Gupta S., Basir S. F., Khare S., Lal S. 2007. Diagnostic potential of IS6110, 38 kDa, 65 kDa and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Medic Microbiol*. 25(1):43-49.

Niemann S., Richter E., Rüş-Gerdes S. 2002. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970

(Approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52(2):433-436.

Niemann S., Harmsen D., Rüş-Gerdes S., Richter E. E. 2000a. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 38(9):3231-3234.

Niemann S., Richter E., Rüş-Gerdes S. 2000b. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol.* 38(1):152-157.

Ogarkov O. B., Medvedeva T. V., Belikov S. I., Kurepina N. E., Denikina N. N., Ushakov I. V. 2002. Estimation of efficacy ERIC-PCR typing of *Mycobacterium tuberculosis* for studying distribution antibiotic resistant strains. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* (1):21-24.

Palma N.J., Bocanegra G.V. 2007. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Archivos de Bronconeumología.* 43 (4): 225-232.

Ramírez R. N., Cocotle R. B., Méndez P. A., Arenas B. J. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Rev Med Univ Ver.* 2(2):36-40.

Retamal M. P., Martínez T. A., Abalos P. P. 2003. Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Rev Chil Infect.* 20(3): 166-170.

Richter E., Weizenegger M., Rüsç G. S., Niemann S. 2003. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 41(6):2672-2675.

Ryan K., Ray C. G. 2004. Microbiología Médica. Cap. 28 Micobacterias. McGraw Hill (Ed), p.477-490. México, D.F.

Sampaio J. L., Chimara E., Ferrazoli L., da Silva Telles M. A., Del Guercio V. M. F., Jericó Z. V., Miyashiro K., Fortaleza C. M. C. B., Padoveze M. C., Leão S. C.: 2006. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. *Clin Microbiol Infect.* 12(2):142-149.

Sechi L.A., Zanetti S., Dupré I., Delogu G., Fadda G.G. 1998. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular Targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol.* 36(1):128-132.

Shuhaimi M, Ali A. M, Saleh N. M, Yazid A. M. 2001. Utilization of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. *Biotechnol Lett.* 23(9):731-736.

Silva D. R., Lourenço M. C., Fonseca L. de S., Leão S. C., Amorim E. de L., Rocha I. L., Coelho F. S., Viana-Niero C., Gomes K. M., da Silva M. G., Lorena N. S., Pitombo M. B., Ferreira R. M., García M. H., de Oliveira G. P., Lupi O., Vilaça B. R., Serradas L. R. Chebabo A., Marques E. A., Teixeira L. M., Dalcolmo M., Senna S. G., Sampaio J. L. 2009. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol.* 47(7):2149-2155.

Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E.C., Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 31(22):175-178.

Tomita M., Takeno H., Yoshida S., Suzuki K., Sakatani M. 2008. Comparison of BBL mycoprep and 2% NaOH decontamination procedures for MGIT. *Kekkaku J Art.* 83(6):471-473.

Tortoli E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48(2):159-178.

Tortoli E., Rindi L., Bartoloni A., Garzelli C., Manfrin V., Mantella A., Piccoli P., Scarparo C. 2004. Isolation of a novel sequevar of *Mycobacterium flavescens* from the sinovial fluid of an AIDS patient. *Clin Microbiol Infect.* 10(11):1006–1035.

Valerga M., Viola C., Thwaites A., Bases O., Ambroggi M., Poggi S., Marino R. 2005. Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en una mujer con SIDA. *Rev Arg Microbiol.* 37(2):96-98.

Ventura M., Meylan V., Zink R. 2003. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl Environ Microbiol.* 69(7):4296-4301.

Viana-Niero C., Lima K. V., Lopes M. L., Rabello M. C., Marsolla L. R., Brilhante V. C., Durham A. M., Leão S. C. 2008. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletti* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J Clin Microbiol.* 46(3):850-855.

Weldingh K., Rosenkrands I., Okkels L. M., Doherty T. M., Andersen P. 2005. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J of Microbiol.* 43(1):57-65.

Wilson L. A., Sharp P.M. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol.* 23(6):1156-1168.

Wolf H., Mendez M., Gilman R. H, Sheen P., Soto G., Velarde A. K., Zimic M, Escombe A. R., Montenegro S., Oberhelman R. A., Evans C. A. 2008. Diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis by stool PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 79(6):893-898.

www.educa.madrid.org/.../Bacilo_tuberculosis.gif

Yang J. L., Wang M. S., Cheng A. C., Pan K. C., Li C. F., Deng S. X. 2008. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol.* 14(18):2872-2876.

Young C. A., Sook K. Y., Hoh K. Y., Ok K. S., Ju B. S., Joon S. Y., Hoon L.J Lee Y. 2010. Identification of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infections associated with repeated surgical procedures. *Ann Dermatol.* 22(1):114-118.

Yzquierdo S. S. L., Mederos C. L., Díaz G. A., Echemendia F. M., Montoro C. E. 2007. Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. *Rev Chil Infect.* 24(5):391-396.

Zhang D. X., Hewitt G. M. 2001. Molecular tools for screening biodiversity. Plants and Animals. Chap.3. Preserved specimens. Kluwer Academic Publishers (Ed), p. 41-42. USA.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 7(1-2):203-214.