

Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay

MSc. María Noel Cortinas¹, Lic. Marina Fernández²,
Dras. María Inés Valeta³, María del Rosario Uriarte⁴,
María Cristina Mogdasy⁵

Resumen

Los métodos tradicionales de identificación fenotípica del género *Mycobacterium* son lentos y poco sensibles, requiriéndose cuatro a seis semanas para lograr un diagnóstico apropiado a partir de un cultivo positivo. Los procedimientos moleculares han permitido acortar este período, obteniéndose resultados entre las 36 a 72 horas.

En nuestro país la incidencia de *M. tuberculosis* es baja y no existen datos acerca de con qué frecuencia los casos diagnosticados como tuberculosis pulmonar son en realidad causados por *Mycobacterium non tuberculosis* (MNT), normalmente saprofitas.

Desde el punto de vista terapéutico, el diagnóstico etiológico a través de la identificación precisa de la especie de *Mycobacterium* infectante resulta un aporte significativo, dado que el tratamiento y el manejo de sus contactos son diferentes según sea la especie involucrada.

Por estas razones se introdujo en nuestro laboratorio el diagnóstico de *Mycobacterium* a través de su identificación genotípica. Para ello se eligieron dos marcadores moleculares de ADN: la secuencia de inserción IS6110, característica de los genomas del complejo *M. tuberculosis*, y la secuencia del gen ribosomal 16s (ADNr 16s) para estudiar la identidad específica dentro del género *Mycobacterium*.

Una vez puestas a punto las técnicas moleculares seleccionadas, se procedió al estudio retrospectivo de una colección de 80 aislamientos, identificados como *Mycobacterium* por métodos fenotípicos. La mayoría de los aislamientos (75/80) resultaron cepas del complejo *M. tuberculosis*. Los restantes cinco fueron identificados como cepas MNT, tres de ellas causantes de infecciones pulmonares.

Palabras clave: *MYCOBACTERIUM* - genética.
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS - genética.
MICOBACTERIOSIS - diagnóstico.
GENOTIPO.

1. Magister en Ciencias Biológicas. Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM) y Profesor Adjunto del Centro Técnico de Análisis Genéticos (CTAG) de Facultad de Ciencias.

2. Licenciada en Laboratorio Clínico. Laboratorio de Análisis Clínicos de la AEPSM.

3. Médico Microbiólogo y Subjefe del Laboratorio de Análisis Clínicos de la AEPSM.

4. Doctora en Ciencias Biológicas. Investigador del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). Responsable del Laboratorio de Biología Molecular de la AEPSM.

5. Médico Microbiólogo, Jefe del Laboratorio de Análisis Clínicos y Consultante de Enfermedades Infecciosas de la AEPSM.

Institución responsable: Laboratorio Biología Molecular y Laboratorio de Microbiología. Asociación Española Primera de Socorros Mutuos.

Correspondencia: MSc. María Noel Cortinas.

Hugo Pratto 2298/901. Montevideo 11200, Uruguay. 19206 530.
mcortinas@asesp.com.uy - cmogdasy@asesp.com.uy

Recibido: 13/12/01.

Aceptado: 23/8/02.

Introducción

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 hombre⁽¹⁾. Además de los microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, existen especies saprofitas, pudiendo actuar como patógenos oportunistas y causar enfermedad pulmonar o infecciones en otras localizaciones^(2,3).

La identificación rápida y precisa de las micobacterias a nivel de especie a partir de un cultivo positivo reviste importancia clínica y epidemiológica. Su identificación a nivel de especie permite la diferenciación entre patógenos habituales y oportunistas, definiendo, de esta manera, la conducta a seguir. Por ejemplo, la terapéutica a implementar varía dado que existen situaciones en que la indicación para una especie no es efectiva para otra. A su vez, permite presumir el hábitat natural y el reservorio (humano o ambiental), y determina la conducta a seguir con los contactos de los pacientes en tratamiento⁽³⁾.

La identificación de *Mycobacterium* por técnicas de laboratorio convencionales (fenotípicas) es lenta, requiriendo entre tres a seis semanas para lograrla, con la implicancia terapéutica que ello conlleva. Adicionalmente, se reconoce que el resultado puede ser ambiguo o llegar a ser erróneo debido a que las técnicas en sí mismas son poco reproducibles⁽⁴⁾. La expresión fenotípica dentro de una misma especie es variable y, en otros casos, varias especies pueden tener la misma expresión bioquímica. Por último, las bases de datos de las pruebas bioquímicas están descritas sólo para las especies más frecuentes y mejor conocidas lo que ocasiona un sesgo en la identificación hacia las especies tradicionalmente establecidas^(4,5).

Los métodos alternativos de identificación más comunes provienen del desarrollo de técnicas moleculares aplicadas a la identificación genotípica. Estas técnicas están basadas en la amplificación de ADN bacteriano por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)⁽⁶⁻⁸⁾ acompañadas por el estudio de polimorfismos generados por la digestión con enzimas de restricción⁽⁹⁾, la hibridación con sondas específicas⁽¹⁰⁾, o la secuenciación de cadenas nucleotídicas⁽¹¹⁻¹³⁾.

La introducción de técnicas moleculares para la identificación de *Mycobacterium* en la rutina del laboratorio clínico ha proporcionado dos grandes ventajas respecto a la identificación fenotípica: se reduce el tiempo de estudio de los aislamientos (36 a 72 horas en lugar de tres a seis semanas) y la identificación definitiva no depende de criterios subjetivos⁽⁵⁾.

Una gran variedad de marcadores ha sido ensayada en la última década^(1,3,7,9,11,12,14). De todos ellos se han se-

leccionado para este estudio la secuencia de inserción IS6110, característica de los genomas del complejo *M. tuberculosis*, y la región hipervariable 5' del gen 16s ARNr ribosomal para la identificación de las especies a nivel del género *Mycobacterium* (anexo)^(1,3,5,9,14-17).

La secuencia de inserción IS6110 es el marcador de uso más difundido para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*^(5,6,9), y el análisis de la secuencia ADN 16s ribosomal se ha convertido en el "standard" para la identificación de organismos de todo el género *Mycobacterium* en los centros de referencia donde la secuenciación automática está disponible^(8,12). Teniendo en cuenta estos antecedentes, fueron planteados los siguientes objetivos:

- introducir, en nuestro medio, técnicas moleculares para la identificación de especies del género *Mycobacterium*;
- identificar a nivel de especie una colección de aislamientos del pasado y recientes, caracterizados fenotípicamente como *Mycobacterium*, en el Laboratorio de Microbiología de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM).

Material y método

Muestras

Se procedió a estudiar una colección de 80 aislamientos identificados como *Mycobacterium* por métodos fenotípicos en el laboratorio de la AEPSM. Dicha colección contiene aislamientos realizados entre los años 1990 a 1999. Las cepas fueron aisladas en medio de Lowenstein Jensen, procedentes de muestras clínicas enviadas al Laboratorio de Microbiología para investigación de micobacterias.

El ADN bacteriano de cada una de las cepas cultivadas se aisló con el sistema de extracción de ADN de Qiagen, Qiampr[®] DNA Mini Kit, según las instrucciones del mismo.

Marcadores moleculares utilizados

Estudio del marcador IS6110, específico para el complejo M. tuberculosis

Las amplificaciones de los fragmentos de inserción fueron realizadas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), utilizando los "primers" T4 y T5⁽⁶⁾ y 36 ciclos con el siguiente perfil térmico de tres pasos: 95°C, 2 minutos; 69°C, 2 minutos y 72°C, 1 minuto, más una extensión final de 7 minutos. Luego de la electroforesis en geles de agarosa a 2%, los productos de amplificación fueron visualizados con tinción de bromuro de etidio. La identificación de bandas se realizó por comparación con un marcador de peso molecular. En cada experimento fue incluido un control negativo, un control positivo, junto con controles de inhibición de cada muestra. Estos últimos,

Anexo. Marcadores moleculares seleccionados

El elemento IS6110 es uno de los numerosos elementos genéticos móviles presentes en el género *Mycobacterium*^(3,14). Sólo es detectable en las especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) y mantiene la estabilidad necesaria^(9,15) para ser utilizado como herramienta diagnóstica de los miembros de este complejo.

Los elementos genéticos de inserción denominados genéricamente IS representan secuencias de ADN dispersas en los genomas bacterianos con actividad de transposición. Gracias a esta actividad, el número de copias de elementos IS y su localización en los genomas varía entre distintos organismos de la misma especie. Estas diferencias pueden ser aprovechadas para el diagnóstico y seguimiento epidemiológico. La movilidad junto a otros procesos como el de mutación genera más variación, diferencias que se traducen en la identificación de distintos linajes. A pesar de su capacidad de movimiento, algunos IS son suficientemente estables como para poder identificar organismos que provienen de un mismo ancestro, permitiendo, de esta manera, inferir la relación entre distintas cepas y descubrir sus relaciones evolutivas⁽¹⁶⁾.

La secuencia de ADNr 16s ribosomal forma parte de todos los organismos vivos.

Dada su universalidad, ha sido posible reformular el árbol de la vida sobre la base del estudio de los datos históricos que permanecen escritos en su secuencia genética. De estos análisis surge que los organismos se vinculan formando tres grupos discretos que se denominan dominios de la vida: Arquea, Eubacterias, y Eucariotas⁽¹⁷⁾. Esta secuencia ha sido ampliamente utilizada en sistemática molecular de Eubacterias. Cada especie viviente tiene su impronta genética propia, que la distingue de todas las demás.

Con la posibilidad de realizar la secuenciación automática de ácidos nucleicos, la misma metodología que se emplea para descifrar el genoma humano, se ha podido leer literalmente las cadenas de nucleótidos estableciendo similitudes y diferencias que permiten establecer las relaciones ancestro-descendiente. De esta forma, el género *Mycobacterium*, contiene fragmentos de secuencias nucleotídicas de su ADNr 16s ribosomal que sólo se encuentran en ese grupo de organismos y más aún, existen zonas de secuencias patognomónicas de cada una de las especies que forman el género. La lectura de secuencias de ADN en los tres dominios ha revelado que la biodiversidad de organismos ha sido ampliamente subestimada. El caso de *Mycobacterium* no ha sido una excepción. De dos docenas de especies reconocidas hasta los 90, se ha pasado a identificar más de un centenar en el momento actual, número que continúa en ascenso^(1,5).

utilizados para descartar resultados falsos negativos, consisten en reacciones que contienen ADN de las muestras problema contaminadas con ADN de *Mycobacterium tuberculosis* del control positivo.

Para confirmar la especificidad de nuestros ensayos se realizó la secuenciación de las bandas amplificadas, coincidentes con los pesos moleculares esperados.

Identificación de ADNr 16s por secuenciación

Las amplificaciones de los fragmentos fueron realizadas por PCR, utilizando los "primers" 244, 285, 264, y 259⁽⁸⁾. En este caso las condiciones de amplificación fueron: 95°C, 2 minutos; 69°C, 3 minutos y 72°C, 1 minuto, más una extensión final de 7 minutos por 36 ciclos. Luego de la electroforesis en geles de agarosa a 2%, los productos de amplificación fueron visualizados con tinción de bromuro de etidio. Se utilizaron controles positivos, negativos y de inhibición. Se procedió a la identificación de especie por secuenciación automática con un equipo ABI 310 y utilizando *Sequencing Prism Mix*, ambos de *Applied Biosystems*.

Los excesos de enzima, nucleótidos y sales de los productos de PCR 16s ARNr fueron extraídos antes de reali-

zar las reacciones de secuenciación haciendo pasar los productos a través de columnas Centriseq (Princeton).

Creación de una base de datos del género *Mycobacterium*

Las secuencias utilizadas para la creación de nuestra base de datos fueron extraídas a partir de las bases de datos de acceso público, *GenBank* y *Ribosomal Database*.

Análisis de las secuencias obtenidas

Los resultados de las corridas fueron analizados y corregidos con el paquete informático *Sequencing Analysis* y *Sequence Navigator* (*Applied Biosystems*). Posteriormente fueron reconocidas con *Blast* (NCBI), luego alineadas con *Clustal W 1.07*⁽¹⁸⁾ y la reconstrucción filogenética fue realizada con *PAUP*⁽¹⁹⁾, utilizando métodos de parsimonia, distancia y 1.000 réplicas de *bootstrap* para asignar el apoyo estadístico recibido por los distintos agrupamientos. En el caso de las reconstrucciones por parsimonia se realizaron búsquedas de tipo heurístico y luego el árbol consenso. En el caso de los análisis por distancias se utilizó *Kimura* con dos parámetros y *Neighbor Joining* como

algoritmo de agrupamiento. La secuencia de *Nocardia asteroides* fue utilizada como grupo externo⁽⁸⁾.

Resultados

Se procedió a la amplificación de ambos marcadores moleculares por PCR a partir de las extracciones de ADN (figura 1). De los 80 casos estudiados fueron obtenidas 75 amplificaciones positivas para el marcador IS6110. Las cinco muestras negativas mostraron amplificación cuando fueron contaminadas con ADN de *M. tuberculosis*, descartándose resultados falsos negativos.

La amplificación de fragmentos de ADN 16s ribosomal fue confirmada para los 80 casos, primero por tamaño en geles de agarosa y luego mediante la secuenciación automática de los productos amplificados con los métodos descritos.

Las secuencias generadas fueron revisadas manualmente con ayuda del programa *Sequence Navigator*. Su alineamiento preliminar y comparaciones usando *Blast* (NCBI), mostraron la existencia de un grupo de secuencias que se asociaban a las secuencias de *M. tuberculosis* depositadas en *GenBank* y de otro grupo, de cinco secuencias, coincidentes con las muestras negativas para IS6110 que se asociaron con cepas de micobacterias distintas de *M. tuberculosis*.

La incorporación de estas secuencias en un análisis filogenético junto con la base de datos generada a partir de *GenBank* y *Ribosomal Database*, permitió constatar que 75 cepas, positivas para el marcador IS6110, formaban un "cluster" compartiendo la posición topológica con la secuencia de referencia de *M. tuberculosis* (figura 2).

Las cinco cepas que resultaron con amplificación positiva sólo para el fragmento de ADN 16s se clasificaron en el árbol filogenético junto a distintas micobacterias *Mycobacterium no tuberculosis* (MNT). Dos de ellas se agruparon con las secuencias de referencia de *M. kansasii*; otras dos con secuencias de *M. fortuitum* y la restante se agrupó con la secuencia de *M. xenopi* (figura 2).

Como se muestra en la tabla 1, la frecuencia de aparición de *M. tuberculosis* y MNT fue 93,7% y 6,3%, respectivamente, con un predominio general de muestras de procedencia respiratoria. Dentro de las MNT, dos *M. kansasii*, una *M. fortuitum* y una *M. xenopi* se identificaron a partir de aislamientos de expectoración de pacientes con infecciones de localización pulmonar. La restante *M. fortuitum* se obtuvo a partir de una fístula de pierna, localización habitual para las infecciones oportunistas causadas por esta especie.

El estudio de las historias clínicas de los cuatro pacientes con enfermedad pulmonar MNT permite apreciar que se presentaron como cuadros respiratorios prolonga-

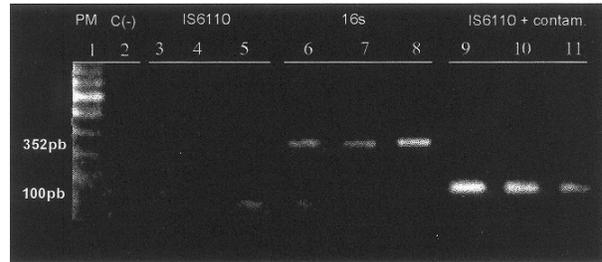


Figura 1. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los marcadores IS6110 y ADNr 16s. Carril 1 peso molecular, 100 pb. Carril 2, control negativo. Carriles 3, 4, y 5, muestras negativas para IS6110. Carriles 6 al 8, las mismas muestras amplificadas para ADNr 16s. Carriles 9 al 11, controles de inhibición (las mismas muestras, contaminados con ADN de *M. tuberculosis*).

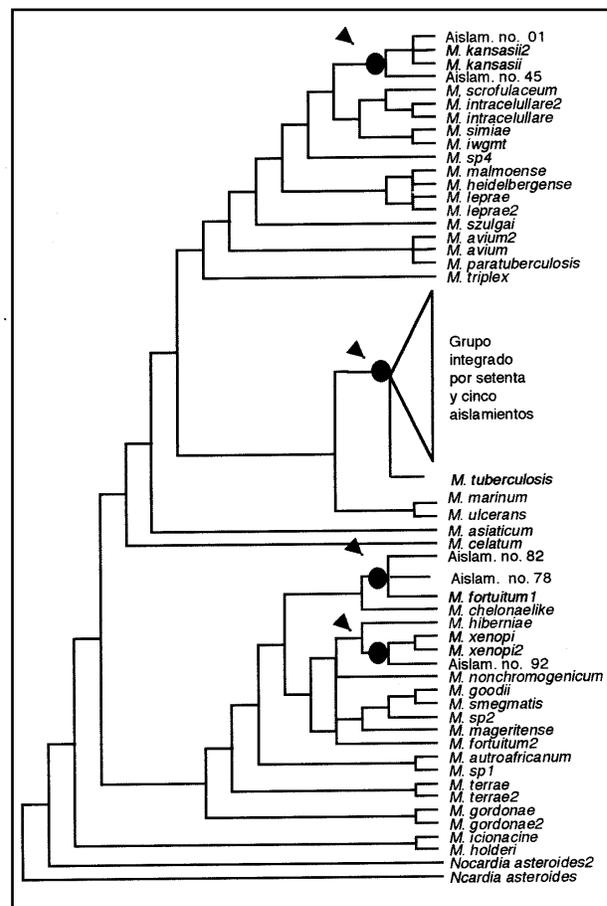


Figura 2. Árbol filogenético del género *Mycobacterium* generado a partir de datos del *GenBank* al que se agregaron las secuencias de los aislamientos analizadas en nuestro trabajo. Los círculos indican los lugares donde se ubicaron las secuencias de los aislamientos de la colección. Las especies extraídas de *GenBank* aparecen con su nombre y las de la colección como Aislam. (Aislamiento), seguidas por el número que recibieron en la colección. Aparece un grupo compacto de secuencias que se agrupa con *M. tuberculosis* (H37Rv; NC 000962) y otras dispersas que se agrupan con secuencias *Mycobacterium no tuberculosis*.

dos, radiológicamente compatibles con tuberculosis pulmonar y, como tales, tratados con triple plan que incluía pirazinamida (tabla 2)⁽²⁰⁾.

Discusión

Hemos caracterizado con marcadores moleculares una colección de aislamientos realizados durante la década de 1990 por nuestro laboratorio, reconocidos como pertenecientes al género *Mycobacterium*.

Las condiciones de amplificación tanto del fragmento de inserción IS6110 como del fragmento ADNr 16s fueron optimizadas satisfactoriamente en nuestro laboratorio. Como era de esperar, se obtuvo la amplificación del fragmento ADNr 16s en los 80 aislamientos estudiados. Sin embargo, sólo 75 resultaron positivos para el marcador IS6110. La doble condición, negativos IS6110 y positivos para ADNr 16s en cinco muestras luego de la amplificación por PCR planteó dos alternativas: a) la ausencia de los fragmentos de inserción IS6110 en las mismas, aun perteneciendo al complejo *M. tuberculosis*, o b) la existencia de *Mycobacterium* no tuberculosis. La consideración de la alternativa a) se fundamenta en que se ha comprobado la ausencia de este fragmento de inserción en algunas cepas del complejo *M. tuberculosis* de países asiáticos^(5,21). Sin embargo, para los casos de nuestra colección, la alternativa b) fue la correcta, al corroborarse por secuenciación automática que se trataba de secuencias características de MNT (figura 3).

Nuestros resultados indicaron, por tanto, que el fragmento de inserción IS6110 es un buen marcador para el diagnóstico de cepas del complejo *M. tuberculosis* en nuestro medio al igual que en otros países^(9,14,15). Su principal ventaja radica en la rapidez para alcanzar el resultado requerido; se necesita sólo una reacción de PCR a partir del ADN extraído y la visualización de los productos se

realiza con tinción de bromuro de etidio luego de realizada la electroforesis. No se requiere un sofisticado equipamiento y todos los procedimientos son realizables en un día de trabajo. Un resultado negativo de IS6110 no excluye la presencia de MNT.

El análisis de secuencias de ADNr 16s requiere de equipamiento más sofisticado, un secuenciador automático de ácidos nucleicos y bases de datos de referencia. La gran ventaja de esta metodología es, además de la rapidez, la amplitud de análisis posibles (todo el género *Mycobacterium*) y la capacidad de reconocer nuevos genotipos de micobacterias aún no descritos^(12,13). Por otra parte se elimina toda subjetividad en la interpretación así como los resultados falsos negativos. A diferencia de los fragmentos de inserción, las secuencias de ADNr 16s están siempre presentes porque forman parte estructural de los ribosomas⁽⁵⁾. Un negativo en la amplificación sólo puede atribuirse a problemas en la extracción de ADN si los reactivos y el equipamiento funcionan correctamente.

Dado que la procedencia de la mayor parte de las muestras fue de origen respiratorio, no es sorprendente este predominio de *M. tuberculosis* (93,6%) respecto a MNT (6,4%).

La confirmación de aislamientos MNT fundamentalmente en localizaciones pulmonares señala la necesidad, desde el punto de vista asistencial, de establecer un diagnóstico a nivel de especie, aun en países de baja incidencia de *M. tuberculosis* siguiendo las recomendaciones de la American Thoracic Society (ATS)⁽²⁰⁾.

La identificación de *M. kansasii* y *M. xenopi* en expectoraciones coincide con los datos de Estados Unidos, Canadá y Europa donde estas micobacterias constituyen la primera o segunda causa más frecuente de infección pulmonar crónica causada por micobacterias no tuberculosis con presentación clínico-radiológica semejante a la tuberculosis^(20,22).

Tabla 1. Composición de muestras de la colección proveniente de la AEPSM y caracterización de las cepas obtenidas

	Muestras pulmonares	Líquidos pleurales	Ganglios	Otras: líquido de rodilla, tiroides, cutáneas, cuerdas vocales	Totales
MTB	63	4	6	3	75
MNT	4 ^{F, 2K, X}	0	0	1 ^{F, *}	5
Total	67	4	6	4	80

En la tabla, fístula de pierna se representa con *, dos cepas *M. kansasii* con 2K, dos cepas *M. fortuitum* con F y *M. xenopi* con X. MTB (*M. tuberculosis*) MNT (*M. no tuberculosis*).

Tabla 2. Resumen de los datos clínicos y de laboratorio de cuatro pacientes portadores de <i>Mycobacterium no tuberculosis</i> en localización pulmonar	
<p>Nº de aislamiento: 78 Edad: 38 años Sexo: masculino Muestra: expectoración x 3 Cultivo positivo: mayo de 1993 Identificación fenotípica: <i>M. fortuitum</i> Directo: negativo x 3 Cultivo: positivo x 3 Identificación genotípica: <i>M. fortuitum</i></p>	<p>Cuadro respiratorio prolongado (cuatro meses). Radiológicamente presentó infiltrado intersticial con imagen hilar izquierda. Laringitis prolongada diagnosticada como monocorditis tuberculosa por otorrinolaringólogo. PPD de 5 mm. Recibe cuádruple plan antituberculosis. Buena evolución de la laringitis.</p> <p>Cumple con los criterios de la ATS*</p>
<p>Nº de aislamiento: 45 Edad: 28 años Sexo: femenino Muestra: expectoración x 1 Cultivo positivo: diciembre de 1995 Identificación fenotípica: <i>Mycobacterium</i> de crecimiento lento Niacina negativo Nitratos positivo Directo: negativo x 1 Cultivo: positivo x 1 Identificación genotípica: <i>M. kansasii</i></p>	<p>Desde 1986 presenta lesión de vértice derecho de Rx detectada en carné de salud. En 1994 se observa ampliación de la imagen radiológica, PPD 17 de mm y baciloscopia positiva. En diciembre de 1995 presentó hemoptisis, confirmada por ORL. En marzo de 1996 se derivó a dispensario de la Lucha Antituberculosa para su tratamiento antituberculosis (recibe triple plan con Rif, INH, Pyr)</p> <p>No cumple criterios de la ATS*: se envió una sola muestra al laboratorio.</p>
<p>Nº de aislamiento: 01 Edad: 22 años Sexo: femenino Muestra: expectoración x 3 Identificación fenotípica: <i>Mycobacterium</i> de crecimiento lento Niacina negativo Nitratos positivo Directo: positivo x 3 Cultivo: positivo x 3 Identificación genotípica: <i>M. kansasii</i></p>	<p>Cuadro respiratorio prolongado que radiológicamente muestra un proceso inhomogéneo en región subclavicular derecha con posible imagen excavada. Se derivó a dispensario de la Lucha Antituberculosa para su tratamiento antituberculosis.</p> <p>Cumple con los criterios de la ATS*</p>
<p>Nº de aislamiento: 92 Edad: 67 años Sexo: masculino Muestra: expectoración x 2 Cultivo positivo: noviembre de 1998 Identificación fenotípica: <i>Mycobacterium</i> de crecimiento lento. Niacina negativo Nitratos negativo Directo: positivo x 2 Cultivo: positivo x 2 Identificación genotípica: <i>M. xenopi</i></p>	<p>Bronquítico crónico, alcoholista con antecedente de tuberculosis a los 17 años. Síndrome de repercusión general. Síndrome febril prolongado. En radiografía de tórax se observa proceso exudativo excavado de hemitórax izquierdo.</p> <p>Recibe tratamiento antituberculosis (rifampicina, isoniacida, pyrazinamida)</p> <p>Cumple con los criterios de la ATS*</p>
<p>* American Thoracic Society⁽¹⁹⁾</p>	

chelonae y *M. mucogenicum*⁽¹³⁾, y en los pacientes inmunosuprimidos la posibilidad de establecer infecciones provocadas por micobacterias del complejo *M. avium-intracellulare*.

Finalmente, el estudio sistemático empleando técnicas moleculares como las descritas y otras complementarias revelarán la verdadera biodiversidad de especies de este género en nuestro país. Aunque los niveles de incidencia de tuberculosis en Uruguay son bajos⁽²⁵⁾, la situación regional y del mundo es diferente. Nuestros vecinos, Brasil y Argentina, presentan niveles de incidencia mayores^(26,27) y problemas adicionales por la existencia de cepas multirresistentes⁽²⁶⁻²⁸⁾. De acuerdo con los últimos informes de la Organización Mundial de la Salud, la tuberculosis es considerada una de las infecciones reemergentes a nivel mundial, esperándose que para el año 2010 ocupe el tercer lugar dentro de las enfermedades prevalentes⁽²⁹⁾.

La disponibilidad de estas tecnologías diagnósticas en nuestro medio preparará el terreno para permanecer atentos a estas realidades circundantes y a través de la evaluación de la biodiversidad se proveerán bases para su inclusión en futuros programas de vigilancia epidemiológica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la técnica de laboratorio Mylene Rodríguez (AEPSM) por la asistencia técnica en este trabajo.

Summary

Traditional methods to determine phenotype identification for mycobacterium are longer as compared with cellular procedures (4 to 6 weeks and 36 to 72 hours respectively).

In Uruguay, the incidence of tuberculosis *Mycobacterium* is low and data on pulmonary tuberculosis cases but caused by non-tuberculosis *Mycobacterium* (MNT) –normally saprophytes– is lacking.

From a therapeutic point of view, diagnosis based on an accurate identification of *Mycobacterium* infectant may be significant since treatment and management differ according to the strain found.

Two DNA molecular markers were chosen in our laboratory to diagnose *Mycobacterium* through genotype identification: IS6110 insertion element and ribosomal DNA sequences 16s (DNAr 16s) to determine specific identity within *Mycobacterium*.

Once selected molecular techniques were updated, we undertook a retrospective study of 80 isolates identified as *Mycobacterium* by phenotype methods. Most of the isolates (75/80) were tuberculosis *Mycobacterium* strains.

The remained five were identified as MNT strains, of which three caused pulmonary infections.

Résumé

Les méthodes traditionnelles d'identification phénotypique du genre *Mycobacterium* sont lentes et peu sensibles, quatre à six semaines étant nécessaires pour avoir un diagnostic approprié à partir d'une culture positive. Les procédés moléculaires ont permis de raccourcir cette période: on obtient des résultats au bout de 36-72 heures.

Dans notre pays, l'incidence de *M. tuberculosis* est basse et il n'y a pas de registres pour savoir la fréquence avec laquelle les cas diagnostiqués comme tuberculose pulmonaire sont en réalité causés par *Mycobacterium* non tuberculose (MNT), normalement saprophytes.

Du point de vue thérapeutique, le diagnostic étiologique à travers l'identification précise de l'espèce de mycobacterium infectante est un apport important, étant donné que le traitement varie selon l'espèce en question.

Voilà pourquoi on a introduit dans notre laboratoire le diagnostic de *Mycobacterium* à travers son identification génotypique. Pour ce faire, on a choisi deux marqueurs moléculaires d'ADN: la séquence d'insertion IS6110, caractéristique des génomes du complexe *M. tuberculosis*, et la séquence du gène ribosome 16s (ADN 16s) pour étudier l'identité spécifique dans le genre *Mycobacterium*.

Une fois mises à point les techniques moléculaires sélectionnées, on fait une étude rétrospective d'une collection de 80 isolaments, identifiés comme *Mycobacterium* par des méthodes phénotypiques. La plupart des isolaments (75/80) étaient des cèpes du complexe *M. tuberculosis*. Les autres cinq ont été identifiés comme des cèpes MNT, dont trois étant la cause d'infections pulmonaires.

Bibliografía

1. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 1990; 40(4): 323-30.
2. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (Jr). *Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 1997: 893-952.
3. Brooks RW, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. V. Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics. *Am Rev Respir Dis* 1983; 130(4): 630-3.
4. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC. Two-laboratory study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2): 296-303.
5. Hale YM, Pfyffer GE, Salfinger M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clin Infect Dis* 2001; 33(6): 834-46.

6. **Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT.** PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds.). Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Mayo Foundation. Rochester, MN 55905. Washington: American Society for Microbiology, 1993: 191-6.
7. **Clarridge JE 3rd, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB.** Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine microbiology laboratory. J Clin Microbiol 1993; 31(8): 2049-56.
8. **Kirschner P, Meier A, Böttger E.** Genotypic identification and detection of *Mycobacteria*: Facing novel and uncultured pathogens. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds.). Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Mayo Foundation. Rochester, MN 55905. Washington: American Society for Microbiology, 1993: 173-89.
9. **Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT.** IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. Mol Cell Probes 1991; 5(1): 73-80.
10. **Nolte FS, Metchock B, McGowan JE Jr, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, et al.** Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993; 31(7): 1777-82.
11. **Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M.** Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. J Clin Microbiol 1997; 35(11): 2733-9.
12. **Relman D.** Universal Bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds.). Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Mayo Foundation. Rochester, MN 55905. Washington: American Society for Microbiology, 1993: 489-95.
13. **Patel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I.** Sequence-Based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16s rDNA bacterial identification system. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 246-51.
14. **Gillespie SH, McHugh TD, Newport LE.** Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1997; 35(3): 799-801.
15. **Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates JH, et al.** Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1994; 32(1): 262-6.
16. **Sola C, Horgen L, Goh KS, Rastogi N.** Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes. J Clin Microbiol 1997; 35(4): 843-6.
17. **Doolittle WF.** Phylogenetic classification and the universal tree. Science 1999; 284(5423): 2124-9.
18. **Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R, Clustal V.** 1:07: improved software for multiple sequence alignment. Comput Appl Biosci 1997; 8(2): 189-91.
19. **Swofford DL.** PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony. (*and other methods). Version 4.0b2. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.
20. **Wallace RJ Jr, Cook JL, Glassroth J, Griffith DE, Olivier KN, Gordin F.** Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. American Thoracic Society. Official statement approved by the board of directors. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156(2 Pt 2): S1-25.
21. **Se Thoe SY, Tay L, Sng EH.** Evaluation of Amplicor- and IS6110-PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Singapore. Trop Med Int Health 1997; 2(11): 1095-101.
22. **Brown BA, Wallace RJ Jr.** Infectious due to nontuberculous mycobacteria In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 5^a ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 2630-6.
23. **Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ Jr.** *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron JO, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999: 399-437.
24. **Wallace RJ Jr, Swenson JM, Silcox V, Good RC, Tschén JA, Stone MS.** Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. Rev Infect Dis 1983; 5(4): 657-79.
25. **Bazerque E.** Comisión honoraria para la lucha antituberculosa y enfermedades prevalentes. Informe trienio 1995-97. Montevideo: Ministerio de Salud Pública, 1997: 22 p.
26. **Kochi A.** The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization (WHO). Tubercle 1991; 72(1): 1-6.
27. **Cohn DL, F Bustero, MC Raviglione.** Drug resistance tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATDL Global Surveillance Project. Clin Infect Dis 1997; 24(suppl 1): S121-S130.
28. **Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A.** Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995; 273(3): 220-6.
29. **Goodman RA, Foster KL, Trowbridge FL, Figueroa JP.** Global disease elimination and eradication as public health strategies: Proceedings of a conference; 1996 Feb 23-25. Atlanta Georgia, EEUU. Bull WHO 1996; 76(suppl 2): 48.