

Identificación molecular de especies de *Mycobacterium* aisladas de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis

Carlos García-Cortés¹, Perla M. Martínez-Cruz^{2,4}, Edith A. Bernabé Pérez², Jesús Muñoz-Rojas³ , Lucía Martínez-Martínez^{2*} .

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, Oaxaca, México.

² Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, Oaxaca, México. Carretera a San Felipe del Agua s/n, Exhacienda de Aguilera, Oaxaca, Oaxaca, México. C.P. 68020, Tel 951-5139784.

³ Grupo Ecology and Survival of Microorganisms, Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

⁴ División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca, México.

*Email autor corresponsal: lumartin1969@yahoo.com.mx

Recibido: 27 noviembre 2020. **Aceptado:** 8 febrero 2021

RESUMEN

Antecedentes: La incidencia de tuberculosis (TB) en México aumenta debido, entre otras causas, a un diagnóstico inespecífico o retardado. Marcadores moleculares como los genes *rpoB* y *16S rRNA* se han utilizado en la identificación del género *Mycobacterium*. La secuencia de inserción 6110 (IS6110) ha sido empleada como marcador genético en la genotipificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB).

Objetivo: Realizar un estudio retrospectivo para evaluar a los genes *rpoB*, *16S rRNA* y la IS6110, en la identificación de aislados del género *Mycobacterium* y del CMTB.

Métodos: Se analizaron 146 muestras clínicas. Empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron fragmentos de los genes *rpoB*, *16S rRNA* e IS6110. La especie *M. bovis* fue identificada mediante un ensayo de PCR Multiplex.

Resultados: En 65 muestras clínicas se determinó la presencia de micobacterias mediante amplificación de los genes *16S rRNA* y *rpoB*. En 22/65 aislados se amplificaron únicamente los genes *rpoB* y/o *16S rRNA*. La presencia del CMTB se confirmó en 43/65 aislados mediante la amplificación

de la IS6110. La comparación de las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados de los genes *rpoB*, *16S rRNA* y la IS6110 con las reportadas en el GenBank, demostró una homología de 98%-100% con especies de micobacterias pertenecientes al CMTB.

Discusión: El uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades infecciosas permite obtener resultados precisos y en tiempos cortos. En el caso de las infecciones por micobacterias, el empleo de los marcadores genéticos *rpoB*, *16S rRNA* y la IS6110 coadyuva al diagnóstico diferencial entre TB y micobacteriosis, lo que contribuye a orientar el tratamiento que se administre al paciente.

Palabras clave: Diagnóstico, IS6110, *Mycobacterium*, *rpoB*, *16S rRNA*, tuberculosis.

ABSTRACT

Background: Tuberculosis (TB) incidence in Mexico is increasing due to an unspecific or delayed diagnosis, among several other causes. Molecular markers such as *rpoB* and *16S rRNA* genes have been used to identify the *Mycobacterium* genus. Insertion sequence 6110 (IS6110) has been used as a genetic marker in *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) genotyping.

Objective: To perform a retrospective study to evaluate *rpoB* and *16S rRNA* genes and IS6110 usefulness to identify the *Mycobacterium* genus and MTBC isolates.

Methods: A total of 146 clinical samples were analyzed. Amplification products from *rpoB*, *16S rRNA* and IS6110 were obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR). *M. bovis* was identified using a Multiplex PCR assay.

Results: Mycobacteria were identified in 65 clinical samples as shown by *rpoB* and *16S rRNA* genes amplification. In 22 isolates (22/65) amplification products were obtained only for *rpoB* and/or *16S rRNA* genes. MTBC presence was confirmed in 43/65 isolates as IS6110 amplification product was obtained. Sequencing products of *rpoB*, *16S rRNA* and IS6110 showed 98%-100% homology with MTBC species reported in the GenBank database.

Discussion: Inclusion of molecular techniques in infectious diseases diagnosis allows to get precise results in short time. In mycobacterial infections, molecular makers such as *rpoB*, *16S rRNA* and IS6110, largely contribute to make a specific diagnosis and differentiate between TB and micobacteriosis, leading to the best treatment administration to the patient.

Keywords: Diagnosis, IS6110, *Mycobacterium*, *rpoB*, *16S rRNA*, tuberculosis.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es un padecimiento infeccioso y transmisible. De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), afecta a una tercera parte de la población mundial, convirtiéndola en uno de los principales problemas de salud [1]. El agente causal de la TB es un bacilo Gram-positivo de lento crecimiento perteneciente al género *Mycobacterium*. Se ha identificado un grupo de estos microorganismos como los responsables de la enfermedad y se le ha designado “complejo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMTB), el cual agrupa a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* y *M. orygis*. La elevada homología de los genomas de las especies del CMTB permite el uso de ciertas regiones como marcadores en la identificación de un probable caso de TB [2].

La identificación molecular de bacterias se realiza empleando genes altamente conservados entre las especies. En el caso del género *Mycobacterium* los genes *16S rRNA* y *rpoB* se han utilizado con éxito. Pocos genes se encuentran tan conservados entre especies pertenecientes al mismo género como el *16S rRNA*. Este gen tiene una secuencia de hasta 1550 pb que contiene tanto regiones conservadas como variables. En la identificación de bacterias en aislados clínicos,

en general, son útiles las primeras 500 pb para realizar una adecuada identificación [3]. En el caso de las micobacterias, se han diseñado oligonucleótidos que permiten amplificar, eficientemente, fragmentos de entre 500-550 pb correspondientes a segmentos no polimórficos del *16S rRNA* [2]. El gen *rpoB* es unicopia de 723 pb que contiene cuatro regiones conservadas y tres regiones variables. Kim *et al.*, obtuvieron y compararon la secuencia completa de este gen en 44 especies de micobacterias, concluyendo que existe un 93.1% de homología entre especies no patógenas y que un fragmento de 306 pb, localizado en una región muy conservada del gen, presenta una secuencia idéntica en las especies pertenecientes al CMTB [4]. Se ha empleado el gen *rpoB* –junto con otros genes como *hsp65* y *16S rRNA*– para detectar especies de micobacterias, especialmente las del CMTB [5], así como en el diagnóstico diferencial de especies del complejo *M. avium* [6,7] y otras especies de micobacterias no tuberculosas (MNTB) [8].

La secuencia de inserción 6110 (IS6110), es un fragmento de 1355 pb que se encuentra inserto en un arreglo de 36 pb, denominado regiones repetidas directas (DR) [9]. La secuencia IS6110 sólo es detectable en genomas del CMTB y tiene la estabilidad necesaria para ser utilizada como herramienta de diagnóstico [10].

Fue descrita en 1990 [11] como un elemento de inserción micobacteriano que se ha utilizado sistemáticamente como marcador genético para la genotipificación de especies de CMTB dado su nivel de conservación entre ellas mediante el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) [12-14].

La diferenciación entre especies del CMTB es importante para fines de administración de pirazinamida, uno de los principales antifímicos empleados en el tratamiento contra TB. *M. bovis* presenta resistencia intrínseca a este fármaco debido al cambio C por G en la posición 169 del gen *pncA* por lo que este polimorfismo se ha empleado como marcador molecular en la identificación de esta especie [15,18].

La incidencia de TB en México va en aumento debido, entre otras causas, al retraso en la administración de un tratamiento adecuado como consecuencia de un diagnóstico inespecífico o retardado. Por lo que el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio retrospectivo para evaluar la utilidad de los genes *rpoB*, *16S rRNA* e *IS6110*, como marcadores genéticos en la identificación de aislados del género *Mycobacterium*, así como del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

METODOLOGÍA

Muestras clínicas y descontaminación

Durante el periodo 2006 a 2008, se obtuvieron aislados de 146 muestras clínicas provenientes de 106 pacientes quienes fueron diagnosticados clínicamente con TB en instituciones públicas de salud del estado de Oaxaca. El 95% (139) de las muestras fueron expectoraciones y el 5% (7) correspondieron a: jugo gástrico (3), líquido ascítico (1), líquido pleural (1), heces (1) y orina (1). En este estudio se incluyeron las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* AN5 y *M. canetti* 1728. Las muestras de expectoración fueron descontaminadas empleando el método modificado de Petroff [16] previo a la extracción de ADN.

Extracción de ADN

La extracción del ADN total se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando el kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega. Madison, WI, USA). El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría UV (Nanodrop Lite, ThermoScientific. Waltham, MA, USA) y se observó en gel de agarosa al 0.8%.

Ensayos moleculares

Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descritas a continuación se realizaron en un volumen final de 50µL, el cual

contenía Buffer 1X, mezcla de dNTPs 10 mM, MgCl₂ 25 mM, 1.25 U *taq* ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega. Madison, WI, USA) y 20 ng/μL de ADN obtenido a partir de cada aislado clínico. Los oligonucleótidos correspondientes para cada reacción se muestran en la Tabla 1. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Amplificación de genes *16S rRNA* y *rpoB*

La identificación de aislados del género *Mycobacterium* se realizó mediante la amplificación, por separado, de dos fragmentos de 543 pb y 359 pb correspondiente a los genes

16S rRNA y *rpoB*, respectivamente [2].

Amplificación de la *IS6110*

La amplificación de un fragmento de 245 pb de la secuencia de inserción 6110 (*IS6110*) fue efectuada para determinar la presencia de aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* [17].

PCR multiplex

La diferenciación entre *M. bovis* y otras especies del CMTB se estableció mediante la amplificación de dos fragmentos del gen *pncA* en un ensayo de PCR multiplex de acuerdo a lo descrito previamente [18]. La secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación.

	Primer	Secuencia	Producto	Condiciones
<i>IS6110</i>	INS-1 INS-2	CGTGAGGGCATCGAGGTGGC GCGTAGGCGTCGGTGACAAA	245	94°/30 seg 65°/2 min 72°/3 min
<i>16S rRNA</i>	16SrNAF 16SrNAR	ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTCA	543	94°/1 min 60°/1 min 72°/1 min
<i>rpoB</i>	rpoBF rpoBR	TCAAGGAGAAGCGCTACGA GGATGTTGATCAGGGTCTGC	359	94°/1 min 60°/1 min 72°/1min
<i>pncA</i>	JB21 JB22	TCGTCCGCTGATGCAAGTGC CGTCCGCTGACCTCAAGAAAG	500	94°/1 min 67°/1 min 72°/1 min
	pncATB-1.2 pncAMT-2	ATGCGGGCGTTGATCATCGTC CGGTGTGCCGAGAAGCGG	185	72°/1 min

Secuenciación

Los productos de amplificación correspondientes a los genes *16S rRNA*, *rpoB* y la *IS6110* se purificaron mediante minicolumnas (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Promega, Madison, WI, USA) y fueron enviados a secuenciación a la empresa Macrogen (Rockville, USA). Los oligonucleótidos empleados para este proceso fueron: *rpoBF*, *INS-1* y *16SRNAF* (Tabla 1).

Análisis de similitud de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de cada uno de los amplificados, se analizaron empleando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar su homología con genomas de otros organismos reportados previamente.

RESULTADOS

Se analizaron 146 aislados clínicos para la identificación de micobacterias. La amplificación de los genes *IS6110* y/o *16S rRNA* y/o *rpoB* en 44.5% (65) de las muestras confirmó la existencia de aislados del género *Mycobacterium*; en tanto que en el 55.5% (81) restante, no se obtuvieron amplificados. En 43 de los 65 aislados se confirmó la presencia del CMTB al obtenerse el producto de amplificación de 245 pb correspondiente a la

IS6110, específico de este grupo de micobacterias. En las 22 muestras restantes no se observó la amplificación de la *IS6110*, aun cuando si se obtuvo el amplicón para el gen *16S rRNA* y/o *rpoB* (Tabla 2).

Los 43 aislados que mostraron la *IS6110* por PCR se clasificaron en tres grupos de acuerdo al número de marcadores amplificados como se describe a continuación.

En 10 de los 43 aislados (Tabla 2) se obtuvieron productos de PCR para los tres marcadores analizados (*16S rRNA*, *rpoB* e *IS6110*). De estos 10 aislados, 7 mostraron crecimiento en medio de cultivo Lowenstein-Jensen específico para micobacterias tuberculosas, identificando mediante morfología colonial que tres de ellas (24, 91 y 113) son semejantes a la cepa de referencia H37Ra de *M. tuberculosis*; dos (32a y 95), a *M. canettii* 17228; y, finalmente, los aislados 36 y 92 presentaron combinaciones de características identificadas en ambas cepas de referencia. Adicionalmente, para las muestras 24, 36, 91, 92, 95 y 113 se obtuvieron las secuencias de los fragmentos amplificados de los genes *rpoB*, *16S rRNA* e *IS6110*, las cuales posteriormente se compararon con lo reportado en el GenBank mediante la herramienta BLAST, observándose una similitud de secuencia nucleotídica de 98-100% con especies de micobacterias pertenecientes al CMTB (Tabla 3).

Tabla 2. Amplificación de marcadores moleculares. NR: No realizado

ID aislado	Origen del aislado	PCR		
		IS6110	16S	<i>rpoB</i>
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Cultivo	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	Cultivo	+	+	+
<i>M. canetti</i> 1728	Cultivo	+	+	NR
24, 32a, 36, 48, 89, 91, 92, 95, 113, 158	Expectoración	+	+	+
61, 65, 93	Expectoración	+	+	-
131a, 166a, 184	Expectoración	+	-	+
15, 46, 49, 69, 97, 104, 130, 133a, 135a, 138a, 146b, 147b, 148a, 148b, 149b, 150b, 166, 169a, 177, 177a, 178a, 180, 181, 181a, 182, 198a	Expectoración	+	-	-
109	Expectoración	-	+	+
57, 57a, 67a, 75, 82a, 103, 129a, 155a, 160a, 172a	Expectoración	-	+	-
68b, 154b, 160, 161, 161a, 166b, 167a, 171a, 183, 192a	Expectoración	-	-	+
11	Jugo gástrico	+	-	-
23	Heces	-	+	+

La amplificación de la IS6110 en seis aislados (61, 65, 93, 131a, 166a, y 184) coincidió con la presencia de dos marcadores, el fragmento del 16S *rRNA* (61, 65, 93) y del *rpoB* (131a, 166a, 184). Al comparar la secuencia de los fragmentos correspondientes a la IS6110 (65, 93) y 16S *rRNA* (93) con lo reportado en el GenBank (Tabla 3), se identificó una similitud de secuencia nucleotídica de 98% y 99% correspondiente a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. microti*, respectivamente (Tabla 3). Adicionalmente, la morfología de las colonias observadas en cultivo de la muestra 93, coinciden con la cepa de referencia de *M. bovis*

AN5.

Finalmente, se identificó un grupo de 27 aislados (27/43) en las que sólo se obtuvo el amplicón de 245pb correspondiente a la IS6110 (Tabla 2). Además del resultado de esta prueba molecular, el aislado 138a mostró colonias semejantes a la cepa de referencia de *M. bovis* AN5 en cultivo Lowenstein-Jensen. La identificación de este aislado como *M. bovis* se confirmó mediante el ensayo de PCR multiplex, mismo que demostró que el aislado 147b también pertenece a *M. bovis*.

Tabla 3. Similitud de secuencias nucleotídicas obtenidas de los aislados clínicos con las reportadas en GenBank.

Aislado	Gen	Especie reportada (BLAST)	Homología (%)
24	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	100
36	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	99
	<i>rpoB</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	99
65	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	98
91	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	99
	<i>rpoB</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	99
92	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	96
	16S rRNA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	99
	<i>rpoB</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	99
93	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	99
	16S rRNA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	99
95	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	98
	16S rRNA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	99
	<i>rpoB</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	99
113	IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium microti</i>	96
	16S rRNA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	98

En siete pacientes se analizaron muestras de días consecutivos. Los aislados 57/57a, mostraron únicamente el amplicón correspondiente a *16S rRNA*; en tanto, con los aislados 161/161a se amplificó solamente el gen *rpoB*. Al analizar los aislados 148a/148b, 177/177a y 181/181a mostraron el fragmento de 245 pb correspondiente a la *IS6110*, no así los productos de *rpoB* y *16S rRNA* (Tabla 2). En cuanto a los aislados 160/160a, se obtuvo de cada uno distintos amplicones, ambos resultados coinciden en mostrar la presencia de micobacterias y la ausencia de aislados del CMTB en el paciente. Finalmente, en los aislados 166/166a/166b se presentó un patrón distinto para cada uno (Tabla 2); sin embargo, dos de ellos muestran el amplificado para la *IS6110* que, como se ha comentado previamente, es suficiente para demostrar la presencia de aislados del CMTB en las muestras clínicas analizadas.

DISCUSIÓN

La TB es una enfermedad reemergente que presenta una creciente incidencia en México. El diagnóstico rápido y preciso del agente infeccioso es de suma importancia en la administración del tratamiento adecuado a cada paciente. No resulta fácil determinar la presencia de aislados del CMTB a través de los métodos convencionales de diagnóstico como la tinción de Ziehl-Nielsen o el cultivo en medio

Lowenstein Jensen (LJ), debido a la baja sensibilidad del primero (0-40%) y, en el caso del cultivo, al prolongado tiempo de crecimiento de estos microorganismos, sumado a la poca disponibilidad de laboratorios con las medidas de seguridad requeridas para su manejo [19-21]. Desde hace más de una década se ha recomendado el empleo de técnicas de diagnóstico molecular basadas en la amplificación de marcadores genéticos, siendo posible confirmar en menor tiempo con relación a otras técnicas si la infección es provocada por alguna especie del CMTB [22-25].

Diversos estudios encaminados a la evaluación de marcadores moleculares para la identificación del CMTB validan sus resultados al compararlos con los obtenidos en medio de cultivo Lowenstein-Jensen [26-28]. En este trabajo se adoptó la misma estrategia, observándose crecimiento únicamente en 9 aislados. Este comportamiento puede deberse a diversos factores entre ellos el manejo de la muestra clínica, ya que las especies del CMTB son viables por poco tiempo fuera del organismo hospedero, por lo que la probabilidad de crecimiento en cultivo depende de la rapidez con la que se siembre la muestra, el número de bacilos presentes, pH favorable – contrario a lo que ocurre en orina y jugo gástrico, por ejemplo- y la exposición a calor o luz solar [29,30].

En el presente estudio, se considera que otro factor que afectó el crecimiento bacteriano en medio de cultivo fue la exposición a antifímicos en 22 pacientes incluidos, quienes habían finalizado su tratamiento entre 7 a 30 días antes de la obtención de la muestra. En estos casos, se observó la amplificación del gen *16S rRNA*, pero sin crecimiento bacteriano en medio de cultivo, resultado que concuerda con lo observado por Rodríguez y colaboradores, quienes obtuvieron muestras de expectoración semanas después de que el paciente inició el tratamiento, siendo positivas al ensayo molecular pero negativas al cultivo [31]. En el trabajo publicado por Hashimoto *et al.*, reportan el caso de un paciente a quien se diagnosticó TB mediante cultivo y recibió tratamiento antifímico durante tres meses. Transcurrido el periodo se recolectó una nueva muestra, la cual fue cultivada sin éxito y, sin embargo, se amplificó la *IS6110* mediante PCR [32]. En un estudio realizado en los países bajos, la *IS6110* fue amplificada en 9 de 17 pacientes de cuyas muestras clínicas no se obtuvo crecimiento bacteriano en cultivo [33]. Por lo anterior, es importante considerar la historia clínica del paciente a fin de coleccionar la muestra, previo a la administración de cualquier tratamiento, ya que los fármacos influyen en el análisis, así como en el resultado mismo del diagnóstico. Considerando en este caso el éxito del

tratamiento, motivo por el cual el cultivo resultó negativo.

El empleo de marcadores moleculares en la identificación de especies de microorganismos en aislados clínicos, favorece la certeza del diagnóstico. En el caso de las infecciones por micobacterias, es muy importante distinguir entre las provocadas por el CMTB y las causadas por micobacterias atípicas también denominadas micobacterias no tuberculosas (MNTB). La elevada homología que presentan genes como el *16S rRNA* y *rpoB* entre las especies del género *Mycobacterium*, ha permitido el empleo de fragmentos específicos para su identificación precisa [2,34,35]. Ambos marcadores han sido empleados para la identificación de micobacterias en humanos en quienes pueden provocar TB [5], lepra [36] o micobacteriosis [6,7,37]. Incluso se han diseñado ensayos para confirmar la presencia de este género entre la diversidad de microorganismos que pudieran estar presentes en una muestra clínica [38]. Reportes del uso de estos marcadores incluyen una diversidad de muestras, entre ellas suelo [39] y peces [40], confirmando la eficacia y precisión de estos genes en la identificación del género *Mycobacterium*. Con base en lo anterior, en 38 aislados con la amplificación del gen *16S rRNA* (13), *rpoB* (13) o ambos genes (12) se identificó la presencia de micobacterias, 22 de las cuales

corresponden a micobacterias atípicas o MNTB con ausencia del amplificado correspondiente a la *IS6110*.

La *IS6110* es una región exclusiva de las especies que forman el CMTB [9,11,41,42]. Desde su descripción se ha utilizado tanto para la identificación de especies del CMTB como para su genotipificación mediante ensayos de RFLP y *fingerprinting* [13,43]. En el presente trabajo se observó que 27 aislados amplificaron este marcador genético, pero con ausencia de amplificados para el gen *16S rRNA* y/o *rpoB*, esto posiblemente debido a la baja calidad del material genético al momento de realizar la amplificación, mal manejo del ADN utilizado y/o la posibilidad de la presencia de inhibidores en la reacción. Reportes previos de estudios realizados en México identificaron la presencia del CMTB empleando únicamente la *IS6110* [44,45] validando su utilidad y confirmando que, por sí mismo, la *IS6110* es un marcador adecuado para el diagnóstico de TB.

CONCLUSIONES

La inclusión de pruebas moleculares en el panel de estudios de laboratorio realizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, permite obtener resultados precisos y en tiempos cortos. En el caso de las infecciones por micobacterias es muy importante determinar si éstas son causadas o no por

especies del CMTB, lo que servirá para orientar en primera instancia, el tratamiento que se administre al paciente.

Los marcadores moleculares *16S rRNA* o *rpoB* son útiles para el diagnóstico de micobacteriosis mediante el análisis de amplicones específicos de 543 y 359 pb respectivamente. La *IS6110* es eficiente, por su especificidad, en la determinación de la presencia de aislados pertenecientes al CMTB en muestras clínicas. En el presente trabajo, con el empleo de estos marcadores genéticos, se identificaron 43 aislados del CMTB y 22 aislados de MNTB. Los cultivos realizados a partir de las muestras clínicas, así como las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados, confirman los resultados obtenidos en este estudio validando la utilidad de estos marcadores en la identificación de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas. Con base en la evidencia, estos marcadores moleculares pueden ser empleados para obtener un diagnóstico confiable de TB en periodos cortos, superando en estas características a los métodos convencionales de microscopia y cultivo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

El apoyo financiero para la realización del presente trabajo se obtuvo a través del Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) y el Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP).

REFERENCIAS

- [1]. WHO. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
- [2]. Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4): p. 1637-1650.
- [3]. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4): p. 840-862.
- [4]. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Chae GT, Kim EC, *et al.* Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6): p. 1714-1720.
- [5]. Huang CC, Chen JH, Hu ST, Chiou CS, Huang WC, Hsu JY, *et al.* Combined *rpoB* duplex PCR and *hsp65* PCR restriction

fragment length polymorphism with capillary electrophoresis as an effective algorithm for identification of Mycobacterial species from clinical isolates. *BMC Microbiol.* 2012; 12: p. 137.

- [6]. Jang MA, Koh WJ, Huh HJ, Kim SY, Jeon K, Ki C S, *et al.* Distribution of Nontuberculous Mycobacteria by Multigene Sequence Based Typing and Clinical Significance of Isolated Strains. *J Clin Microb.* 2014; 52(4): p. 1207-1212.
- [7]. Kim SY, Shin SJ, Lee NY, Koh WJ. First Case of Pulmonary Disease Caused by a *Mycobacterium avium* Complex Strain of Presumed Veterinary Origin in an Adult Human Patient. *J Clin Microb.* 2013; 51(6): p. 1993-1995.
- [8]. Phelippeau M, Osman DA, Musso D, Drancourt M. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in French Polynesia. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(12): p. 3798-3804.
- [9]. Roychowdhury T, Mandal S, Bhattacharya A. Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep.* 2015; 5: p. 12567.
- [10]. Barrón H, Monteghirfo M, Rivera N. Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. *An Fac Med Lima.* 2006; 67(1): p. 11-

18.

[11]. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, *et al.* IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res. 1990; 18(1): p. 188.

[12]. Nghiem MN, Nguyen BV, Nguyen ST, Vo TT, Nong HV. A Simple, Single Triplex PCR of IS6110, IS1081, and 23S Ribosomal DNA Targets, Developed for Rapid Detection and Discrimination of *Mycobacterium* from Clinical Samples. J Microbiol Biotechnol. 2015; 25(5): p. 745-752.

[13]. Phyu WE, Wah WA, Jong SL, Go-Eun C, Chulhum LC. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods. J. Korean Med Sci. 2016; 31(11): p. 1673-1683.

[14]. Zaczek A, Brzostek A, Wojtasik A, Sajduda A, Dziadek J. Comparison of ligation-mediated PCR methods in differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains. Biomed Res Int. 2014;(782071).

[15]. Espinosa de los Monteros LE, Galán JC, Gutiérrez M, Samper S, García Marín JF, Martín C, *et al.* Allele-Specific PCR Method Based on *pncA* and *oxyR* Sequences for Distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M. bovis pncA* Sequence Polymorphism. J. Clin.

Microbiol. 1998; 36(1): p. 239-242.

[16]. Peres RL, Maciel EL, Morais CG, Ribeiro FC, Vinhas SA, Pinheiro C, *et al.* Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; 13(12): p. 1572-1575.

[17]. Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1996; 34(4): p. 933-938.

[18]. Shah DH BR, Bakshi CS, Singh RK. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiology Letters. 2002; 214(1): p. 39-43.

[19]. Babafemi EO, Cherian BP, Banting L, Mills GA, Ngianga K2. Effectiveness of real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pathological samples: a systematic review and meta-analysis. Syst. Rev. 2017; 6(1): p. 215.

[20]. Guajardo-Lara C, Saldaña -Ramírez MI, Hernández-Galván NN, Dimas-Adame MA, Valdovinos-Chávez S. MGIT y otros métodos para diagnosticar tuberculosis en un sistema hospitalario privado con baja incidencia. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2018; 56(2): p. 158-162.

- [21]. Maldonado-Bernal C, Ramos-Garibay A, Rios-Sarabia N, Serrano H, Carrera M, Navarrete-Franco G, *et al.* Nested Polymerase Chain Reaction and Cutaneous Tuberculosis. *Am J Dermatopathol.* 2018; 41(6): p. 428-435.
- [22]. Li, S., Liu, B., Peng, M., Chen, M., Yin, W., Tang, H., Ren, H. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12(7): p. e0180725.
- [23]. Altez-Fernandez C, Ortiz V, Mirzazadeh M, Zegarra L, Seas C, Ugarte-Gil C. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests (NAATs) in urine for genitourinary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2017; 17(1).
- [24]. Mendez-Samperio P. Diagnosis of Tuberculosis in HIV Co-infected Individuals: Current Status, Challenges and Opportunities for the Future. *Scand J Immunol.* 2017; 86(2): p. 76-82.
- [25]. Nathavitharana RR, Cudahy PG, Schumacher SG, Steingart KR, Pai M, Denkinger CM. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2017; 49(1).
- [26]. Akkaya O, Kurtoglu MG. Comparison of Conventional and Molecular Methods Used for Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. *Clin Lab.* 2019; 65(10).
- [27]. Al-Mahbashi AA, Mukhtar MM, Mahgoub ES. Molecular typing of *Mycobacterium* spp. isolates from Yemeni tuberculosis patients. *East Mediterr Health J.* 2013; 19(11): p. 942-946.
- [28]. Shakeel K, Iram S, Akhtar M, Hussain S, Maryam H, Anwar A. Diagnostic validation of rapid molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pus samples by GeneXpert. *J Pak Med Assoc.* 2018; 68(1): p. 33-37.
- [29]. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar.* 2007; 30(Supl 2): p. 67-84.
- [30]. OPS. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica - Parte 2. Cultivo. Lucía Barrera CGM, editor. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2008.
- [31]. Rodríguez AJ, Palma S, Maestre JL, Saavedra D, Reyes T, Perovani M. Detección de micobacterias en muestras clínicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Rev Biomed.* 2000; 11(4): p. 257-262.
- [32]. Hashimoto T, Suzuki K, Amitani R, Kuze F. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by the amplification of IS6110. *Intern Med.* 1995; 34(7): p. 605-610.
- [33]. Kolk AH, Kox LF, van Leeuwen J,

Kuijper S, Jansen HM. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. 1988; 11(6): p. 1222-1226.

[34]. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bötter EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol*. 1996; 32(2): p. 296-303.

[35]. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases: Identifying Nontuberculous Mycobacterium Species. *J Clin Microbiol*. 2002; 39(10): p. 3637–3648.

[36]. Marques LÉC, Frota CC, Quetz JDS, Bindá AH, Mota RMS, Pontes MAA, *et al.* Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. *Pathog Glob Health*. 2018; 112(2): p. 72-78.

[37]. Ngan GH, Ng LM, Jureen R, Lin RT, Teo JW. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. *Leet Appl Microbiol*. 2011; 52(5): p. 546-554.

[38]. Satilmis S, Ulger Toprak N, Iling C, Soyletir G. Evaluation of direct 16S rRNA PCR

from clinical samples for bacterial detection in normally sterile body sites. *J Infect Dev Ctres*. 2019; 13(11): p. 978-983.

[39]. Nieminen T, Pakarinen J, Tsitko I, Salkinoja -Salonen M, Breitenstein A, Ali-Vehmas T, *et al.* 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *J Microbiol Methods*. 2006; 67(1): p. 44-55.

[40]. Puk K, Banach T, Wawrzyniak A, Adaszek L, Ziętek J, Winiarczyk S, *et al.* Detection of *Mycobacterium marinum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* and *M. abscessus* in aquarium fish. *J Fish Dis*. 2018; 41(1): p. 153-156.

[41]. Sinha P, Gupta A, Prakash P, Anupurba S, Tripathi R, Srivastava GN. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32 kD alpha antigen encoding gene fragments. *BMC Infect Dis*. 2016; 16(123).

[42]. Sposito FLE, Campanerut P AZ, Ghiraldi LD, Leite CQF, Hirata MH, R.D.C. H, *et al.* Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Braz J Microbiol*. 2014; 45(3): p. 841-843.

[43]. Merker M, Kohl TA, Niemann S, Supply P. The Evolution of Strain Typing in the

Mycobacterium tuberculosis Complex. Adv Exp Med Biol. 2017; 1019: p. 43-78.

[44]. Soto ME, Del Carmen Ávila-Casado M, Huesca-Gómez C, Alarcon GV, Castrejon V, Soto V, et al. Detection of IS6110 and HupB gene sequences of *Mycobacterium tuberculosis* and *bovis* in the aortic tissue of patients with Takayasu's arteritis. BMC Infect Dis. 2012; 12(194).

[45]. Vázquez-Marrufo G, Marín-Hernández D, Zavala-Páramo MG, Vázquez-Narvaez G, Alvarez-Aguilar C, Vázquez-Garcidueñas MS. Hnju7 Genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexican patients. Can J Microbiol. 2008; 54(8): p. 610-618.