



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium gordonae*

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado ante la
Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller
Katherine L. Rendon O., como requisito parcial para
optar al título de Licenciada en Biología.

Tutora: Dra. Sandra Fernández

Asesora académica: Dra. Roxana Gajardo

Febrero, 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por motivarme y apoyarme a lo largo de mi vida, por tener las palabras de aliento adecuadas para cada situación y por hacer siempre lo que estaba en sus manos para ayudarme, sin ustedes no habría podido cumplir muchos de mis objetivos, los amo con todo mi corazón.

A mis queridísimas amigas, Marlui, Aurora, Esklenibel e Ingrid por estar siempre ahí para mí en todo momento, las quiero muchísimo.

A mis hermanos de la vida Gabriel y Jhonathan, por siempre estar presentes y apoyarme en todo. A mi novio Jesús por ser paciente y acompañarme en todas mis alegrías y frustraciones al final de la carrera.

A mi super tutora, la Dra. Sandra Fernández, Muchísimas gracias por abrirme las puertas para trabajar como tesista en el Laboratorio de Diagnósticos Especiales del prestigioso Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Por guiarme en todo momento, aclarar mis dudas e instruirme de la mejor manera posible, además de tratar de solventar todos los inconvenientes que se pudieron presentar en el camino.

A los licenciados Jesús Vielma, Ana María Rebolledo y a los técnicos Richard y Johana por todo el apoyo brindado en el laboratorio y todas sus enseñanzas.

A la Profe Guillermina, por ser la mejor profesora del mundo, inspiradora de profesionalismo y amor por la biología y por la molécula perfecta. Y por ayudarme a contactar con la mejor tutora que pude tener y por guiarnos en el proceso de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos que estuvieron atentos y me apoyaron en el cumplimiento de esta meta.

Gracias a todos los profesores que tuve en este lindo camino, que nos brindan su conocimiento con todo el amor que se requiere.

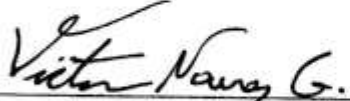
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DE LA Br. Katherine Rendón Ortegón**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. **Katherine Liliana Rendón Ortegón**, C.I: 25.369.615, titulado "Caracterización molecular de aislados clínicos de *Mycobacterium gordonae*", para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 27 días del mes de febrero del año 2019, dejando constar que la Profa. Roxana Gajardo actuó como coordinadora del jurado examinador.




Prof. Guillermina Alonso



Prof. Victoria Navas





Prof. Sandra Fernández
(Tutora)



Prof. Roxana Gajardo
(Asesora académica-coordinadora)



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 24/04/2019, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller **Rendón O., Katherine L.** titular de la cédula de identidad No. 25.369.615, titulado: "**Caracterización de aislados de Mycobacterium gornodae**"; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los dos días del mes de mayo del año dos mil diecinueve


Prof. Fernando González
Director (E)

FG/eg.-

CONSTANCIA

"Commemoración del 60º Aniversario de la Facultad de Ciencias"
Teléfono: 6051635, Fax: 6051636, Email: dirbio3@ciens.ucv.ve

INDICE

| | |
|---|-----|
| INDICE DE TABLAS | iii |
| INDICE DE FIGURAS..... | iv |
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2. ANTECEDENTES | 12 |
| 2.1. Antecedentes Internacionales | 12 |
| 2.2. Antecedentes Nacionales | 17 |
| 3. JUSTIFICACION | 19 |
| 4. OBJETIVOS..... | 20 |
| Objetivo General..... | 20 |
| Objetivos Específicos | 20 |
| 5. MATERIALES Y METODOS..... | 21 |
| 5.1. Materiales | 21 |
| Equipos..... | 21 |
| Medios de cultivo y reactivos | 21 |
| Material Biológico | 21 |
| 5.2. Métodos..... | 22 |
| 5.2.1. Selección de la muestra a analizar..... | 22 |
| 5.2.2. Cultivo de cepas de <i>M. gordonae</i> | 22 |
| 5.2.3. Tinción de Ziehl-Neelsen..... | 23 |
| 5.2.4. Identificación de la Micobacteria..... | 24 |
| 5.2.5. Digestión enzimática | 25 |
| 5.2.6. Tipificación bacteriana mediante Electroforesis en campo pulsado. | 25 |
| 6. RESULTADOS | 29 |
| 6.1. Cultivo e Identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes..... | 29 |
| 6.2. Identificación de la micobacteria..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 6.3. Tipificación bacteriana mediante electroforesis en campo pulsado | 35 |
| 6.3.1. Primer protocolo de PFGE..... | 35 |
| 6.3.2. Protocolos PulseNet y Sevilla..... | 36 |
| 6.3.3. Tipificación bacteriana mediante ERIC-PRC..... | 37 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 38 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 45 |
| 9. BIBLIOGRAFIA..... | 46 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de Runyon de las micobacterias aisladas frecuentemente en muestras clínicas. | 4 |
| Tabla 2. Cantidad de cepas aisladas de los pacientes de distintas instituciones por año. | 22 |
| Tabla 3. Condiciones de electroforesis en campo pulsado de las macrorestricciones del ADN de aislados de <i>M. gordonae</i> en el equipo CHEF-DR III System. | 27 |
| Tabla 4. Patrones de los distintos tipos de <i>Mycobacterium gordonae</i> | 30 |
| Tabla 5. Identificación de aislados clínicos del Centro Médico Docente La Trinidad por la técnica de PRA. | 32 |
| Tabla 6. Identificación de aislados clínicos del Hospital Clínicas Caracas por la técnica de PRA. | 33 |
| Tabla 7. Identificación de aislados clínicos del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” por la técnica de PRA. | 34 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura de pared celular de Micobacteria. | 5 |
| Figura 2. Colonias de <i>Mycobacterium gordonae</i> en medio Lowenstein-Jensen. | 6 |
| Figura 3. Algoritmo para la identificación de las micobacterias a nivel de especie propuesto por Telenti y col., 1993. | 9 |
| Figura 4. Registro fotográfico de la prueba de tinción de Ziehl-Neelsen realizada a las cepas repicadas en medio sólido, observadas en el microscopio óptico con objetivo de 100x. BAAR positivo. | 29 |
| Figura 5. Tinción Ziehl- Neelsen de cultivo contaminado. (Fucsia: micobacterias; Azul: contaminantes). | 30 |
| Figura 6. Registro fotográfico de patrones de restricción del gen hsp65 de <i>Mycobacterium gordonae</i> generados por las enzimas <i>HaeIII</i> y <i>BstEII</i> | 31 |
| Figura 7. Serie de fotografías de los distintos ensayos realizados para la estandarización de la técnica de electroforesis en campo pulsado. | 35 |
| Figura 8. A. Protocolo PulseNet de <i>Vibrio cholerae</i> modificado. B. Protocolo de lisis realizado por Sevilla y col.,2007. C. Protocolo de lisis realizado en PulseNet para <i>Clostridium botulinum</i> | 36 |
| Figura 9.A y B. Perfiles ERIC-PCR de cinco aislados de <i>Mycobacterium gordonae</i> con sus respectivos duplicados. | 37 |

RESUMEN

La micobacteriosis es una enfermedad infecciosa humana ocasionada por micobacterias distintas a las conocidas como típicas o tuberculosas. Es considerada un problema emergente que afecta alrededor del mundo, a una gran cantidad de humanos. Las micobacterias presentan mayor resistencia a los antimicrobianos convencionales, en parte debido a la composición de su pared celular. Entre ellas se encuentra *Mycobacterium gordonae*, a pesar de ser considerada una especie no patógena, se ha reportado causante de diversas infecciones en la piel, pulmonares y tejidos blandos. Este trabajo tiene como objetivo la caracterización genética de aislados de la especie *M. gordonae*, mediante técnicas de tipificación molecular tales como electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) y secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR) las cuales permiten el seguimiento o detección de brotes y eventualmente, generar así bases de datos donde el sector de salud en Venezuela pueda acceder a ellos y tomen las acciones pertinentes en cuanto a una infección por esta micobacteria. Se pudo identificar mediante PRA las variantes de *M. gordonae* presentes, encontrándose los tipos: 2, 3, 7, 9 y 10. A su vez, se puede inferir que *M. gordonae* es el patógeno causante de la infección ósea de un paciente, debido a que en diversas muestras óseas se identificó el mismo tipo 10. Aunque se intentaron diversos protocolos, en el presente trabajo no se logró estandarizar las técnicas para la caracterización de *M. gordonae*. Será necesario la utilización de otros métodos de lisis que permitan obtener un mejor aislamiento del ADN para PFGE. En el caso de la técnica de ERIC-PCR, es posible que debido al tiempo de almacenamiento de los cebadores no se pudo obtener la amplificación adecuada, puesto que se pueden encontrar degradados.

Palabras Clave: *Mycobacterium gordonae*, *Micobacterias no tuberculosas*, *tipificación*, *epidemiología*, *ERIC*, *PRA*, *PFGE*.

1. INTRODUCCIÓN

El orden de los *Actinomycetales* incluye la familia *Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Streptomycetaceae* y *Nocardiaceae*. La familia *Mycobacteriaceae* contiene un solo género, el género *Mycobacterium*. Dicho género está constituido por un grupo de bacilos largos de 3 a 5 μm de longitud, aeróbicos, no capsulados y no móviles. Se caracterizan por ser bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) a la tinción de Ziehl-Neelsen debido al alto contenido en lípidos que tienen en su pared celular. Las micobacterias son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, siempre que estén protegidas de la luz solar, y son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Son resistentes a la desecación y congelación, pero las inactiva la luz UV y el calor (>65 °C durante 30 minutos). Inicialmente se conocían dos especies: *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*. Hoy en día, se han descrito más de 120 especies de micobacterias dentro del género *Mycobacterium* (Alcaide y col. 2005; Cortes, 2009)

La micobacteriosis o enfermedades producidas por otras micobacterias diferentes de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, denominadas no tuberculosas, han ido tomando un mayor protagonismo. Existe una gran variabilidad geográfica en la prevalencia de las enfermedades causadas por estas micobacterias, así como de las especies responsables. Se ha observado fundamentalmente en pacientes inmunocompetentes, inmunodeprimidos, especialmente por el VIH y con fibrosis quística.

Entre las principales especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) involucradas en infecciones en el humano están las pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC por sus siglas en inglés). Este complejo es el más común de las especies MNT asociadas con enfermedad en el humano y son naturalmente resistentes a las drogas

antituberculosas. Otras especies como *M. kansasii* son causa común de infección pulmonar crónica semejante a la tuberculosis, aun cuando pueden afectar otros sistemas u órganos. Ocupan el segundo lugar, luego del MAC, entre las infecciones micobacterianas oportunistas asociadas con SIDA. También, en estos pacientes, el *M. marinum* puede producir lesiones cutáneas (Hernández y col, 2005).

Se ha observado un creciente desarrollo de nuevas técnicas de cultivo, diagnóstico y pruebas de sensibilidad para las micobacterias no tuberculosas (MNT) (Cortes, 2009; Hoefsloot, 2013). Según la velocidad de crecimiento, la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos, las micobacterias se dividieron en diversos grupos. Por lo que se establecieron dos grupos clásicos: micobacterias de crecimiento lento y rápido según requieran más o menos de 7 días, respectivamente, para producir colonias visibles en un subcultivo sólido con un inóculo diluido. Por otro lado, la posibilidad de no producir pigmento (no cromógenas) o hacerlo en ausencia (escotocromógenas) o presencia de la luz (fotocromógenas) (Cortes, 2009; Alcaide y col., 2005). De esta forma surgieron 4 grupos según la clasificación de micobacterias de Runyon en 1959: Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas) y Grupo III (no cromógenas) que eran de crecimiento lento y el Grupo IV que eran las de crecimiento rápido (Tabla 1) (Runyon, 1959; García, 2004).

Tabla 1. Clasificación de Runyon de las micobacterias aisladas frecuentemente en muestras clínicas. Fuente: García, 2004

| |
|--|
| <i>M. tuberculosis</i> complex |
| <i>M. tuberculosis</i> |
| <i>M. bovis</i> |
| <i>M. africanum</i> |
| <i>M. leprae</i> |
| Micobacterias de crecimiento lento (más de 7 días) |
| <i>M. kansasii</i> (fotocromógenos, grupo I de Runyon) |
| <i>M. marinum</i> |
| <i>M. goodii</i> (escotocromógenos, grupo II) |
| <i>M. scrofulaceum</i> |
| <i>M. avium</i> complex (no cromógenos, grupo III) |
| <i>M. avium</i> |
| <i>M. intracellulare</i> |
| <i>M. scrofulaceum</i> |
| <i>M. terrae</i> complex |
| <i>M. ulcerans</i> |
| <i>M. xenopi</i> |
| Micobacterias de crecimiento rápido (grupo IV de Runyon) |
| <i>M. fortuitum</i> |
| <i>M. chelonae</i> |
| <i>M. abscessus</i> |

La tabla de clasificación de Runyon (Tabla 1), es utilizada en la actualidad y es muy útil para la clasificación de las especies más importantes desde el punto de vista clínico. Las principales MNT que causan enfermedad pulmonar son: *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. avium* complex, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. celatum*, *M. asiaticum* y *M. szulgai* (Caminero, 2003). Las micobacterias no tuberculosas se caracterizan por un menor poder patógeno que varía de especie a especie, pudiendo ser oportunistas o simplemente saprofitas. Por otro lado, el reservorio parece ser en muchos casos ambiental, encontrándose en: agua (incluida agua del grifo), suelo, polvo, leche, alimentos, pájaros y otros animales, sin haberse documentado la transmisión interhumana (García y col., 2004).

El mecanismo de transmisión más aceptado es por aerosolización de microorganismos procedentes del agua o por su ingestión por vía digestiva a través de la cual se puede desarrollar infección diseminada. En pacientes con infecciones de partes blandas se ha descrito la inoculación directa de microorganismos a partir del agua y otros materiales. Se desconoce si

existe un periodo de latencia tras la infección, pero las formas clínicas más frecuentes son: pulmonar, linfadenitis, abscesos de piel y partes blandas y osteomielitis (Cortes, 2009).

Las MNT presentan mayor resistencia a los antibacterianos convencionales debido a la composición de su pared celular (figura 1). Dicha pared consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina o glicina. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Se trata de ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el cord factor (trehalosa 6,6í-dimicolato) y por mucósidos (Rodríguez, 2001; Cortes, 2009). A su vez se encuentra lipoarabinomanano (LAM), un complejo lípido-polisacárido que se extiende de la membrana plasmática a la superficie, los cuales le proporcionan a la Micobacteria un contenido inusualmente elevado de lípidos, confiriéndoles mayor invulnerabilidad, impenetrabilidad e hidrofobicidad (Kenneth y col., 2011).

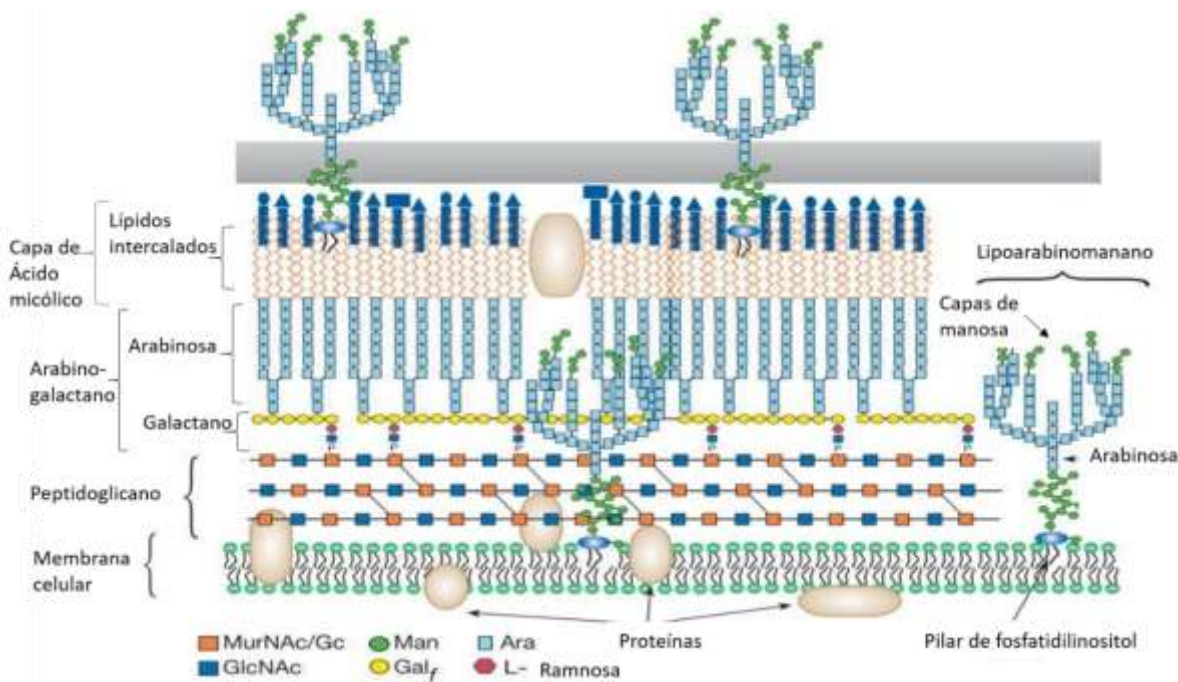


Figura 1. Estructura de pared celular de Micobacteria. Fuente: Esko y col, 2009

Mycobacterium gordonae

Mycobacterium gordonae fue denominado así en honor a la bacterióloga estadounidense Ruth E. Gordon (Bojalil y col., 1962). Anteriormente era conocido como “bacilo del agua del grifo” y como *Mycobacterium aquae*, aunque estudios posteriores determinaron que esta última cepa presentaba características que se correspondían mejor con las de *Mycobacterium smegmatis* (Runyon, 1974).

Frecuentemente *M. gordonae* se ha reportado que es un microorganismo ubicuo en el ambiente (tierra y agua corriente) y laboratorios. Es la MNT contaminante más frecuente y es considerada como no patógena. Se ha registrado sobre todo en muestras respiratorias, máquinas de hielo y broncoscopios. En circunstancias excepcionales se ha comportado como un patógeno oportunista, llegando a afectar a pacientes inmunodeprimidos (SIDA, trasplantados, con tratamientos esteroideos, neoplásicos) (Asija, 2011; Hernández y col. 2018; Palacios, 2018).

M. gordonae es una micobacteria de crecimiento lento, necesitando de 10-25 días de incubación a 37 °C. Las colonias son habitualmente redondas, lisas, convexas, brillantes y presentan una pigmentación amarillo-naranja (figura 2), que se produce tanto en la oscuridad como en la presencia de luz (Palacios, 2001).

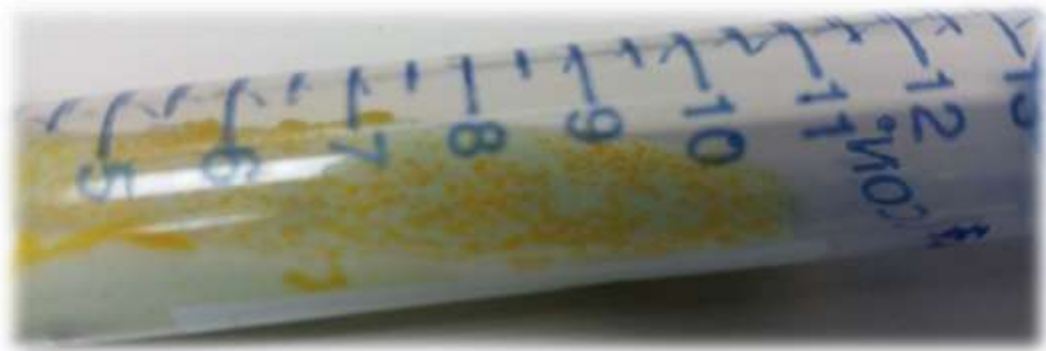


Figura 2. Colonias de *Mycobacterium gordonae* en medio Lowenstein-Jensen.

El enfoque terapéutico de las micobacterias es muy variable, depende de la especie que produce el cuadro clínico y de su sensibilidad antimicrobiana, existiendo aún muchas dudas sobre cómo, y durante cuánto tiempo tratar. La gran mayoría de ellas tienen como base el tratamiento utilizado para *MAC*, con algunas variaciones específicas; para *M. gordonae* se ha encontrado que es sensible a etambutol, rifabutina, claritromicina, linezolid y quinolonas (Hernández y col., 2018)

Identificación de Micobacterias no tuberculosas

Actualmente existen diversas técnicas de identificación para estos microorganismos, siendo la identificación genotípica la mejor alternativa para una precisa y rápida identificación de las especies micobacterianas. Las principales ventajas de las mismas consisten en una aplicación universal sobre todos los aislados, detección rápida, identificación de bacterias de difícil cultivo y una adecuada relación coste-beneficioso en los laboratorios. Entre estas técnicas esta la amplificación de secuencias específicas de ADN, la cual requiere la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una zona concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos o un posterior análisis post amplificación mediante, restricción, hibridación o secuenciación (Telenti y col., 1993; Kumar y col., 2018; PRAsite, 2018).

En las micobacterias existen regiones bien conservadas de ADN específicas del género, que flanquean regiones hipervariables específicas de especie. Las dianas mejor estudiadas en la actualidad son el gen *hsp65* que codifica la proteína micobacteriana de 65 kDa (*heat shock protein – proteína de choque térmico*) y regiones de la subunidad ribosómica 16S. El método del gen *hsp65* es posible ya que la proteína que codifica contiene epítopes que son únicos, así como epítopes que son comunes a varias especies de micobacterias. La naturaleza conservada de este gen permite la diferenciación de micobacterias de manera más rápida y sencilla

mediante digestión con enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*) de productos de PCR obtenidos mediante el uso de cebadores comunes a todas las micobacterias (Telenti y col., 1993; Da mata, 2016).

En conjunto las técnicas de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - fragmentos de restricción de longitud polimórfica) son conocidas como el método PRA (pattern restriction analysis). El patrón obtenido de restricción se compara con un algoritmo que contempla la distancia euclidiana; en el cual cuanto menor es la distancia entre dos organismos, mayor es el parecido entre ellos (Telenti y col., 1993; Alcaide, 2005; PRAsite, 2018). Telenti y colaboradores usaron una region del gen *hsp65* de 439 pb y evaluaron la restricción enzimática con 18 enzimas, de las cuales fueron seleccionadas (*BstEII* y *HaeIII*). De este modo proponen el primer algoritmo basado en los patrones de restricción con estas dos enzimas para la identificación de MNT, el cual permite diferenciar entre especies de crecimiento lento y de crecimiento rápido. Las principales ventajas de la técnica mostrada por dichos autores es que es sencilla, que no requiere un paso de hibridación y se puede realizar en un corto tiempo en comparación con las pruebas bioquímicas. Incluso proponen su posible uso directo en muestras (Telenti y col., 1993; Da mata, 2016).

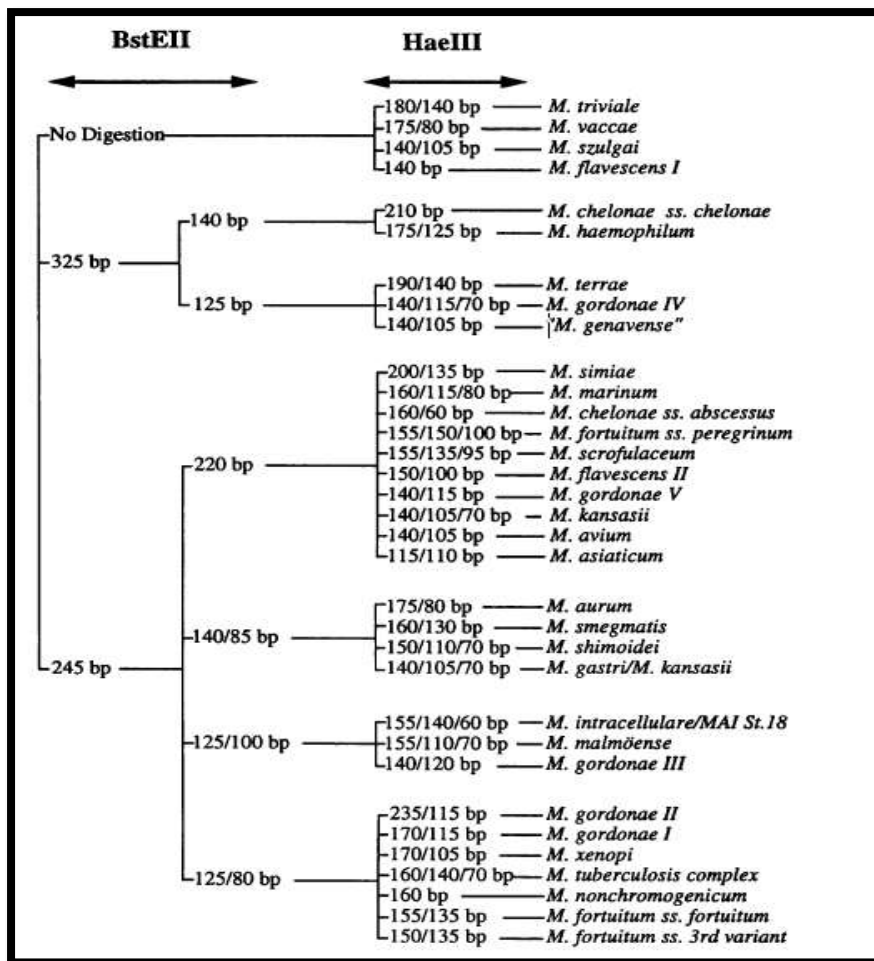


Figura 3. Algoritmo para la identificación de las micobacterias a nivel de especie propuesto por Telenti y col., 1993.

Epidemiología molecular de Micobacterias no tuberculosas

La epidemiología es la rama de la ciencia que se dedica al estudio del origen, la distribución y el control de las enfermedades que afectan a las poblaciones. La epidemiología molecular es una rama de la ciencia en la cual se implementan técnicas moleculares en los estudios epidemiológicos. Diversos métodos de genotipificación molecular pueden ser empleados para clasificar a los microorganismos en grupos estrechamente relacionados o divergentes. Entre los métodos de genotipificación más usados están: La electroforesis en campo pulsado (PFGE), técnicas de PCR, secuenciación del genoma e hibridación con sondas de ADN (Vílchez y col, 2009).

En los estudios epidemiológicos, la identificación y caracterización de los microorganismos es indispensable. La suma de los procedimientos previamente mencionados se denomina tipificación y permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de un brote infeccioso, contribuyendo a la determinación de la fuente de la infección y de los patrones de diseminación. Además, facilitan la evaluación de las medidas de control, mediante la determinación de la prevalencia, en tiempo y espacio, del agente infeccioso (Struelens, 1998; Vílchez y col., 2009).

PFGE (Electroforesis en campo pulsado)

Es la técnica más conocida para la tipificación bacteriana. Schwartz y Cantor idearon en 1984 una manera de separar las moléculas grandes de ADN (hasta 10Mb) que ha tenido una amplia gama de aplicaciones. Para dicha separación se realiza una electroforesis en la que los ángulos de los campos se encuentran cerca a la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad de campo, y son alternadamente cambiantes o pulsados. Otros nombres (OFAGE, FIGE, TAFE, CHEF, PACE, RGE, CFGE, ZIFE, ST/RIDE) se han dado a los sistemas de electroforesis en campo pulsado que implican variaciones en la geometría del electrodo original, homogeneidad y método de la reorientación de los campos eléctricos.

La PFGE es altamente discriminatoria ya que utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN genómico con una baja frecuencia y por tanto producen perfiles simples y mediante el análisis de patrones ya sea de manera visual o automatizada, se puede determinar las similitudes genéticas entre los aislamientos (Cardozo y col., 2013).

ERIC (Secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias)

Aunque la PFGE para la detección de la clonalidad es considerada el estándar de oro, los métodos basados en PCR son más baratos, fáciles de realizar y proveen resultados rápidos, en la actualidad existen otras técnicas moleculares que permiten analizar con precisión y reproducibilidad la relación clonal entre aislados bacterianos, siendo ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) una técnica de PCR que se usó para la tipificación molecular de bacterias gram-negativas.

Las secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas son elementos repetitivos distribuidos a lo largo del cromosoma bacteriano de las bacterias gram-negativas en las regiones intergénicas de los operones policistrónicos, utilizando información de secuencia genómica obtenida principalmente en las enterobacterias *Salmonella serovar typhimurium* y *Escherichia coli*. (Sampaio y col, 2006). La posición de los elementos ERIC en genomas enterobacterianos varía entre las diferentes especies y se ha utilizado como marcador genético para caracterizar aislamientos dentro de una especie bacteriana (Versalovic y col., 1991).

La hibridación de la secuencia consenso ERIC con el ADN micobacteriano se demostró por primera vez con *Mycobacterium aurum* (Versalovic y col., 1991) y Sechi y col., 1998 probaron ERIC-PCR como un método de toma de huellas dactilares para *Mycobacterium tuberculosis* e informaron que su nivel de diferenciación era mayor que el obtenido por la técnica de los perfiles genéticos IS6110. Es por esto que usaran los métodos moleculares ERIC-PCR y PFGE para investigar la heterogeneidad genética entre los aislamientos clínicos, puesto que son herramientas útiles para la tipificación y diferenciación de especies de micobacterias.

2. ANTECEDENTES

M. gordonae, es una micobacteria no tuberculosa que se detecta como contaminante muy frecuentemente y que muy rara vez es considerado un verdadero patógeno. Sin embargo, se han realizado reportes en la literatura sobre su capacidad infecciosa, que se han incrementado con el pasar del tiempo.

2.1. Antecedentes Internacionales

En el Hospital Chedoke- McMaster en Hamilton, en el año 1983, se realizó un examen histológico a una paciente de 58 años de edad debido a un nódulo doloroso en la base del dedo medio de la mano derecha revelando inflamación crónica con granuloma. Se sugirió infección por micobacterias. La paciente fue tratada con cefalosporina, administrada por vía intravenosa, baños de sulfato de magnesio y fisioterapia. Sin embargo, el dolor e hinchazón persistieron con formación de absceso en la superficie volar o ventral de la articulación interfalángica del pulgar derecho, se eliminaron los restos necróticos y se envió pus para el cultivo de rutina de bacterias, micobacterias y hongos.

La microscopía reveló bacilos ácido-resistentes por lo que se aisló MNT del material sometido a cultivo, siendo estas identificadas como *M. gordonae*. El tratamiento se cambió a rifampicina, 600 mg/día, y etambutol, 900 mg/día, lo que dio como resultado una reducción casi completa de la hinchazón y la cicatrización de las incisiones quirúrgicas. La tasa de sedimentación de eritrocitos volvió a la normalidad. Por lo que a pesar de que esta micobacteria no se considera

patógena para humanos, en este caso se ilustra que puede volverse patógeno en circunstancias inusuales (Berman, 1983).

En el año 1985, en Seattle, Turner y col. describieron el caso de un paciente que presentó glomerulonefritis hipocomplementémica como una manifestación de la infección diseminada de *M. gordonae* que fue documentada por cultivo del organismo a partir de pulmón, riñón, orina y líquido cefalorraquídeo. La infección parece haberse diseminado desde la derivación ventriculoauricular del líquido cefalorraquídeo del paciente. Después de la eliminación de la derivación y el tratamiento con agentes antituberculosos, los niveles del complemento y la función renal volvieron a la normalidad. Esto representa el primer caso reportado de nefritis en derivación debido a infección micobacteriana (Turner y col., 1985).

Arnow y colaboradores, en Illinois, en el año 2000, investigaron la contaminación de muestras clínicas por *M. gordonae*. Identificaron 84 casos en un hospital durante 20 meses. La tasa global de contaminación fue de 2,4% y 72 de las muestras fueron respiratorias. Una comparación de casos y controles mostró que el riesgo de contaminación de las muestras respiratorias aumentó significativamente si la muestra fue expectorada (odds ratio [OR], 3,62, intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,36-9,50) o si el paciente consumió líquidos dentro de los 2 días previos a la obtención de la muestra (OR, 8,92, IC 95%, 1,40-71,20). (Arnow y col., 2000).

Los cultivos de agua del grifo, hielo y agua helada todos produjeron *M. gordonae* a 10² -10⁶ ufc/ml. Una encuesta de cultivo de pacientes que dieron su consentimiento mostró contaminación en 8 (24%) de las 34 muestras de esputo recogidas inmediatamente después de un enjuague bucal con agua del grifo. Estos hallazgos demuestran que la contaminación endémica de especímenes surge de las micobacterias en el agua del grifo del hospital y proporciona una base para los esfuerzos de control (Arnow y col., 2000).

En 1977, se sospechó de un brote de *M. gordonae* cuando encontraron en cinco pacientes del Hospital de Saint-Antoine, la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en esputo y aspirado gástrico. La investigación epidemiológica reveló una fuerte contaminación del agua recolectada de las fuentes refrigeradas ubicadas en el mismo piso de los pacientes. Al comparar los patrones de PFGE de los aislados de los pacientes y la fuente de agua, usando enzimas *DraI* y *XbaI*, se sugirió que los frotis positivos estaban relacionados con el agua potable de la fuente refrigerada puesto que los patrones eran los mismos (Lalande y col., 2001).

En el 2005, Suresh y col., en Texas, presentaron un caso de *M. gordonae* cutáneo en un paciente inmunocompetente de 54 años que desarrolló lesiones tipo papular elevadas que eran levemente urticarias sobre la extremidad superior izquierda, Se probaron varias cremas tópicas con esteroides y antibióticos orales, pero las lesiones no mejoraron. Eventualmente, una biopsia realizada de una de las lesiones se informó como un proceso granulomatoso inespecífico con tinciones negativas para hongos y bacterias ácidas (Suresh y col., 2005).

Se observó en el cultivo crecimiento de *M. gordonae*. La paciente fue tratada con una combinación de etambutol, rifabutina y claritromicina, a la que la micobacteria era sensible. Las lesiones comenzaron a desvanecerse y aplanarse y finalmente dejaron cicatrices. Ella fue tratada por un periodo total de 3 meses. El tratamiento de estos pacientes parece estar basado en sensibilidades del organismo y han variado desde la cirugía a los medicamentos antituberculosos estándar a una variedad de antibióticos. *M. gordonae* debe considerarse en el diagnóstico diferencial de los pacientes con lesiones cutáneas inusuales, independientemente de su estado inmune (Suresh y col., 2005).

Los socios globales del Grupo de Ensayos Europeos de la Red NTM-NET por sus siglas en inglés (Network European Trials Group) proporcionaron resultados de identificación del número total de pacientes en el año 2008 en los que aislaron MNT a partir de muestras

pulmonares. A partir de dichos datos se visualizó la distribución relativa de las diferentes MNT encontradas por continente y por país y se generó una instantánea que ilustra la distribución de las especies. Las bacterias del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) predominaron en la mayoría de los países, seguidas de *M. gordonae* y *M. xenopi* (Hoefsloot y col., 2013).

En el 2010, Mazunder y colaboradores, en Tennessee, describieron el caso de un paciente joven e inmunocompetente que desarrolló una infección pulmonar sintomática de *M. gordonae*. Una tomografía del tórax reveló linfadenopatía hilar y densidades nodulares en el lado izquierdo. El diagnóstico definitivo fue realizado por un cultivo de una biopsia transbronquial. El tratamiento consistió en un ciclo corto de rifampicina y etambutol, que resultó en una mejoría clínica. Por lo que se concluye que *M. gordonae* es capaz de causar una enfermedad clínicamente significativa tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunodeprimidos y su aislamiento no debe ser completamente rechazado sin más evaluación (Mazunder y col., 2010).

En 2013, Saifi y col., en Irán, realizaron evaluación de resistencia de antibióticos y análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de PRA del gen *hsp65* para la identificación de MNT de diferentes muestras clínicas. Los aislados más frecuentes fueron *M. kansasii*, *M. gordonae* III, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. gastri*. En la mayoría de los casos, los resultados de la PRA se ajustaban perfectamente al método bioquímico clásico. A su vez consiguieron que en Irán tienen una población muy diversa de aislados de MNT entre los pacientes sospechosos de tener tuberculosis (Saifi, y col., 2013).

Youssef y col., en Tennessee, en el año 2014, informaron un caso raro de adenopatía hilar caseosa y enfermedad pulmonar causada por *M. gordonae*, en un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y artritis reumatoide (AR), con esteroides de

mantenimiento y metotrexato. El examen anatomopatológico y los cultivos de biopsia de escisión de ganglios linfáticos y lavado broncoalveolar confirmaron el diagnóstico. La terapia antimicobacteriana con azitromicina, etambutol y rifabutina administrada otorgó una mejora clínica y radiológica significativa y el seguimiento del cultivo confirmaron la cura microbiológica. *M. gordonae* puede ser una causa rara de infección pulmonar significativa, y los cultivos positivos de esputo o BAL para *M. gordonae* no deben descartarse automáticamente y considerarse contaminantes no patógenos u organismos colonizadores, especialmente en hospedadores inmunocomprometidos con comorbilidades (Youssef y col., 2014).

Freyne y Curtis, reportan en el año 2017 en Australia a un niño inmunocompetente con una úlcera en la piel que aparece espontáneamente en la cara causada por la infección por *M. gordonae*. El niño fue tratado inicialmente con claritromicina, rifampicina y etambutol, pero el paciente mostro bultos palpables después de una biopsia por escisión. Por lo que se le reemplazo por azitromicina durante 6 meses, seguido a esto la cicatriz estaba bien curada, sin evidencia de infección residual (Freyne, B., y Curtis, N., 2017).

Chen y col., en el año 2017 reportan una paciente inmunocompetente con un historial de 2 años de úlceras faciales asintomáticas y hemorragias nasales intermitentes. Antes de ir al hospital de los autores la paciente recibió un diagnóstico de lupus eritematoso y también fue referida a una cirugía endoscópica nasal. Las lesiones cutáneas eran eritematosas, cubiertas de costras amarillas y en ambos lados de la cara del paciente. Después de varios estudios, sospecharon que se trataba de una infección por micobacterias, realizaron una prueba T-SPOT.TB. y mostro resultados positivos. El análisis de secuencia ARNr 16S revelo similitud de 99% con *M. gordonae*. Después del diagnóstico la paciente fue tratada empíricamente con claritromicina

(500mg/d) y moxifloxacin (400mg/d). A los 4 meses de seguimientos, no se notificaron nuevas hemorragias nasales ni lesiones cutáneas (Chen y col., 2017).

2.2. Antecedentes Nacionales

Las infecciones causadas por MNT constituyen un grave problema de salud, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Estas micobacterias presentan patrones de susceptibilidad a antibióticos particulares y distintos a *M. tuberculosis*, por lo que la administración del tratamiento adecuado requiere de un método rápido, sencillo y sensible de identificación.

En el 2005, Hernández y colaboradores, en Caracas, realizaron aislamiento e identificación de micobacterias, usando métodos bacteriológicos y moleculares a partir de 256 muestras clínicas obtenidas de 188 pacientes con impresión diagnóstica de tuberculosis, referidos de distintos centros hospitalarios de la ciudad de Caracas. La correlación entre la identificación bacteriológica y molecular fue del 93%. La presencia de un alto porcentaje de MNT aisladas de pacientes clínicamente enfermos, señalan la importancia de incluirlas al diagnóstico clínico diferencial. El aislado N° 16 identificado bioquímicamente como *M. chelonae*, por PCR se identificó como *M. gordonae* tipo IV. Para aclarar esta discrepancia requieren la realización de la amplificación de otras secuencias blanco. El laboratorio de micobacterias debe esforzarse en proporcionar resultados confiables en el menor tiempo posible, para lo cual debe combinarse necesariamente la identificación bioquímica con métodos moleculares. En su caso requieren utilizar estas metodologías en un mayor número de muestras para establecer el porcentaje de correlación entre estas pruebas moleculares y las bioquímicas convencionales. (Hernández y col., 2005).

Godoy y col., en el año 2008, en Caracas, compararon la técnica PRA con métodos bioquímicos estándar de identificación micobacteriana. La técnica de PRA permitió identificar 96% de las cepas analizadas, en comparación con 92% de cepas identificadas por las técnicas bioquímicas. Los resultados obtenidos fueron idénticos en 18 de 22 cepas, correspondiendo al 82% de los resultados. Se concluye que el PRA es un método rápido, sencillo y económico que produce resultados concordantes con las técnicas tradicionales, con un menor grado de error. Basados en estos resultados se recomienda el uso del PRA en los laboratorios clínicos como método de identificación de rutina para micobacterias (Godoy, 2008).

Da Mata y col., estudian un brote de infección en tejidos blandos, debido a MNT posterior a mesoterapia, un procedimiento cosmético que consiste en inyectar una mezcla de sustancias para reducir hipotéticamente el tejido adiposo localizado. Entrevistaron pacientes con lesiones en piel y con antecedentes de mesoterapia en la ciudad de Barinas, Venezuela. Todos recibieron tratamiento en el mismo centro estético, a cargo del mismo terapeuta y con el mismo producto. De las muestras de 5 pacientes se aisló *Mycobacterium abscessus*. Ninguna de las soluciones utilizadas en la mesoterapia estuvo disponible para el análisis, pero se aisló *M. abscessus* de una muestra del ambiente tomada en el centro cosmético. La tipificación de las cepas con técnicas basadas en PCR (ERIC-PCR, BOXA1R y RAPD) mostro que los aislados de los pacientes fueron indistinguibles entre sí, pero diferentes del aislado del medio ambiente del centro. Por lo que sugieren que el brote se haya causado por un producto contaminado utilizado en la mesoterapia y no por una bacteria del ambiente y lo mencionan como el más grande descrito en la literatura médica posterior a mesoterapia (Da mata y col, 2010).

3. JUSTIFICACION

Las micobacterias no tuberculosas constituyen un problema de salud a nivel mundial y se necesitan esfuerzos concretos para lograr un diagnostico oportuno. Estas micobacterias juegan un papel importante como causa de infecciones en el humano, produciendo en algunas de ellas sintomatología similar a la producida por el complejo *M. tuberculosis*. La incidencia de las enfermedades causadas por estas micobacterias aún no está bien estudiada en la mayor parte del mundo, pero en general no se observa el mismo patrón de prevalencia en los diferentes países.

Estos organismos pueden producir enfermedades localizadas en los pulmones, los ganglios linfáticos, la piel, las heridas o los huesos. Ocasionalmente pueden producir enfermedades diseminadas. De las más de 90 especies conocidas de MNT, aproximadamente un tercio se han asociado con enfermedades en humanos.

En Venezuela se han reportado brotes posteriores a procedimientos invasivos, entre ellos procedimientos estéticos y acupuntura provocados por micobacterias de crecimiento rápido, pero no han sido reportados estudios en relación a las micobacterias de crecimiento lento y aún menos en relación a *Mycobacterium gordonae*.

En el laboratorio de Diagnósticos especiales del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” se han conservado cepas de micobacterias de crecimiento lento que posiblemente estén relacionadas por epidemiología clásica en brotes. Las cepas se han identificado por la técnica de análisis de patrones de restricción PRA. Sin embargo, estas cepas no están suficientemente caracterizadas mediante genotipificación, por lo que se planteó realizar técnicas de tipificación, entre ellas PFGE y ERIC-PCR para conseguir patrones que pueden ser útiles para el seguimiento o detección de brotes, crear una base de datos a nivel intra e interlaboratorio y así proveer los datos a las entidades responsables para que tomen acciones pertinentes para la prevención de nuevos caos.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar los aislados de *Mycobacterium gordonae* que se encuentran almacenados en el grupo de Diagnósticos Especiales del Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”.

Objetivos Específicos

- Confirmar la identificación de los aislados mediante la técnica de análisis de patrones de restricción del gen *hsp65* (PRA-*hsp65*)
- Realizar la tipificación genética mediante la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Materiales

Equipos

Balanza digital (Mettler), agitador magnético, baño de maría termorregulado (Lindberg-Blue), estufa, centrífuga, refrigerador, microscopio óptico, campana flujo laminar (Nuair), vortex, colorímetro del sistema vitek (bioMerieux), termociclador, cámara de electroforesis, Equipo Gel Doc XR (BioRad), CHEF-DR III System (BioRad).

Medios de cultivo y reactivos

Medio Lowenstein-Jensen, Medio Stonebrink, Caldo Mueller-Hinton con 0,1 % Tween 80, buffer TE 1X (10 mM de tris-HCL y 1 mM de EDTA pH 8,0), Buffer TBE 0,5X, Agarosa sigma, Agarosa (Nusieve), Agua MiliQ (ultra-pura estéril), Agarosa SeaKem Gold, Alcohol 70%, PMSF, SDS, Azul de metileno, Fucsina.

Material Biológico

La población está constituida por 96 cepas, aisladas de pacientes provenientes de los siguientes centros clínicos: Centro Médico Docente la Trinidad (CMDLT), Hospital Clínicas Caracas (HCC), Clínica Santa Sofía (CSF), Hospital José Manuel de los Ríos (HJMDLR), Biomedicina, Clínica Ávila (CA), Laboratorio Santiago de León (LSDL), Laboratorio Clínico microbiológico Douglas Gutiérrez (LCMDG) e Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR) durante el periodo (2000-2017), las cuales fueron purificadas e identificadas previamente mediante pruebas moleculares en el grupo de Diagnósticos Especiales del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR). A su vez, se incluyó cepas control proveniente

del American Type Culture Collection (*M. abscessus*- ATCC 19977), *Salmonella* serovar Braenderup (H9812).

Tabla 2. Cantidad de cepas aisladas de los pacientes de las distintas instituciones por año.

| INSTITUCIÓN | AÑO | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 2001 | 2003 | 2004 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
| CMDLT | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 4 | 4 | 10 | 16 | 0 | 0 | 0 |
| HCC | 0 | 0 | 0 | 6 | 1 | 9 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| CSF | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 |
| HJMDLR | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Biomedicina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LSDL | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LCMDG | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| INHRR | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 1 | 2 | 8 | 1 |

5.2. Métodos

5.2.1. Selección de la muestra a analizar.

Del total de los aislados almacenados fueron seleccionados los obtenidos en las tres instituciones con el mayor número, CMDLT (43), INHRR (23) y HCC (18). Se ubicaron todos aquellos aislados congelados a (-70 °C) que fueron encontrados en la base de datos del grupo de Diagnósticos Especiales del INHRR como *M. gordonae*.

5.2.2. Cultivo de cepas de *M. gordonae*.

Las cepas congeladas se cultivaron en los medios Stonebrink o Lowestein-Jensen y fueron incubadas a 30 °C por un periodo mayor a 7 días, para examinar tasa de crecimiento, pigmentación y morfología macroscópica y microscópica de las colonias. A partir de colonias aisladas se realizó tinción Ziehl-Neelsen para buscar bacilos ácido alcohol resistente (BAAR).

5.2.3. Tinción de Ziehl-Neelsen

Se extrajo con aplicador la muestra del medio, se colocó y se extendió en un portaobjeto con una gota de agua, se le realizó movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en la lámina y se colocó bajo luz ultravioleta (UV) hasta que se secó la gota. Se ubicó una gradilla en una superficie plana, donde se colocaron las láminas fijadas con alcohol conservando el orden numérico con el extendido hacia arriba y manteniendo una separación de al menos 1 cm entre ellas. Se flameó portaobjeto para asegurar que estaba seco el extendido.

- *Coloración*

Se procedió a cubrir totalmente la superficie de la lámina con fucsina básica 3%. Se dispensó el colorante con suavidad sin salpicar y sin tocar con el gotero los extendidos. Con un hisopo embebido en alcohol, se encendió llama de fuego para calentar suavemente por debajo a los extendidos uno por uno, con movimiento de vaivén, hasta observarse que se desprenden los primeros vapores blanquecinos. Se realizó el calentamiento tres veces hasta emisión de vapores cada minuto. Se enjuagó con abundante agua y baja presión los portaobjetos eliminando totalmente la solución de Fucsina, se inclinó el portaobjetos para eliminar el exceso de agua y así evitar diluir los siguientes reactivos.

- *Decoloración*

Se cubrió en totalidad la superficie de la lámina con solución decolorante (Etanol 95% y Ácido Clorhídrico 35%) y se dejó actuar por 1 minuto. Una vez pasado el tiempo se enjuagó con abundante agua a baja presión y posteriormente se eliminó el exceso de agua.

- *Coloración de fondo*

Se cubrió toda la superficie de la lámina donde está el extendido con solución de azul de metileno 0,3%. Se dejó actuar por 3 minutos y se enjuagó las láminas en ambas caras con agua a baja presión y se limpió la parte inferior con un papel absorbente. Se dejó secar las láminas a temperatura ambiente, apoyándolas sobre un papel absorbente para poder observarse finalmente en el microscopio óptico con un lente 100x de inmersión.

5.2.4. Identificación de la Micobacteria.

Para la identificación de las cepas recuperadas se utilizó el análisis del polimorfismo del gen *hsp65* propuesto por Telenti y colaboradores en 1993, con algunas modificaciones. Se realizó la extracción del ADN de las cepas mediante ebullición, para ello se añadieron de 4-5 colonias de la muestra correspondiente en 200 µL de buffer TE 1X (Tris 10 mM; EDTA 1mM, pH 8). Se sometió la suspensión a ebullición (100 °C) por 10 min. Se centrifugó a 3.500 rpm por 3 minutos. Seguido a esto, el sobrenadante fue usado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la amplificación del gen mediante PCR se utilizó 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTPs; 0,5 µM de cada cebador: Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) y Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT), los cuales amplifican un fragmento de 441 pb; 1 U de ADN polimerasa (BioLabs); 1X de solución buffer, y se agregó 5µL del lisado a cada tubo de reacción, para un volumen final de 50 µL. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización previa 94 °C por 5 min, 45 ciclos: 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, por último, un paso final de extensión de 10 min a 72 °C. En cada ensayo se incluyó la cepa (*M. abscessus* - ATCC 19977) como control positivo y como control negativo (TE 1X sin ADN).

La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen Ultrapure) al 1% en buffer de corrida de TBE 0,5X (Tris 0,9 M, Ácido Bórico 0,9 M, EDTA 0,20 M), a 6 voltios/cm por 15 minutos junto a un marcador de peso molecular de 50 pb para verificar el tamaño del producto obtenido. Seguido a esto se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizó en el equipo Gel Doc XR (BioRad).

5.2.5. Digestión enzimática

Al confirmar la amplificación del segmento de 441 pb del gen *hsp65*, se realizó la digestión enzimática de 10 µl del producto con 5U de *BstEII* (Promega); 0,5X BSA (BioLabs); 0,5X de solución buffer para un volumen total de 20 µl a 60 °C, de igual manera se sometió 10 µl más del producto con 5U de *HaeIII* (Promega); 0,5X BSA (BioLabs); 0,5X de solución buffer a 37 °C durante 2 horas. Para su posterior análisis, se realizó la electroforesis en gel de agarosa NuSieve® GTG® (Lonza) al 4% en buffer de corrida de TBE 0,5X a 6 voltios/cm por 2 horas y media, junto a un marcador de 50 pb (Promega). Se realizó la tinción en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizó en el equipo Gel Doc XR (BioRad). La determinación del tamaño de los segmentos de restricción se realizó mediante el programa Quantity One, y dichos patrones fueron comparados con la base de datos de PRASite (app.chuv.ch/prasite/index.html).

5.2.6. Tipificación bacteriana mediante Electroforesis en campo pulsado.

La tipificación de los aislados se realizó con la macrorestricción de la enzima de corte infrecuente *XbaI*. Se realizó un cultivo en medio Lowenstein-Jensen o Stonebrink de cada uno de los aislados, una vez que se observó crecimiento bacteriano se realizó un subcultivo en caldo Mueller-Hinton con 0,1% Tween 80 a 37 °C en agitación constante por (3 días). Seguido a esto

se prepararon suspensiones celulares con 20% de transmitancia. Se trasvasó 400 µl de cada suspensión a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 3.500 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 400 µl de buffer TE 1X.

Para la preparación de los bloques, se mezcló la suspensión celular con 400 µl de agarosa SeaKem Gold al 1%. Seguidamente para la lisis celular, se incubaron los bloques en buffer TE 1X con lisozima 0,1 mg/ml con agitación a 37 °C, durante toda la noche. Se descartó el buffer y se lavaron los bloques una vez con agua MiliQ por 15 min. Luego se incubaron por dos horas a 54 °C con agitación en un buffer de EDTA 0,5 M; pH 8,0 + 0,1 mg/ml de Proteinasa K. Posterior a este tiempo de incubación, se añadió SDS con una concentración final de 1% y se dejó incubar por dos horas más. Finalmente, se realizaron dos lavados con agua MiliQ, y por último ocho lavados con TE 1X.

A el protocolo previamente mencionado se le realizaron también modificaciones en distintos pasos del proceso de lisis, en los cuales como primer paso se le realizó un cambio en la temperatura de la lisozima de 37 °C a 56 °C, como segunda variante se cambió los tiempos a los que fue sometido el proceso de lisis con las distintas enzimas (Lisozima y Proteinasa K), además también se varió el tiempo de digestión de la enzima de restricción *XbaI* de manera que se dejó *overnight*.

También se siguieron los protocolos de lisis celular propuestos por Iker Sevilla y col. en el año 2007 en su trabajo de “Homogeneidad del perfil en electroforesis de campo pulsado de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* aislada del ganado bovino y heterogeneidad de los ovinos y caprinos”, y el procedimiento de operación estándar de PFGE con pequeñas modificaciones de *Clostridium botulinum* seguido por PulseNet, 2012.

Para el proceso de macrorestricción del ADN en el interior de los bloques de agarosa, se cortaron láminas de 1 mm aproximadamente, se incubaron en una solución de reacción de

acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Promega) conteniendo 30 U de la enzima de restricción *XbaI*. Se incubó a 37 °C por 4 horas. A su vez, se realizó la digestión del ADN de *Salmonella* serovar Braenderup H9812 embebida en agarosa con la enzima de restricción *XbaI*, para usarla como control de la corrida electroforética mediante el protocolo establecido por PulseNet. Cada bloque con el ADN digerido fue colocado en el peine del molde para preparar el gel de agarosa. (PulseNet, 2017). La electroforesis de campo pulsado fue llevada a cabo en TBE 0,5X en el CHEF DR III System (BioRad), bajo las siguientes condiciones:

Tabla 3. Condiciones de electroforesis en campo pulsado de las macrorestricciones del ADN de aislados de *M. gordonae* en el equipo CHEF-DR III System.

| Tipo de Agarosa (%) | Temperatura (°C) | Inicio de mA | Bloque 1 (pulsos/tiempo) | Bloque 2 (pulsos/tiempo) |
|----------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| SeaKem Gold (1%) | 14 | 115-135 | 1,5 a10 seg/ 13,9 horas | 20 a 40 seg/ 4,6 horas |
| SeaKem Gold (1%) | 14 | 136-145 | 1,5 a10 seg/ 13,5 horas | 20 a 40 seg/ 4,5 horas |

Finalizada la electroforesis, se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5µg/mL) para posteriormente visualizarse a través del equipo Gel Doc XR (BioRad).

5.2.7. Tipificación genética mediante la técnica de ERIC-PCR

Se realizó un cultivo en medio Lowestein-Jensen o Stonebrink de cada uno de los aislados, una vez que se observó crecimiento bacteriano se realizó un subcultivo en caldo Mueller-Hinton con 0,1% Tween 80 a 37 °C en agitación constante por (3 días). Seguido a esto se prepararon suspensiones celulares con TE1X a 20% de transmitancia. Se trasvasó 400 µl de cada suspensión a un tubo de microcentrífuga. Se realizó la extracción del ADN de las cepas

mediante ebullición, para ello se sometió la suspensión a ebullición (100 °C) por 10 min y se centrifugó a 3.500 rpm por 5 minutos. Una vez terminado este proceso, se almacenaban a -20 °C hasta el momento de realizar la amplificación.

Se usó el método de amplificación usando los cebadores ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC) y ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) como los descritos por Sechi y col, 1998, con pequeñas modificaciones. En resumen, la mezcla de reacción se realizó con cantidades finales de 1,5 mM de MgCl₂; 1 U de Taq polimerasa; 200 μM de dNTPs; 1X de solución Buffer; 0,5 pmol de cebadores, y se agregó 5 μL del lisado a cada tubo de reacción, para un volumen final de 50 μL. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización previa 94 °C por 2 min, 35 ciclos: 94 °C por 45 seg, 52 °C por 1 min y 70 °C por 10 min, por último, un paso final de extensión de 20 min a 70 °C.

La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen Ultrapure) al 2% en buffer de corrida de TBE 0,5X (Tris 0,9 M, Ácido Bórico 0,9 M, EDTA 0,20 M), a 6 voltios/cm por 70 minutos junto a un marcador de peso molecular de 50 pb para verificar el tamaño del producto obtenido. Seguido a esto se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 μg/mL) y se visualizó en el equipo Gel Doc XR (BioRad).

6. RESULTADOS

6.1. Cultivo e Identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes

Con el objetivo de corroborar la identificación de las cepas de estudio aisladas y garantizar que los cultivos micobacterianos se encontraran puros, se realizó la prueba baciloscópica correspondiente una vez que se observó crecimiento en el medio sólido.

De un total de 84 aislados, se seleccionaron 56 aislados que eran viables y no contaminados mediante la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen, puesto que resultaron BAAR positivos, dichos resultados se observan en la figura 4. El resto de los aislados fueron desestimados por no presentar cultivos puros, al visualizar la presencia tanto de micobacterias como de otro tipo de bacterias, consideradas como contaminantes del cultivo, como se muestra en la figura 5.

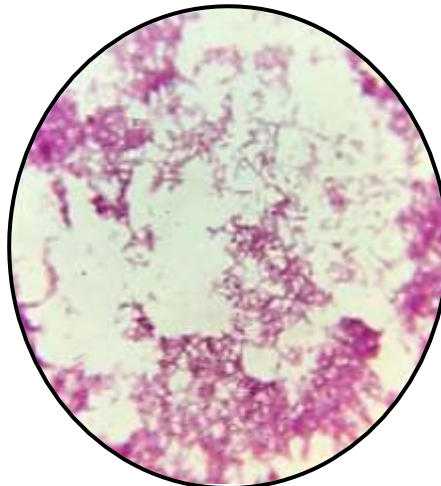


Figura 4. Registro fotográfico de la prueba de tinción de Ziehl-Neelsen realizada a las cepas repicadas en medio sólido, observadas en el microscopio óptico con objetivo de 100x. BAAR positivo.

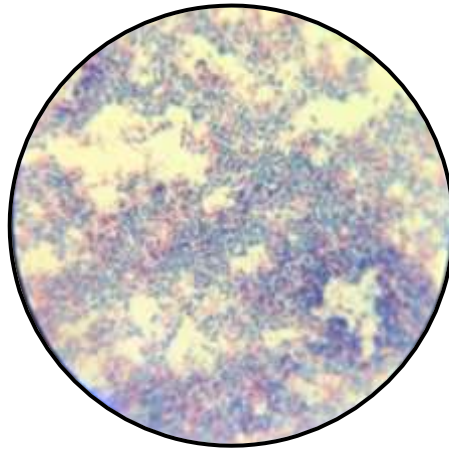


Figura 5. Tinción Ziehl- Neelsen de cultivo contaminado. (Fucsia: micobacterias; Azul: contaminantes).

6.2. Identificación de la micobacteria

Se realizó la identificación a nivel de especie y tipo de *M. gordonae* mediante la técnica de análisis de patrones de restricción del gen *hsp65* (PRA), de los cuales se pueden observar que los aislamientos de *M. gordonae* generaron patrones múltiples, donde en la página de PRA site provee una identificación según que tan pequeña sea la distancia entre dos organismos.

Para *Mycobacterium gordonae* se pueden obtener distintos patrones después de la digestión con *BstEII* y *HaeIII* generando 10 tipos dentro de la especie, como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 4. Patrones de los distintos tipos de *Mycobacterium gordonae*.

| Tipo de <i>Mycobacterium gordonae</i> | Patrón con <i>BstEII</i> | Patrón con <i>HaeIII</i> |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 235/120/85 | 160/115/60 |
| 2 | 235/120/85 | 215/110/0 |
| 3 | 235/120/100 | 130/115/0 |
| 4 | 320/115/0 | 130/115/60 |
| 5 | 235/210/0 | 130/115/0 |
| 6 | 235/130/85 | 140/120/95 |

| | | |
|-----------|-------------|------------|
| 7 | 235/120/100 | 155/110/0 |
| 8 | 320/115/0 | 130/110/70 |
| 9 | 235/120/100 | 160/115/60 |
| 10 | 235/120/100 | 130/110/95 |

Fuente: <http://app.chuv.ch/prasite/>

En base a estos patrones, según el tamaño en pares de bases (pb) de cada fragmento obtenido de la digestión por las enzimas antes mencionadas, se logró obtener la identificación de los aislados usados para el presente trabajo.

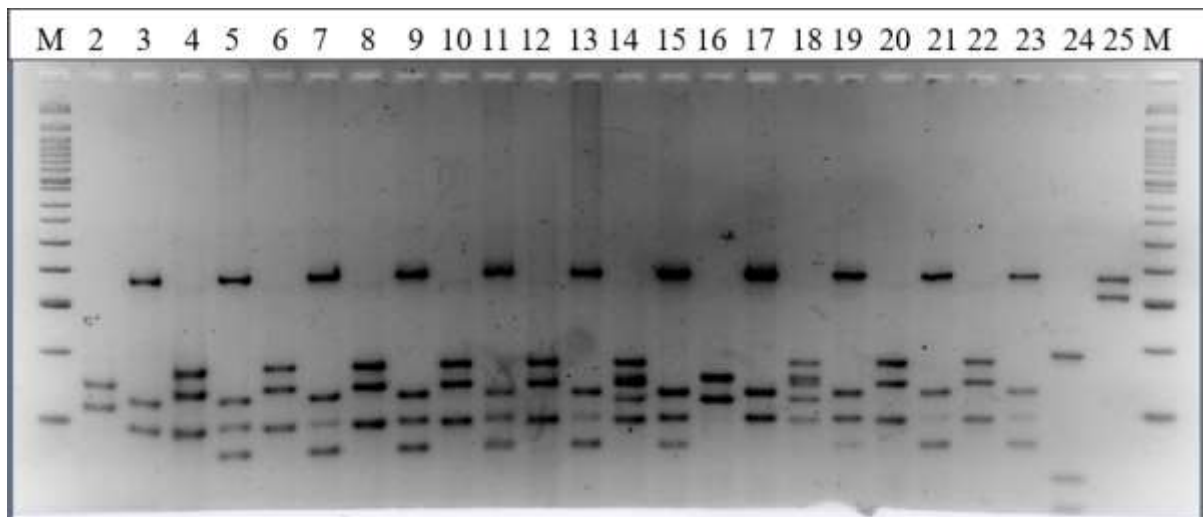


Figura 6. Registro fotográfico de patrones de restricción del gen *hsp65* de *Mycobacterium gordonae* generados por las enzimas *HaeIII* y *BstEII*. (M) marcador de peso molecular de 50pb (BioLabs). (Números pares) Digestión por *HaeIII* (Números impares) digestión por *BstEII*. (carril 2 y 3) 559917, (carril 4 y 5) 570501, (carril 6 y 7) 570502, (carril 8 y 9) 570503, (carril 10 y 11) 570506, (carril 12 y 13) 570494, (carril 14 y 15) 570505, (carril 16 y 17) 574730, (carril 18 y 19) 594721, (Carril 20 y 21) 586039, (carril 22 y 23) 586047, (carril 24 y 25) ATCC 19977 - *M. abscessus*.

En la figura 6 se muestra un ejemplo de las digestiones generadas por las enzimas *HaeIII* y *BstEII* de los productos del PRA *hsp65* de los cultivos que se encontraron puros una vez realizada la tinción Ziehl-Neelsen. Luego de analizar los patrones de restricción generados, se

procedió a introducir el tamaño de cada uno de los fragmentos generados por la digestión con las enzimas mencionadas anteriormente, en la base de datos de la página web PRAsite, la cual arrojó los datos que se encuentran en las siguientes tablas (desde la tabla 5 hasta la 7).

Tabla 5. Identificación de aislados clínicos del Centro Médico Docente La Trinidad por la técnica de PRA.

| Fuente | ID | Fecha de colección de aislado | Identificación por PRA |
|------------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Cepa de esputo | 504424 | 2009 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 504427 | 2009 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 559917 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 574730 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 594695 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Secreción traqueal | 594718 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Cepa lavado bronquial | 594721 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 630053 | 2011 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 642466 | 2011 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Cepa de esputo | 672420 | 2011 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 677648 | 2012 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 677657 | 2012 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 727003 | 2012 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Lavado bronquial | 690770 | 2012 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 757218 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 763132 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 777927 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 782675 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Lavado bronquial | 763135 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Lavado bronquial | 790141 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Secreción bronquial | 782659 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 819748 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 841028 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 847201 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 847220 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |

| | | | |
|----------------------------|--------|------|----------------------|
| Cepa de esputo | 863338 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 866204 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Cepa de esputo | 881443 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Lavado bronquial | 847204 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Lavado bronquial | 847210 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Lavado bronquial | 847217 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Lavado bronquial | 854114 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Lavado bronquial | 881499 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Secreción bronquial | 881489 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Secreción bronquial | 881496 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 3 |

Obteniéndose un total de 35 aislados en el CMDLT identificados (Tabla 4), de los cuales hubo un (85,71) % perteneciente a el tipo 3 y un (14,29) % del tipo 7 de la especie de *M. gordonae*.

Tabla 6. Identificación de aislados clínicos del Hospital Clínicas Caracas por la técnica de PRA.

| Fuente | ID | Fecha de colección de aislado | Identificación por PRA |
|--------------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Cepa de esputo | 392069 | 2008 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Cepa de esputo | 392056 | 2008 | <i>M. gordonae</i> 2 |
| Cepa de esputo | 392052 | 2008 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Cepa de esputo | 411321 | 2008 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Cepa de hueso | 570494 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de hueso | 570505 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de hueso | 570506 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de canal medular | 570501 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de canal medular | 570502 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de tejido de Fémur | 570503 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de canal medular | 586039 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de canal medular | 586047 | 2010 | <i>M. gordonae</i> 10 |
| Cepa de esputo | 743584 | 2013 | <i>M. gordonae</i> 2 |

En la tabla 6 se presentan 13 aislados que se pudieron identificar del centro Hospital Clínicas Caracas, obteniéndose un 61,54% perteneciente a *Mycobacterium gordonae* tipo 10, un 23,08% tipo 7 y finalmente 15,38% del tipo 2.

Tabla 7. Identificación de aislados clínicos del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” por la técnica de PRA.

| Fuente | ID | Fecha de colección de aislado | Identificación por PRA |
|---------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Espuito | 72267 | 2003 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Espuito | 472456 | 2009 | <i>M. gordonae</i> 9 |
| Espuito | 704673 | 2012 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Espuito | 712515 | 2012 | <i>M. gordonae</i> 2 |
| Espuito | 820604 | 2014 | <i>M. gordonae</i> 7 |
| Contenido gástrico | 982848 | 2016 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Espuito | 983527 | 2016 | <i>M. gordonae</i> 3 |
| Espuito | 1023488 | 2017 | <i>M. gordonae</i> 3 |

En la tabla 7 se presentan 8 aislados que se pudieron identificar del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, obteniéndose un 62,50 % perteneciente a *Mycobacterium gordonae* tipo 3, un 12,50 % correspondiente al tipo 9, igualmente para el tipo 7 se obtuvo 12,50 % y finalmente 12,50 % al tipo 2.

6.3. Tipificación bacteriana mediante electroforesis en campo pulsado

6.3.1. Primer protocolo de PFGE

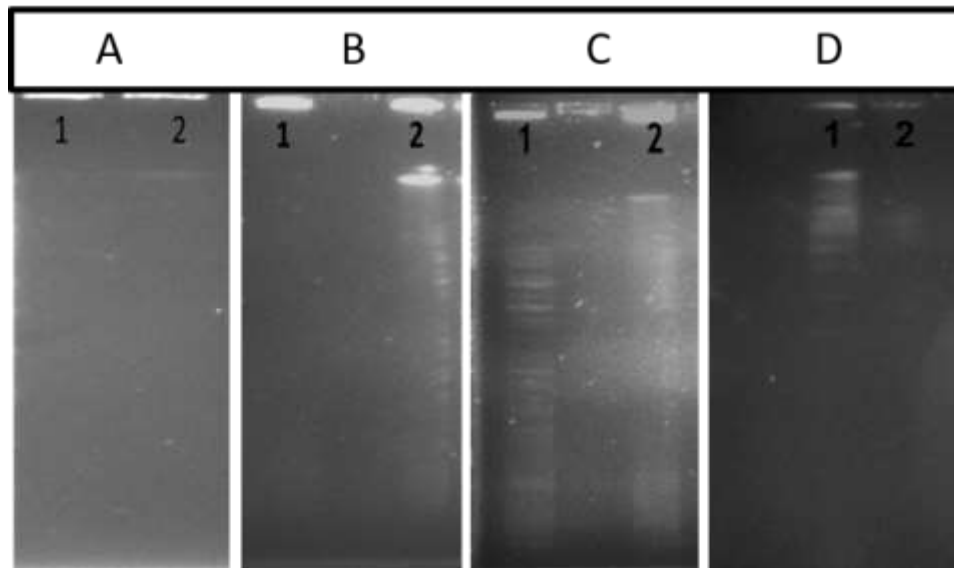


Figura 7. Serie de fotografías de los distintos ensayos realizados para la estandarización de la técnica de electroforesis en campo pulsado. A. Ensayo con enzima de restricción *DraI*; B. Ensayo con enzima de restricción *XbaI*; C. Ensayo con cambio de temperatura a lisozima (1. 37 °C; 2. 56 °C). D. 1. Lisozima (48h) y *Proteinasa K* (6 días); 2. Lisozima (5 días) y *Proteinasa K* (2h) y se dejó digestión con Enzima de restricción *XbaI* por 24 horas.

Al realizar la PFGE con la enzima de restricción *DraI*, no se observó bandas (figura 7.a), por lo que se decidió usar otra enzima de corte infrecuente utilizada en micobacterias, la cual es conocida como *XbaI* (figura 7.b). Al observar unas bandas tenues en dicho gel, se decidió seguir trabajando con esta enzima de restricción, sin embargo, se realizaron otros cambios debido a que se notó que el ADN quedó empaquetado en el bolsillo del carril y no había suficiente ADN disponible para que la enzima pudiera digerir el producto.

En el siguiente caso se modificó la temperatura de la lisozima de 37 °C a 56 °C, de manera de ir paulatinamente cambiando las condiciones y poder estandarizar la técnica de PFGE. En esta prueba se pudo observar que a 37 °C se pudo obtener mejores bandas, pero aún muy tenues (figura 7.c.). Por lo que se prosiguió a cambiar los tiempos a los que se dejaba actuar la lisozima

y la proteinasa K y finalmente se dejó la digestión por 24horas, sugiriendo así la figura 7.d. que aún no se obtiene suficiente ADN libre para generar un patrón adecuado para tipificación.

6.3.2. Protocolos PulseNet y Sevilla

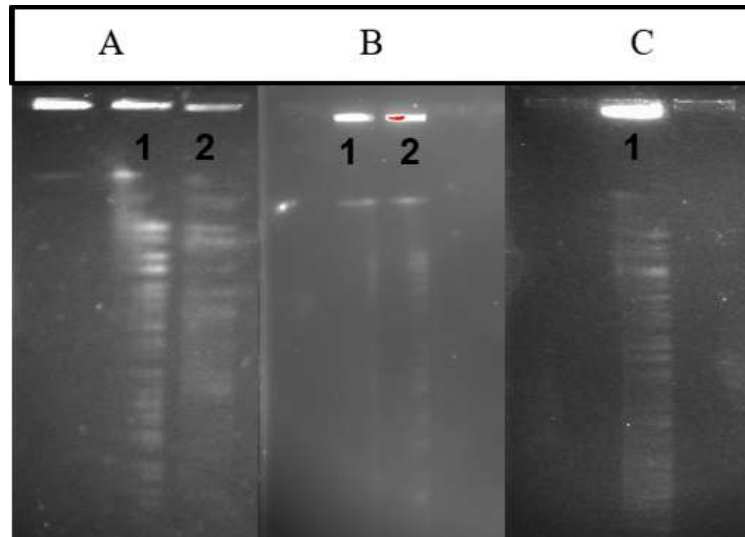


Figura 8. A. Protocolo PulseNet de *Vibrio cholerae* modificado. B. Protocolo de lisis realizado por Sevilla y col.,2007. C. Protocolo de lisis realizado en PulseNet para *Clostridium botulinum*.

Entonces debido a que todos los intentos anteriores no fueron satisfactorios, se optó por realizar otros protocolos de PFGE de la bibliografía que generaban patrones bastante aceptables para otras micobacterias, en los cuales varían en el uso de otras soluciones buffer que permiten un mejor proceso de lisis. En el caso de la figura 8.a. se logró obtener un patrón mucho más visible al agregarle proteinasa K en la suspensión celular antes de formar los bloques de agarosa para luego proceder con el mismo método de lisis. Sin embargo, las bandas a pesar que se notaban mucho más que con los protocolos anteriores, aún no se obtuvo el resultado esperado.

El siguiente protocolo (realizado por Sevilla y col, 2007) consistió en agregar un buffer de esferoplasto para permitir que la célula obtenga una mayor lisis, pero pese a esto las bandas salían distorsionadas y tenues (figura 8.B). Finalmente se realizó el protocolo de PulseNet para *Clostridium botulinum* (figura 8.C) el cual es mucho más extenso y complejo, donde se utilizó

una serie de buffers que permitieron tener un mejor patrón de bandas en el gel de agarosa, sin embargo, aun presenta parches entre las bandas que no permiten un buen análisis del gel.

6.3.3. Tipificación bacteriana mediante ERIC-PCR

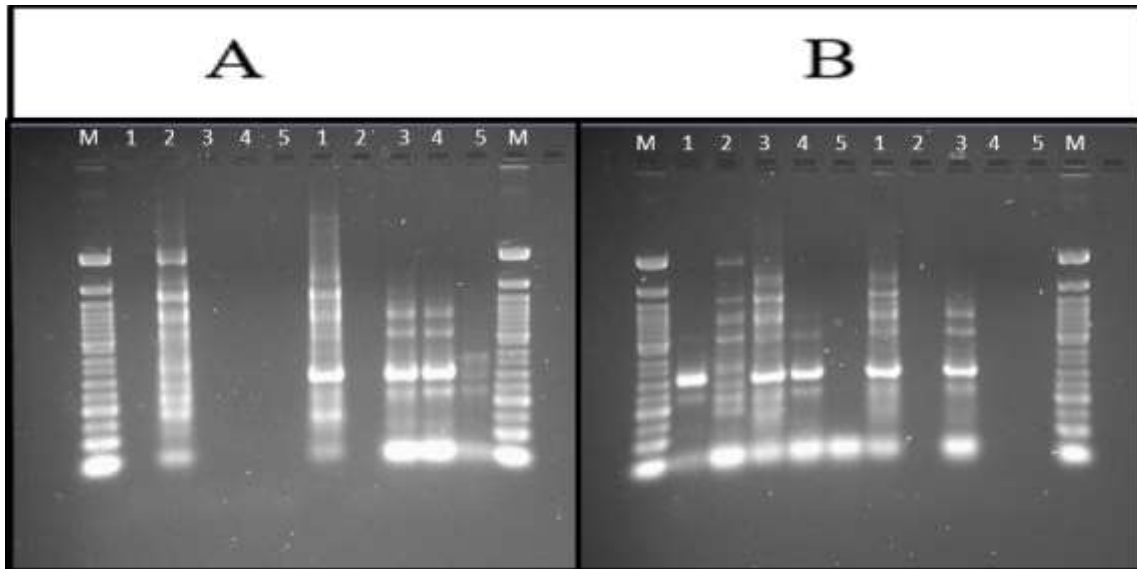


Figura 9.A y B. Perfiles ERIC-PCR de cinco aislados de *Mycobacterium gordonae* con sus respectivos duplicados.

Por último, se procedió a realizar la tipificación mediante una técnica basada en PCR. En la cual se sometió bajo las mismas condiciones de crecimiento bacteriano cinco cepas que se encontraban identificadas mediante PRA. Además, se realizó por duplicado las corridas electroforéticas de cada cepa para poder corroborar que el método era reproducible y eficiente. Sin embargo, dicho registro fotográfico del gel mostró que los patrones no eran iguales y conforme con esto; se realizó una repetición del protocolo, generando bandas totalmente distintas a las obtenidas en el primer gel (figura 9 A. y B.).

7. DISCUSIÓN

M. avium complex y *M. ulcerans* son los patógenos más comúnmente aislados. *M. goodii* se asocia comúnmente con la contaminación ambiental de muestras clínicas. Es la micobacteria más frecuentemente aislada del líquido gástrico, la orina y los frotis de membranas mucosas, además es una causa reconocida de enfermedad pulmonar y diseminada en pacientes inmunocomprometidos. Las infecciones de la piel y tejidos blandos, representan hasta el 30% de la enfermedad micobacteriana no tuberculosa en los niños (Freyne, B., Curtis, N., 2017).

La baciloscopia es el método más sencillo, rápido y económico para el diagnóstico de tuberculosis o micobacteriosis, empleando la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen la cual permite la visualización tanto de micobacterias, como también de bacterias de los géneros *Rhodococcus* y *Nocardia*. La tinción Ziehl-Neelsen es una herramienta poderosa utilizada para la confirmación de la existencia de micobacterias en una muestra o cultivo, así como también para conocer el estado de pureza de los mismos. Esta técnica fue utilizada para asegurar que los cultivos de las muestras incluidas en este estudio se encontraran puros antes de iniciar su identificación mediante la implementación del método de PRA-*hsp65* y caracterización por los métodos PFGE y ERIC-PCR, debido a que contaminantes como otros microorganismos no micobacterianos y hongos tienen la capacidad de interferir con la PCR. (Valdés, F., y Cid, A., 2004).

El paso siguiente fue realizar la metodología de PRA-*hsp65*. Esta técnica permite la determinación del tamaño de bandas presentes en los patrones de restricción, con la ayuda de un software que permite la digitalización de la imagen del gel y poder llevar a cabo el análisis, minimizando así los errores calculados para los tamaños de cada una de las bandas

y finalmente poder lograr la identificación. En este caso se empleó el software Quantity One, el cual permitió obtener los valores más exactos. Al introducir en la página web de PRAsite los tamaños de las bandas obtenidas en el gel, se pudo confirmar la identificación de los aislados recuperados, obteniendo una variedad de tipos de *M. gordonae* proveniente de cada centro hospitalario, entre ellos están los tipos 2, 3, 7, 9 y 10. Siendo *M. gordonae* tipo 7, el más frecuente en todos los centros. Walton y Valesco, 1991; Plikaytis y col, 1992; Kirschner y Bottger, 1992, demostraron que *M. gordonae* presenta una heterogeneidad genética en relación con otras especies micobacterianas y dicha heterogeneidad puede detectarse utilizando el ensayo de PRA-*hsp65*.

También se pudo observar que el *M. gordonae* tipo 10 solo fue identificado en aislados obtenidos de diversas muestras del mismo paciente con lesiones óseas. Esto podría confirmar que *M. gordonae* es el patógeno causante de esta infección. Las micobacterias no tuberculosas pueden estar presentes en múltiples órganos, incluso en los huesos. La osteomielitis por MNT rara vez se informó antes de la década de 1980, pero su prevalencia parece haber aumentado recientemente, reflejada por informes de casos e investigaciones clínicas a gran escala (Sheng Bi y col., 2015). Muchas especies de MNT de crecimiento lento han demostrado la capacidad de causar osteomielitis, incluyendo *M. gordonae*, la cual fue reportado un caso de mastoiditis micobacteriana en una niña de nueve años en la que el organismo patógeno era dicha micobacteria (Molloy, J., y col., 2008).

La toma de huellas dactilares de ADN es una herramienta importante que complemente los datos obtenidos con las investigaciones epidemiológicas. La electroforesis en gel de campo pulsado ha sido considerada la técnica más adecuada para la tipificación de cepas de la mayoría de las especies bacterianas, principalmente debido a su alta reproducibilidad y

adecuado poder discriminatorio. Sin embargo, el uso de esta técnica es limitada por el bajo rendimiento y el hecho de que algunas cepas sufren degradación durante la electroforesis. Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa, por otro lado, tienen un alto rendimiento y no requieren equipo dedicado; sin embargo, el análisis de los resultados puede complicarse no solo por el gran número de bandas generadas, sino también por la presencia de bandas que se tiñen con intensidad variable (Sampaio, 2006).

En este estudio, se utilizó inicialmente como método de tipificación; la electroforesis de gel en campo pulsado puesto que esta técnica es considerada como la Estándar de Oro para dicho propósito, siendo esta una técnica bastante laboriosa y que requiere de largos periodos de tiempo para obtener los patrones, pero pese a este hecho, al realizar la metodología inicialmente planteada, la cual estaba estandarizada en el Laboratorio de Diagnósticos Especiales para micobacterias de crecimiento rápido, no se pudo obtener suficiente ADN disponible para lograr una buena huella digital de los aislados en el estudio. A dicho protocolo se le realizaron cambios controlados en cuanto a variaciones de temperatura de la lisozima, puesto que según CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ellos obtuvieron una mejor lisis por la misma cuando la incubaban a una temperatura de 56 °C.

A su vez se varió los tiempos de incubación de la lisozima y proteinasa K puesto que era evidente que aún no se había liberado suficiente ADN para que se pudiera obtener patrones de bandas después de la digestión, ya que en los bolsillos del gel se encontraba el ADN genómico sin digerir. Sin embargo, en perfiles mostrados por PulseNet ellos no muestran mayor variabilidad al aumentar el tiempo de incubación con la lisozima, lo cual concuerda con lo obtenido con este trabajo. Al momento de escoger la enzima de digestión, se eligió *XbaI* para los experimentos con PFGE porque produjo perfiles más distinguibles con en

comparación con *DraI*. Es posible que el hecho de que *Mycobacterium gordonae* sea una micobacteria de crecimiento lento le confiere mayor resistencia en su pared celular ante agentes que provoquen la lisis celular.

Hasta la fecha, el número total de tipos de *M. gordonae* se ha ampliado a 10 variantes (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). Por esta razón Wojtasik y col., en el año 2011, presentaron un posible ensayo genético rápido y reproducible que utiliza la PCR basada en la secuencia de repetición de trinucleótidos (TRS-PCR) para el genotipado de *M. gordonae*. El método propuesto constituye un único cebador útil para genotipar esta especie. Entre los 10 cebadores que contiene TRS, después de aplicar la PCR basada en (CAC) a 36 cepas de *M. gordonae*, encontraron un índice discriminatorio de 0.975. La precisión de este análisis fue apoyada por una reproducibilidad del 92%. Estos resultados se compararon con el esquema de tipificación de ERIC-PCR que tuvo un índice discriminatorio más bajo de 0.93 y su reproducibilidad fue de solo 86.3 %.

Dokht y col., en el 2015 realizaron un estudio con el objetivo de identificar molecularmente aislados clínicos de *M. fortuitum* debido a que esta especie de micobacteria no tuberculosa en Irán es la más común. Realizaron análisis con RAPD y ERIC, y obtuvieron que los aislamientos de *M. fortuitum* se podían dividir en 3 y 6 grupos, respectivamente. En el análisis de RAPD, los fragmentos principales fueron de 300 pb, seguido del fragmento 1000. En el análisis ERIC, los fragmentos principales fueron de 280 pb seguido del fragmento de 1200 pb. En conclusión, aunque los resultados de este estudio representaron un mayor poder discriminatorio de ERIC, sin embargo, la combinación de RAPD y el análisis de ERIC pudieron discriminar suficientemente la diversidad genotípica, el control de la infección y obtener información epidemiológica útil sobre los aislamientos de *M.*

fortuitum. Sampaio y col en el 2006 obtuvieron con ERIC-PCR un índice de discriminación de 0.975 y con PFGE obtuvieron 0.993 para *M. chelonae* y 0.989 (ERIC-PCR) y 0.972 (PFGE) para *M. abscessus*. Por lo que ellos concluyen que la PCR puede considerarse una mejor alternativa, mas no definitiva de PFGE para la tipificación de estos aislamientos.

La selección correcta de una técnica de tipificación según Struelens en 1998, se basa en los siguientes criterios: reproducibilidad, estabilidad, tipeabilidad y poder discriminatorio. La reproducibilidad es la capacidad del procedimiento de arrojar el mismo resultado repetidas veces, inclusive en laboratorios distintos. En cuanto a la estabilidad, el marcador biológico detectado por el método deberá poder ser determinado a lo largo del tiempo y no depender de las variaciones en el genoma del microorganismo. La tipeabilidad, se define como la capacidad de obtener un resultado positivo para cada aislamiento, lo esperado es poder tipificar 100 % de los aislados seleccionados para el estudio. Por último, el poder discriminatorio de una técnica de tipificación está relacionado con la habilidad de asignar dos aislados no relacionados como tipos diferentes.

A esta lista de criterios deben añadirse la facilidad en la aplicación del método, la rapidez en la obtención de los resultados, la sencillez en su interpretación y la versatilidad del procedimiento para su aplicación a diversos organismos. En la práctica, para la evaluación de un método de tipificación epidemiológico deben considerarse todos los criterios descritos de forma integral. Rara vez un método cumple satisfactoriamente con todos los criterios utilizados para su evaluación, por lo cual, es frecuente y recomendable el uso combinado de diversas técnicas. Usualmente, en primera instancia, se utiliza un método de tipificación que arroje resultados rápidamente, seguido de procedimientos que ofrezcan

información más precisa, pero cuya implementación requiera de mayor tiempo (Struelens, 1998).

En efecto en este trabajo no se logró obtener la reproducibilidad requerida al realizar la técnica de ERIC-PCR, puesto que como se observa en la figura 9, al realizar el mismo experimento varias veces, no se obtuvieron los mismos resultados, y es posible a que se haya debido a que fue necesario elevar la concentración de magnesio en la PCR para obtener la amplificación de los productos, inicialmente se realizó la solución madre del ERIC-PCR con una concentración de cloruro de magnesio de 1,5 mM donde no se obtuvo el amplicon (resultados no mostrados), sin embargo al aumentar la concentración del magnesio a 3 mM, se obtuvieron bandas, pero al realizar nuevamente el experimento por duplicado, no se obtuvo el mismo patrón de bandas. El $MgCl_2$ es un cofactor necesario para la actividad enzimática de las DNA polimerasas. La concentración óptima de $MgCl_2$ debe determinarse empíricamente para cada polimerasa, secuencia y par de cebadores. Demasiado poco puede reducir la eficiencia de amplificación, pero al contrario si es mucho, puede reducir la eficiencia de amplificación o generar productos inespecíficos (Pérez, G. 2019).

Este comportamiento pudo deberse a que los iniciadores utilizados tenían varios años conservados, lo podría haber inducido a la degradación de los mismos. Esta descrito que los oligonucleótidos dependen de la temperatura y del medio de almacenamiento para permanecer estables. De dichas variables, la temperatura es la más importante, puesto que cuando son almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ permanecen estables durante dos años independientemente de si se almacenan secos o resuspendidos en TE o agua MiliQ. Pero a medida que se aumenta la temperatura se ve claramente la diferencia en la estabilidad entre

los medios de almacenamiento, siendo los oligos almacenados en agua MiliQ los menos estables, seguido de los secos y los almacenados en tampón TE finalmente siendo los más estables. A su vez lo principal para la estabilidad es evitar la congelación y descongelación puesto que las fuerzas físicas involucradas pueden degradar los oligonucleótidos (IDT, 2019).

Finalmente, se puede inferir que es posible que se requiera otro método de aislamiento del ADN o tener cebadores nuevos para obtener un mejor resultado con ERIC-PCR, puesto que Wojtasik y col., en el año 2011, obtuvieron patrones de bandas para *Mycobacterium gordonae* con la técnica de ERIC-PCR. Sin embargo, a pesar de este hecho, ellos tampoco obtuvieron suficiente reproducibilidad y poder de discriminación con esta técnica para este bacilo ácido alcohol resistente cuando lo compararon con el otro método de TRS-PCR.

8. CONCLUSIONES

- La técnica de PRA es un método bastante sencillo y eficiente, capaz de identificar todas las variantes encontradas de *Mycobacterium gordonae*.
- *M. gordonae* requiere otro método de lisis para poder obtener el ADN disponible y generar patrones mediante la metodología de electroforesis en gel en campo pulsado.
- Se requiere una metodología de toma de huellas dactilares más eficiente en los procedimientos de laboratorio de rutina para la tipificación de *M. gordonae*.
- Es importante contar con cebadores con poco tiempo de síntesis o en su defecto bien almacenados, puesto que de esto depende en gran mayoría tener resultados confiables con las técnicas de PCR.
- Cuando varias muestras de aislados de un mismo paciente son identificados por PRA con el mismo microorganismo, se puede confirmar que él mismo es el patógeno causante de la infección.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Aguado, J., Gómez, J., Manrique, A., Soriano, F. 1987. Pulmonary Infection by *M. gordonae* in an Immunocompromised patient. *Diagn microbiol infect dis.* 262-263.
2. Alcaide, F., Moreno, J., Martín, J., Palacios, J. 2005. *Micobacterias*. Obtenido de seimc: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf> [consulta: 12 de abril de 2018]
3. Arnow, P., Bakir, M., Thompson, K., Bova, J. 2000. Endemic contamination of clinical specimens by *M. gordonae*. *Clinical Infectious Diseases*, 471-476.
4. Asija, A. 2011. *Disseminated Mycobacterium gordonae Infection in an Immunocompetent host*. New York: American Journal of therapeutics.
5. Berman, L. 1983. Infection of synovial tissue by *M. gordonae*. *CMAJ*, 1078-1079.
6. Bojalil, L., Cerbón, J., Trujillo, A. 1962. Adansonian classification of mycobacteria. *J. gen. Microbiology*, 28:333-346.
7. Caminero, J. 2003. *Guía de la tuberculosis para médicos especialistas*. Paris: UICTER. https://www.theunion.org/what-we-do/publications/technical/spanish/pub_guia_medicos_especialistas_spa.pdf [consulta: 29 de marzo de 2018]
8. Cardozo, A., Ramón, L., Poutou, R., Carrascal, A., Zambrano, D. 2013. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *universitas scientiarum*, 203-222.

9. Cortes, E. 2009. *Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de Mycobacterium tuberculosis y micobacterias atípicas en el laboratorio clínico*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis319.pdf>. [consulta: 15 de abril de 2018]
10. Da mata, O. 2010. Seguimiento de un brote de infección en tejido blando causado por *M. abscessus* posterior a la mesoterapia en Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **28(9):596-601**.
11. Da mata, O. 2016. Caracterización genética de micobacterias de crecimiento rápido causantes de infecciones en tejidos blandos. Universidad Simón Bolívar.
12. Dokht, Azar y col. 2015. Molecular identification of clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum* by random amplified polimorphic DNA (RAPD) Polymerase chain reaction and ERIC-PCR. *Journal of clinical and diagnostic research*. Vol -9(12).
13. Esko, J., Doering, T., Raetz, C. 2009. Essentials of Glycobiology. 2nd Edition. Chapter 20. Eubacteria and Archae. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1945/>. [consulta: 10 de mayo de 2018].
14. Freyne, B., Curtis, N. 2017. *Mycobacterium gordonae* skin infection in an immunocompetent child. Australia. Wolter Kluwer Health Inc. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. Vol. 36 (5)
15. García, J., Palacios, J., Sánchez, A. 2004. Infecciones respiratorias por micobacterias ambientales. *Archivos de Bronconeumología*, **14**.
<http://www.archbronconeumol.org/es/infecciones-respiratorias-por-micobacterias-ambientales/articulo/13073171/> [consulta: 10 de abril de 2018]

16. Godoy, M. J., Orozco, L., Hernández, C., & Omaira, D. 2008. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 96-104. [consulta: 25 de marzo de 2018]
17. Hernández Borje, J., Gutiérrez Lara, J., Marín Torrado, J. *Enfermedad por micobacterias ambientales. Micosis Pulmonares. Aspergilosis.* Obtenido de <https://www.neumosur.net/files/EB04-47%20micobacterias.pdf> [consulta: 04 de abril de 2018]
18. Hernández, C., Adjoujian, M. F., Zamora, F. 2005. Aislamiento e identificación de micobacterias mediante métodos bacteriológicos y de biología molecular. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 64-71. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000200005 [consulta: 25 de marzo de 2018]
19. Hoefsloot, W., Van Ingen, J., Claire, A. 2013. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples. *European Respiratory Society*, 1604-1613. <http://erj.ersjournals.com/content/42/6/1604.long> [consulta: 10 de abril de 2018]
20. IDT (Integrated DNA Technologies). Storing oligos: seven things you should know. Obtenido de IDT: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/storing-oligos-7-things-you-should-know>. [consulta en línea 09 de febrero de 2019]
21. Kenneth, R. Ray, C.G. 2011. *Sherris. Microbiología médica*. México: Mc Graw Hill. https://onlyfastcom.files.wordpress.com/2017/02/sherris_microbiologia_medica_5edi_ryan.pdf [consulta: 15 de marzo de 2018]
22. Kirschner, P. y Bottger, E. 1992. Letter to the editor: Microheterogeneity within rRNA of *Mycobacterium gordonae*. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 30, 4: 1049-1050.

23. Konrads, C., Ruckl, K., Tabbakh, M., Rudert, M., Kircher, S. 2016. Therapy-resistant septic olecranon bursitis due to *Mycobacterium gordonae*. *SICOT J*, 2, 41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5125158/pdf/sicotj-2-41.pdf> [consulta: 13 de abril de 2018]
24. Kumar, A., Sarín, R, Arora, V. 2018. Amplification of *hsp 65* gene and usage of restriction endonuclease for identification of non-tuberculous rapid grower mycobacterium. *Indian Journal of tuberculosis*, 57-62.
25. Lalande, V., Barbut, F. 2001. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with water from refrigerated fountains. *Journal of hospital infection*, 76-79.
26. Maths, A. A *biomerieux company*. Obtenido de Importing and processing gel images: <http://www.applied-maths.com/tutorial/importing-and-processing-gel-image> [consulta: 26 de abril de 2018].
27. Mazunder, S., Hicks, A., Norwood, J. 2010. *Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult. *N Am J Med Sci*, 205-207. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3354412/>. [consulta: 13 de abril de 2018]
28. Molloy, J., y col. 2008. One to make the diagnosis. A case of non-tuberculous mycobacterial mastoiditis in a nine year old female. 101(4): 123-4
29. Palacios Gutiérrez, Juan J. 2001. *Mycobacterium gordonae*. Obtenido de CCS: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micobacterias/gordonae.pdf> [consulta: 02 de abril de 2018].
30. Pérez, G. Amplificación de DNA mediante PCR (reacción en cadenas de la polimerasa). Campus universitario de rabanales. Córdoba. Obtenido de:

- <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/44%20PCR.pdf> [consulta: 09 de febrero de 2019].
31. Plikaytis, B., y col. 1992. Differentiation of Slowly Growing Mycobacterium Species, Including *Mycobacterium tuberculosis*, by Gene Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 30, 7: 1815-1822.
 32. PRASite. Obtenido de <http://app.chuv.ch/prasite/>. [consulta:01 de marzo de 2018]
 33. PulseNet. 2017. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>. [Consulta: 09 de mayo de 2018].
 34. Rodríguez, Y. 2001. *Estudio de micobacterias atípicas y su relación con la susceptibilidad a los desinfectantes derivados de amonio cuaternario*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
<http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/7852/1/Tesis%20Yarcely%20Rodr%C3%ADguez.pdf>. [consulta: 10 de abril de 2018].
 35. Runyon, E. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am*, 43:273-290.
 36. Runyon, E. H. 1974. Rejection of *Mycobacterium aquae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 532-533.
<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/24/4/ijis-24-4-532.pdf?expires=1526266396&id=id&accname=guest&checksum=C3383300EB3F89DC74B1C158C25A9714> [consulta: 09 de mayo de 2018]

37. Saifi, M., Jabbarzadeh, E., Bahrmand, A.R., Karimi A., Pourazar S., Fateh, A., Masoumi, M. 2013. *Hsp65*-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 723-728.
38. Sampaio, J y col. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 55: 107-118.
39. Sevilla, I. y col. 2007. Pulsed Field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. 7:18 BMC Microbiology.
40. Sheng bi, Fei-shu hu y col. Nontuberculous mycobacterial osteomyelitis. 2015. *Infectious Diseases*. 47: 673-685.
41. Struelens, Marc J. 1998. Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 581-586. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000500004>
42. Suresh, A., Goldsmith, S., Domínguez, D. 2005. Cutaneous *M. gordonae* infection in an immunocompetent Host. *Infectious in Clinical Práctica*, 280-281.
43. Telenti, A., Marchesi, F., Balz, A., Bally, A., Bottger E., Bodmer, T. 1993. *Rapid Identification of mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis*. Germany: Journal of Clinical microbiology.
44. Turner, D., Ramsey, P., Ojemann G., Ralph, D. 1985. Disseminated *Mycobacterium gordonae* infection associated with glomerulonephritis. *West J Med*, 142:391-393.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1306048/pdf/westjmed00175-0099.pdf>.

[consulta: 08 de marzo 2018]

45. Valdés, F., Cid, A. 2004. Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr.* 95 (6): 331-357.
46. Versalovic, J. y col. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research.* vol. 19.
47. Vílchez, Glenda y Alonso, Guillermina. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 6-12. Recuperado en 01 de febrero de 2019, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100003&lng=es&tlng=es.
48. Walton, D y Valesco, M. 1991. Identification of *Mycobacterium gordonae* from culture by the Gen-Probe rapid diagnostic System: Evaluation of 218 Isolates and potential Sources of false-negative results. *Journal of clinical microbiology*, vol.29, 9: 1850-1854.
49. Wojtasik, A. y col. 2011. Trinucleotide repeat sequence-based PCR as a potential approach for genotyping *Mycobacterium gordonae* strains. *Journal of microbiological methods*, 28-32.
50. Youssef, D., Shams, W., Elshenawy, Y., El-Abbassi, A., Moorman, J. 2014. Pulmonary infection with caseating mediastinal lymphadenitis caused by *Mycobacterium gordonae*. *International Journal of Microbiology*, 220-223.