

# Identificación rápida del Complejo *Mycobacterium avium* a partir de aislados utilizando Genotype *Mycobacterium* CM.

Misleidis Sardiñas Aragón<sup>1</sup>  
Lilian María Mederos Cuervo<sup>2</sup>  
Grechen García León<sup>3</sup>  
María Rosarys Martínez Romero<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, La Habana, Cuba, misle@ipk.sld.cu

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, La Habana, Cuba, Mederos@ipk.sld.cu

<sup>3</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, La Habana, Cuba, grechengl@ipk.sld.cu

<sup>4</sup>Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, La Habana, Cuba, rosarys@ipk.sld.cu

2

## Resumen:

**Introducción:** Las infecciones ocasionadas por especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) han tenido un incremento en los últimos años, asociado fundamentalmente al aumento de individuos inmunocomprometidos y al avance de técnicas diagnósticas. Las especies con mayor frecuencia de aislamiento son las integrantes del complejo *Mycobacterium avium* (MAC), causa frecuentes de infecciones en las personas viviendo con VIH/sida. Actualmente, se han desarrollado técnicas como el ensayo GenoType *Mycobacterium* CM permite la diferenciación rápida y confiable de las especies. **Objetivo:** Identificar y diferenciar el Complejo *Mycobacterium avium* utilizando la técnica Genotype *Mycobacterium* CM. **Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. Se analizaron 217 aislados de MNT procedentes de pacientes sintomáticos respiratorios obtenidos en la sección de diagnóstico del LNRI-TBLM del IPK y aislados enviados para la identificación de especie de los laboratorios de TB de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología país. El presente trabajo se realizó en el período comprendido entre Abril 2017- Mayo 2022. El método molecular utilizado fue GenoType *Mycobacterium* CM. **Resultados:** Se obtuvieron 91 (41,9%) aislados de Complejo *Mycobacterium avium*, de éstos 50 procedentes de personas viviendo con VIH/sida. La técnica Genotype *Mycobacterium* CM nos permitió separar dentro complejo MAC, las especies *Mycobacterium avium* (34; 37,4%) y *Mycobacterium Intracellulare* (57; 62,6%). **Conclusiones:** Estos resultados demuestran que se debe tener especial interés en las infecciones producidas por el MAC para que el paciente pueda comenzar una adecuada terapia, así poder prevenir las peligrosas formas diseminadas en particular en pacientes inmunodeficientes.

**Palabras claves:** Genotype *Mycobacterium* CM, Complejo *Mycobacterium avium*, micobacterias no tuberculosas.

## I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones ocasionadas por algunas especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) han tenido un incremento notable en varias regiones del mundo en los últimos años, asociado fundamentalmente al aumento de individuos inmunocomprometidos y al avance de técnicas diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad que han permitido mejorar la identificación de este tipo de infección.(1)

Dentro de las especies con mayor frecuencia de aislamiento se encuentran las integrantes del complejo *Mycobacterium avium* (MAC), conformado entre otras por las especies *M. avium* y *M. intracellulare*, estas especies están distribuidas ampliamente en el medio ambiente principalmente en el agua y suelo, siendo la inhalación e ingestión sus probables mecanismos de transmisión.(2)

La infección por este complejo es la principal causa en las personas viviendo con VIH/sida. En estos pacientes produce una infección diseminada, asociada con una gran mortalidad, sobre todo en los que presentan recuentos de linfocitos T CD4 <100 células/mL-1. También pueden causar linfadenitis en niños pequeños caracterizada por la inflamación de los ganglios linfáticos, especialmente del cuello. Aunque los síntomas varían dependiendo de la forma de la enfermedad, los síntomas más comunes incluyen fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, y fatiga. (3-6)

La identificación convencional de estas micobacterias se basa en el análisis de las características fenotípicas, biológicas y bioquímicas, tales como: morfología, velocidad de crecimiento, producción de pigmento, actividad de enzimas y la utilización de sustratos. Muchas de estas técnicas requieren de varias semanas para obtener sus resultados. (7)

Actualmente, se han desarrollado técnicas de hibridación reversa y tecnología de sonda en línea, como el ensayo GenoType *Mycobacterium CM* permite la diferenciación rápida y confiable de las especies de MNT ya que genera un patrón específico para cada una. El objetivo de nuestro estudio fue identificar y diferenciar el Complejo *Mycobacterium avium* utilizando la técnica GenoType *Mycobacterium CM*.

## II. MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en el cual se analizaron 217 aislados de MNT procedentes de pacientes sintomáticos respiratorios obtenidos en la sección de diagnóstico del LNRI-TBLM del IPK y aislados enviados para la identificación de especie de los laboratorios de TB de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) del país. El presente trabajo se realizó en el período comprendido entre Abril 2017-Mayo 2022. El método molecular utilizado fue GenoType *Mycobacterium CM* el cual se le realizó a todos los aislados siguiendo las instrucciones del fabricante. (8, 9)

Para la extracción de ADN, se utilizó el sistema comercial Genolyse. En la amplificación de ADN del ensayo se empleó un termociclador SpeedCycler2 (AnalytikJenna, Berlin, Alemania). Como control positivo se utilizó el suministrado por el sistema comercial y como control negativo se emplearon 5 µL de agua de calidad de biología molecular. La hibridación se llevó a cabo en la plataforma de incubación en un agitador con temperatura semiautomatizado Twincubator (Hain Lifescience). Para la evaluación e interpretación de los resultados se utilizó la tabla de interpretación del Manual de Instrucciones de la técnica.

### III. RESULTADOS

Se obtuvieron 91 (41,9 %) aislados de MAC, de éstos 50 procedentes de personas viviendo con VIH/sida. En el figura.1 se muestra los aislados de MAC identificados por año de estudio. Se puede observar que se produjo un aumento de los casos confirmados de MAC en los años 2017 al 2019. A partir del año 2020 hasta el 2021 se observó una disminución de casos. Ya en el 2022 hasta el mes de mayo que culminó este estudio, se aprecia un aumento en el envío de aislados comparado con igual periodo del 2021 (datos no publicados, libros de registro del laboratorio).

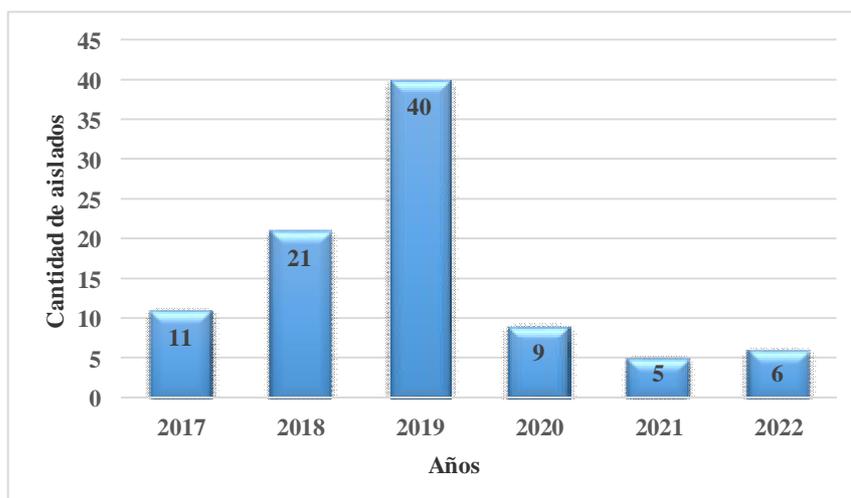


Fig. 1 Número de aislados de MAC por año.

La literatura internacional mantiene a MAC como las especies micobacterianas de mayor incidencia de aislamiento en seres humanos; éstas son las especies que más se asocian con casos de micobacteriosis pulmonar y extrapulmonar. (10,11)

En los niños, sólo en el 10% de las linfadenitis periféricas producidas por micobacterias se aísla *Mycobacterium tuberculosis*, en el resto, los aislamientos más frecuentes han sido por MAC. (3-6)

En este estudio se obtuvo un 41,9 % de aislados de MAC, los resultados de esta investigación son similares a los reportados por Mederos y cols. (2014), que analizaron aislados de MNT de muestras clínicas y detectaron al Complejo MAC (43%) entre las especies más frecuentes. (12)

El hecho que este tipo de infecciones no sean de declaración obligatoria hace que su epidemiología no sea bien conocida. A partir de los años 90 se ha propiciado la identificación de una serie de nuevas especies de micobacterias atípicas como causante de patologías en humano, esto es debido a la existencia de una población inmunodeprimida donde estas micobacterias se han desarrollado más fácilmente y el desarrollo de modernos sistemas de diagnóstico microbiológico que han permitido un mayor aislamiento e identificación micobacteriano.

El aumento de aislados identificados de enero – mayo 2022, en relación a igual período 2020 y 2021, pudiera estar relacionado con el aumento de la pandemia del Covid 19 en Cuba en ese período de tiempo.

po, donde se recibieron pocas muestras y aislados procedentes de las provincias para el diagnóstico y clasificación de MNT. Durante todo el año 2021, por ejemplo, se identificaron 5 aislados de MAC, mientras que en el 2022 en solo 5 meses se han identificaron 6 aislados.

En los últimos cinco años, los laboratorios de micobacteriología han preferido emplear la PCR-hibridación en línea (GenoType Mycobacterium CM y GenoType Mycobacterium AS) en la diferenciación rápida de MNT por ser una tecnología sencilla, de fácil interpretación, aunque para esta técnica se requiere de personal calificado, nuevos equipamientos, reactivos e insumos de calidad de biología molecular.(8)

En la actualidad, en los laboratorios de referencia de micobacterias, de países de ingresos medios y altos, se ha dejado de utilizar la identificación rutinaria de especie por pruebas bioquímicas. Estas requieren de la realización de numerosos ensayos que conllevan una gran cantidad de biomasa y pueden demorar varias semanas para obtener un resultado.

En este estudio utilizando la técnica GenoType Mycobacterium CM permitió separar dentro complejo MAC, las especies *Mycobacterium avium* (34) y *Mycobacterium Intracellulare* (57). Como se muestra en la tabla1.

Tabla 1. Resultados de la diferenciación en especies del complejo MAC por GenoType *Mycobacterium* CM.

Especies de Micobacterias	n	%	Patrón de bandas
<i>M. avium</i>	34	37,4	1,2,3,4
<i>M. intracellulare</i>	57	62,6	1,2,3,9

Leyenda: n = número de aislados

Los resultados obtenidos en esta investigación son superiores a los reportados por Sardiñas y cols, en Cuba, donde realizaron un estudio de 52 aislados clínicos para evaluar los ensayos GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS. Las especies predominantes fueron *fortuitum* 34,6%, *M. intracellulare* 21,2%, *M.avium* 11,5%. (13)

Sin embargo los resultados son inferiores a los reportados por Singh y cols. en el 2013., en la India, donde realizaron un estudio en 60 aislados clínicos para evaluar los ensayos GenoType *Mycobacterium* CM y GenoType *Mycobacterium* AS en la diferenciación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y las diferentes especies de MNT. Las especies de más comúnmente encontradas fueron: *M. fortuitum* 20 (33,3%), *M. intracellulare* 11 (18,3%) y *M. avium* 4 (6,7%). (14)

Actualmente, nuestro laboratorio cuenta con técnicas de hibridación de sondas de línea para la identificación de *M. avium* y *M. intracellulare*, sin embargo es necesario esperar al crecimiento en el medio de cultivo Löwenstein Jensen. Las enfermedades causadas por *M. avium* y *M. intracellulare* son indistinguibles clínicamente, por lo que el tratamiento es el mismo; por lo tanto la importancia de la diferenciación entre especies es con fines epidemiológicos.

#### IV. CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que se debe tener especial interés en las infecciones producidas por el MAC para que el paciente pueda comenzar una adecuada terapia, así poder prevenir las peligrosas formas diseminadas en particular en pacientes inmunodeficientes. La aplicación de la técnica molecular Genotype *Mycobacterium* CM es importante desde el punto de vista epidemiológico pues permite diferenciar *M. avium* y *M. intracellulare*, además se puede utilizar para fines de investigación. Por otro lado, permitió llegar a un diagnóstico en especie en un tiempo considerablemente menor que utilizando técnicas convencionales.

#### REFERENCIAS

1. De Lima CA, Gomes HM, Oelemann MA, Ramos JP, Caldas PC, Campos CE, et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 108:457–62.
2. Gordin FM, Horsburgh R. *Mycobacterium avium* Complex. En: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editores. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8a ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2015. p. 2832–2844.
3. van Ingen, J., Turenne, C.Y., Tortoli, E., Wallace, R.J., Jr. & Brown-Elliott, B.A. A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 3666–3677 (2018).
4. Currier JS. *Mycobacterium avium* complex (MAC) infections in HIV-infected patients. UpToDate. 2017; <https://www.uptodate.com/contents/mycobacterium-avium-complex-mac-infections-in-hiv-infected-patients>.
5. Koirala J. *Mycobacterium Avium-Intracellulare*. Medscape Reference. 2018; <http://emedicine.medscape.com/article/222664-overview>.
6. Godoy MJ, Orozco L, Hernández C et al. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Rev Soc Ven Microbiol* 2008; 28(2): 1315-2556.
7. Leiva C T. Evaluación de una técnica de hibridación reversa para identificación rápida de micobacterias en Chile. *Rev Chil Enf Respir* 2012; 28: 9-15.
8. GenoType *Mycobacterium* CM VER 2.0 Disponible en: [www.hain-lifescience.de](http://www.hain-lifescience.de)
9. GenoLyse VER 1.0 Disponible en: [www.hain-lifescience.de](http://www.hain-lifescience.de)
10. Mederos LM, Fleites G, Capó V, De Armas Y, Acosta MA, Martínez MR, Montoro EH. Linfadenitis por *Mycobacterium* incluyendo pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana. *Arch Ven* <http://www.siic.info> Farm y Terap 30:54-57, 2011.
11. Toyohiro H, Koichi M, Yutaka I, Takeshi K, Seshino I, Shuji T. Environmental risk factors for pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* complex disease. *Chest* 2011; 140 (3): 723-9.
12. Mederos L M, Sardiñas M, León G, Guerra JC, Martínez MR, Díaz R. Aspectos clínicos y aislamientos de micobacterias ambientales en muestras pulmonares y extrapulmonares. *SIIC* 2014; 21:40-4.
13. Sardiñas M, Mederos L M, León G, Martínez MR, Lemus D, Díaz R. Identificación rápida de micobacterias no tuberculosas en Cuba por las técnicas GenoType *Mycobacterium* CM/AS. *Neumol Cir Torax*. 2019; 78 (3): 290-295.

14. Singh A K, Maurya AK, Umrao J, Kant S, Singh RA, Laskshmi V et al. Role of GenoType *Mycobacterium* Common Mycobacteria/Additional Species Assay for Rapid Differentiation Between Mycobacterium tuberculosis Complex and Different Species of Non-Tuberculous Mycobacteria. J Lab Physicians 2013; 5(2):83–9.