



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Laura Herrera-León*, Rodolfo Pozuelo-Díaz, Tamara Molina Moreno, Azucena Valverde Cobacho, Pilar Saiz Vega y María Soledad Jiménez Pajares

Laboratorio de Referencia de Micobacterias, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de mayo de 2008

Aceptado el 7 de enero de 2009

On-line el 1 de mayo de 2009

Palabras clave:

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Identificación

Métodos moleculares

RESUMEN

Introducción: En el complejo *Mycobacterium tuberculosis* se engloban las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis-Calmette y Guérin*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium canettii*. Estas especies son las causantes de la tuberculosis en humanos y animales. Tradicionalmente la identificación de estas especies se ha basado en el estudio de métodos fenotípicos. No obstante, en los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas moleculares. El objetivo de este trabajo es la evaluación de cada una de éstas para crear un esquema de identificación rápido y sencillo.

Material y métodos: Mediante el esquema propuesto se analizaron 251 cepas escogidas al azar entre las estudiadas en el año 2004 y se analizaron 797 cepas recibidas en el Laboratorio de Referencia de Micobacterias entre los años 2005 y 2007. La caracterización fenotípica de 4.183 cepas aisladas en este período se realizó mediante el estudio morfológico de la colonia, el aspecto del cultivo, la reducción de nitratos, la producción de niacina y el crecimiento en presencia de 10 µg/ml de isoniácida del ácido 2-tiofencarboxílico y 50 µg/ml de pirazinamida. El esquema de identificación diseñado consiste en lo siguiente: 1) PCR (*polymerase chain reaction* 'reacción en cadena de la polimerasa')-RFLP (*restriction fragment length polymorphism* 'polimorfismo del ácido desoxirribonucleico') del gen *gyrB* y digestión con las enzimas *RsaI*, *TaqI* o *Sac II* y PCR-RFLP del gen *hsp65* y digestión con la enzima *HhaI*, y 2) PCR multicebador para detectar la ausencia o la presencia de las regiones RD9 y RD1.

Resultados: Los resultados obtenidos muestran una concordancia del 100% entre el esquema fenotípico y el esquema molecular.

Conclusión: Este esquema de identificación es un método rápido y sencillo basado en técnicas moleculares que puede implantarse en la mayoría de los laboratorios a un bajo coste y con un 100% de sensibilidad y de especificidad.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Differentiation of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular techniques

ABSTRACT

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis complex

Identification

Molecular methods

Introduction: The *Mycobacterium tuberculosis* complex includes the following species: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis-BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, and *Mycobacterium canettii*. These species cause tuberculosis in humans and animals. Identification of mycobacterial strains has classically been performed by phenotype study. Over the last years, laboratories have developed several molecular techniques to differentiate between these species. The aim of this study is to evaluate these methods and develop a simple, fast, identification scheme.

Material and methods: We analyzed 251 strains randomly obtained from the strains studied in 2004, and 797 strains received by the Reference Laboratory between 2005 and 2007. Phenotype characterization of 4183 strains isolated during that period was done by studying the colony morphology, characteristics in culture, nitrate reduction, niacin accumulation, and growth in the presence of thiophen-2-carboxylic acid hydrazide 10 µg/mL and pyrazinamide 50 µg/mL. The molecular identification scheme designed was as follows: 1) *gyrB* PCR-RFLP with *RsaI*, *TaqI* or *SacII* and *hsp65* RFLP/PCR with *HhaI*, and 2) multiplex-PCR to determine the presence/absence of the RD9 and RD1 regions.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lherrera@isciii.es (L. Herrera-León).

Results: The results showed 100% agreement between phenotype study and the molecular scheme.

Discussion: This molecular identification scheme is a simple and fast method, with 100% sensitivity and specificity, that can be implemented in most clinical laboratories at a low cost.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Hoy en día la tuberculosis es una enfermedad infecciosa emergente con 8 millones de casos nuevos y que causa alrededor de 2 millones de muertes al año en todo el mundo (http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007)¹. Las micobacterias que causan tuberculosis en hombres y animales se agrupan dentro del denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Actualmente, el CMTB se compone de las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* (subtipo I similar a *Mycobacterium bovis* [más frecuente en la zona oeste del continente africano] y subtipo II similar a *M. tuberculosis* [más frecuente en la zona este de África])^{2,3}, *M. bovis*, *M. bovis-Calmette* y *Guérin* (BCG), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium canettii* (que se considera como una subespecie de *M. tuberculosis*)⁴. La *M. tuberculosis* es la principal causa de tuberculosis humana en casi todo el mundo e infecta a más de un tercio de la población mundial (http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007)¹, excepto en algunas regiones de África en las que el agente causal es *M. africanum*² en el 60% de los casos de tuberculosis diagnosticados. Principalmente, *M. bovis* produce tuberculosis en animales salvajes y domésticos; el ganado bovino es el mayor reservorio de esta especie, lo que también produce, con relativa frecuencia, enfermedad en el hombre⁵. *M. caprae*⁶ y *M. microti*⁷ infectan al ganado caprino y a pequeños roedores, respectivamente, y ambas especies son causantes de casos de zoonosis, aunque en menor medida que *M. bovis*. *M. pinnipedii*⁸ es la especie que causa tuberculosis en pinnípedos, se aísla mayoritariamente en focas de varios continentes y por el momento no se han descrito casos de enfermedad en el hombre. *M. bovis*-BCG es una variante avirulenta obtenida en el laboratorio a partir de una cepa de *M. bovis* que por sucesivos pases perdió su poder patógeno y mantuvo su capacidad antigénica; actualmente se la utiliza como vacuna para la prevención de la tuberculosis, como vehículo recombinante para otras vacunas y como tratamiento inmunógeno⁹ que puede causar enfermedad en individuos inmunodeprimidos¹⁰ al tratarse de una cepa viva.

Un diagnóstico diferencial en la especie de las cepas que forman este complejo es importante, pues implica la administración de una adecuada pauta de tratamiento y porque conocer la especie productora de tuberculosis es una herramienta básica en la vigilancia de la salud pública.

Tradicionalmente, la identificación de las especies de este complejo se ha basado en sus características morfológicas, pruebas bioquímicas y tolerancia a pirazinamida (50 µg/ml) y a isoniácida del ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH) (10 µg/ml). Debido al lento crecimiento de estos microorganismos, la interpretación de los resultados puede ser subjetiva, especialmente la que se refiere a las características morfológicas que pueden variar debido a la pérdida de virulencia o debido a mutaciones asociadas a resistencia a fármacos¹¹, lo que puede producir errores en la identificación. Clásicamente, la tolerancia a TCH se ha asignado a *M. tuberculosis*. Sin embargo, Yates et al¹² mostraron que una gran mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes asiáticos mostraba sensibilidad al TCH, por lo que subdividió *M. tuberculosis* en «variedad clásica» y «variedad asiática». Además, las cepas de *M. bovis* resistentes a isoniácida también son resistentes al TCH, del mismo modo que hay cepas de

M. tuberculosis monorresistentes a pirazinamida (característica que clásicamente se ha atribuido a *M. bovis* y a *M. bovis*-BCG). La *M. africanum* tiene un fenotipo intermedio entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* y es susceptible a pirazinamida, pero en el caso de cepas monorresistentes a este fármaco, la identificación puede dificultarse¹³. Por esto, es necesario complementar la identificación mediante la utilización de técnicas moleculares.

Hay numerosas técnicas moleculares encaminadas a la identificación genotípica de estas especies que han desarrollado diversos grupos de trabajo. Todas éstas contribuyen a la identificación de alguna de las especies del CMTB pero ninguna recoge un esquema que permita la identificación molecular de todas las especies¹³⁻²⁰. El Laboratorio de Referencia de Micobacterias ha evaluado cada una de estas técnicas para elaborar un esquema de identificación rápido y sencillo que pueda implementarse en la mayoría de los laboratorios hospitalarios con un bajo coste. El desarrollo y la validación de este esquema es el objetivo básico de este trabajo.

Material y métodos

Cepas

Cepas control

Se utilizaron como cepas control para todas las técnicas empleadas cepas de la Colección Americana de Cepas Tipo (ATCC) del Instituto Pasteur y del Instituto Nacional y Salud Pública y Medio Ambiente Holandés: *M. bovis* ATCC 35.726, *M. bovis*-BCG ATCC 35.733, *M. africanum* ATCC 25.420, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25.618, *M. microti* ATCC 35.781, *M. caprae* CIP 105.776T y *M. canettii* RIVM 17.728.

Cepas estudiadas fenotípicamente

Durante los últimos 3 años (2005-2007) se estudiaron fenotípicamente 4.183 cepas del CMTB, 4.175 cepas de origen humano (sólo se incluyen en este estudio los resultados del primer aislamiento de cada paciente), 7 cepas de origen animal y una cepa aislada de un gastroscopio. Diversos hospitales de la Red Sanitaria Pública y un centro de Sanidad Animal remitieron estas cepas.

Cepas estudiadas molecularmente

- Se estudió a un total de 251 cepas de las que se recibieron en el Laboratorio de Referencia de Micobacterias en el año 2004 identificadas mediante métodos fenotípicos. Se eligieron 207 cepas de origen humano y 44 cepas de origen bovino: 150 cepas de *M. tuberculosis*, de las que 20 se identificaron como «variedad asiática», 73 cepas de *M. bovis*, 20 cepas de *M. bovis*-BCG y 8 cepas de *M. africanum*.
- Durante los últimos 3 años (2005-2007), se aplicó el esquema molecular a todas las cepas que se aislaron de pacientes de origen africano (545) con el fin de diferenciar *M. tuberculosis* y *M. africanum*, a todas las cepas que se aislaron de pacientes procedentes de Asia (35) para diferenciar *M. tuberculosis* de «variedad asiática» de *M. africanum*, a todas las muestras de

orina (122) para identificar *M. bovis*-BCG y a todas las cepas (95) que no presentaban las características fenotípicas de *M. tuberculosis*.

Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de estas cepas se realizó mediante la aplicación de métodos clásicos: morfología de la colonia, aspecto del cultivo, reducción de nitratos (NO₃), producción de niacina y crecimiento en presencia de 10 µg/ml de TCH y en presencia de 50 µg/ml de pirazinamida²¹.

Caracterización genotípica

La identificación individual de las especies incluidas en el grupo CMTB se realizó mediante estudios moleculares según el esquema que se muestra en la figura 1.

Todas las PCR (*polymerase chain reaction* 'reacción en cadena de la polimerasa') se realizaron con el equipo comercial «PureTaq Ready-To-Go PCR Beads» (GE Healthcare Life Science, Piscataway NJ, EE. UU.) con 5 µl de extracto crudo. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 Peltier (M.J. Research, Inc). La secuencia de los cebadores y de las condiciones de cada PCR se resume en la tabla 1. El tamaño de los productos amplificados se comprobó mediante electroforesis en 0,8% de agarosa mediante la utilización de marcadores de tamaño molecular (Marcador X de Roche y marcador de tamaño de 50 pb y 100 pb de GE Healthcare Life Sciences). El análisis de los patrones de restricción se realizó mediante electroforesis en 2% de agarosa, incluidos los mismos marcadores de tamaño. Los geles se observaron con luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio.

1. PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism* 'polimorfismo del ácido desoxirribonucleico'). La amplificación de un fragmento de 1.020 pb del gen *gyrB* se llevó a cabo mediante PCR mediante la utilización de los cebadores que describieron Kasai et al²². Se digirieron 10 µl del producto de amplificación con las enzimas RsaI, TaqI o Sac II (MBI Fermentas, España) según el protocolo que describieron Niemann et al¹⁸. El tamaño de los fragmentos obtenidos tras digestión con las enzimas

RsaI, TaqI y Sac II se muestra en las figuras 2A, 2B y 2C, respectivamente.

2. PCR multicebador (RD9). Para detectar la presencia o la ausencia de la región RD9 se siguió el protocolo que describieron Parsons et al¹³. El tamaño de los fragmentos obtenidos se muestra en la figura 3A. Si la región RD9 está presente, el cebador RD9INT se une en su extremo 3' y amplifica una región de 306 pb. La región que acota la pareja de cebadores RD9FF y RD9FR tendría un tamaño de 2.236 pb, por lo que no se produce su amplificación debido a las condiciones de la PCR empleadas. Sin embargo, si la región RD9 se encuentra ausente, la región que acota la pareja de cebadores RD9FF y RD9FR es de 206 pb y el cebador RD9INT no se uniría al no estar presente su secuencia homóloga.
3. PCR multicebador (RD1). Para detectar la posible delección de la región genómica RD1 se realizó el protocolo que describieron Talbot et al¹⁷. El tamaño de los fragmentos se muestra en la figura 3B. De forma similar a RD9, si la región RD1 está presente, el cebador ET2 se une a su extremo 3' y produce la amplificación de un fragmento de 150 pb, ya que la región que acota la pareja de cebadores ET1 y ET2 es de 9.455 pb (tamaño no amplificado bajo las condiciones de PCR empleadas). Si la región RD1 está ausente, los cebadores ET1 y ET2 amplifican un fragmento de 200 pb.
4. PCR-RFLP. La amplificación de un fragmento de 441 pb entre las posiciones 398 y 836 de la secuencia del gen *hsp65* de *M. tuberculosis* se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores que describieron Telenti et al²³. Se digirieron 10 µl del producto de amplificación con la enzima HhaI (MBI Fermentas, España) según el protocolo que previamente describieron Goh et al¹⁹. Los patrones que corresponden a cada especie se muestran en la figura 2D.

Resultados

Caracterización fenotípica

Al analizar los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica, en 3.966 (94,81%) de las 4.183 cepas recibidas en el

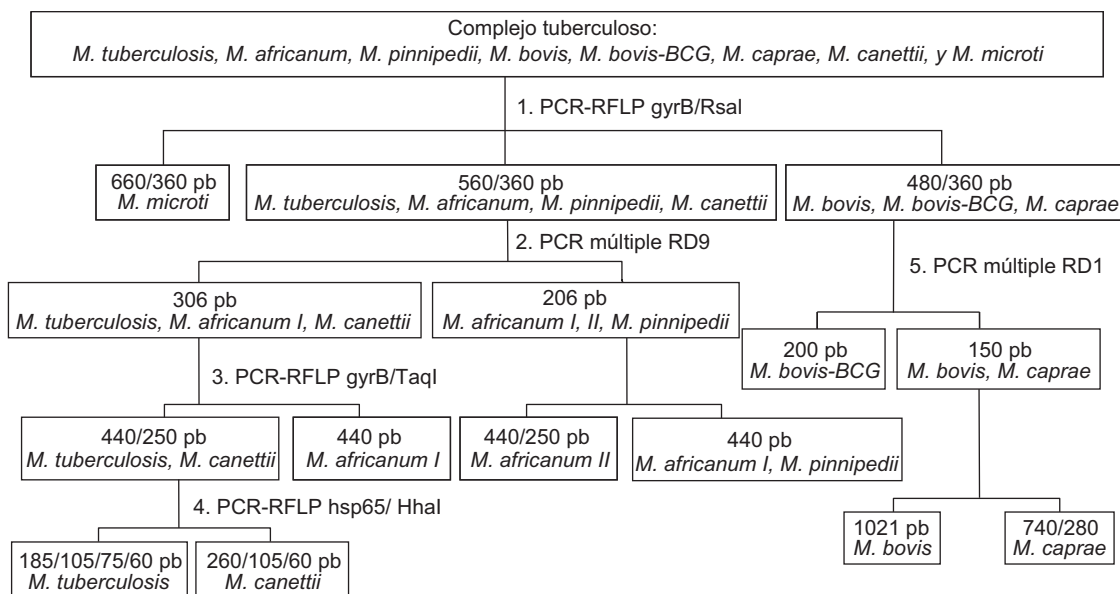


Figura 1. Esquema para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabla 1
Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa y las condiciones de amplificación

Diana de amplificación	Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones de amplificación	Tamaño esperado del amplificado (pares de bases)
Gen <i>gyrB</i>	MTUBF: TCGGACGCGTATGCGATATC MTUBR: ACATACAGTTCCGACTTGCG	Un ciclo (5 min a 94 °C), 35 ciclos (1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 90 s a 72 °C)	1.020
RD9	RD9FF: GTGTAGGTAAGCCCATCC RD9FR: GCTACCCCTCGACCAAGTGTT RD9INT: CAATGTTTGTGCGCTGC	Un ciclo (5 min a 95 °C), 40 ciclos (30 s a 94 °C, 1 min a 65 °C y 10 min a 72 °C)	306 o 206
RD1	ET1: AAGCGTTGCCGCGACCGACC ET2: CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG ET3: GACGCGATCTGGCGGTTGGGG	Un ciclo (5 min a 94 °C), 35 ciclos (1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 90 s a 72 °C)	200 o 150
Gen <i>hsp65</i>	Tb11: ACCAACGATGGTGTGCCAT Tb12: CTTGTCGAACCCGATACCT	Un ciclo (5 min a 95 °C), 35 ciclos (1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 90 s a 72 °C)	440

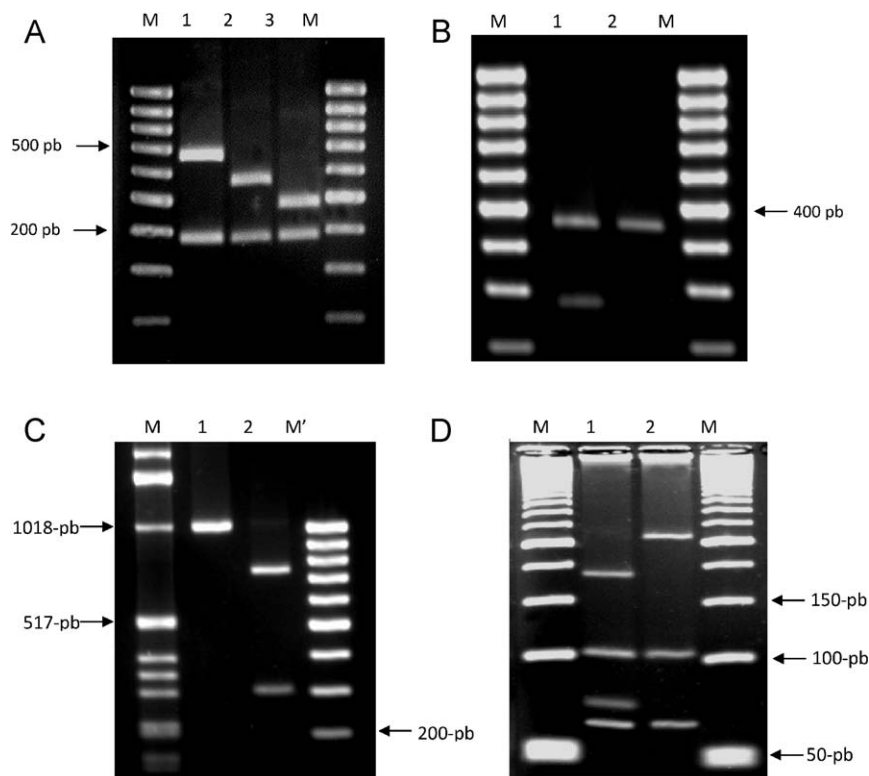


Figura 2. Patrones obtenidos al digerir el gen *gyrB* con las enzimas de restricción *Rsa*, *Taq* I y *Sac* II y el gen *hsp65* con la enzima *Hha*I. 2A) Patrones obtenidos al digerir el gen *gyrB* con *Rsa*I. Carriles: M: marcador 100pb; 1: *Mycobacterium microti*; 2: *Mycobacterium tuberculosis*; 3: *Mycobacterium bovis*. 2B) Patrones obtenidos al digerir el gen *gyrB* con la enzima *Taq*I. Carriles: M: marcador 100pb; 1: *Mycobacterium africanum* tipo II; 2: *M. africanum* tipo I. 2C) Patrones obtenidos al digerir un fragmento del gen *gyrB* con *Sac*I. M: marcador 100pb; 1: *M. bovis*; 2: *M. caprae*. 2D) Patrones obtenidos al digerir un fragmento del gen *hsp65* con *Hha*I. M: marcador 50pb; 1: *M. tuberculosis*; 2: *M. canettii*.

laboratorio las colonias fueron rugosas y eugónicas, redujeron los NO_3^- , produjeron niacina y fueron resistentes al TCH, por lo que se identificaron fenotípicamente como *M. tuberculosis*. Los resultados de las características morfológicas y bioquímicas de las cepas de este estudio se muestran en la tabla 3.

Caracterización molecular

En las 251 cepas elegidas entre las identificadas fenotípicamente en el laboratorio durante el año 2004 se identificaron 130 cepas (51,79%) de *M. tuberculosis* «variedad clásica», 73 cepas (29,08%) de *M. bovis*, 20 cepas (7,97%) de *M. tuberculosis* «variedad asiática», 20 cepas (7,97%) de *M. bovis*-BCG y 8 cepas (3,19%) de *M. africanum*. En todos los casos los resultados fenotípicos y

genotípicos coincidieron. Los patrones que se obtuvieron según las especies se muestran en las figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 3A y 3B.

En las 545 cepas aisladas de pacientes procedentes de África se identificaron 460 cepas (84,4%) de *M. tuberculosis*, 69 cepas (12,7%) de *M. africanum*, 14 cepas (2,6%) de *M. bovis* y 2 cepas (0,4%) de *M. caprae*.

En las 35 cepas aisladas de pacientes procedentes de Asia se identificaron 25 cepas (71,4%) de *M. tuberculosis* «variedad clásica» y 10 cepas (28,6%) de «variedad asiática».

En relación con las 122 cepas aisladas de orina, se identificaron 93 cepas (76,2%) de *M. tuberculosis*, 23 cepas (18,8%) de *M. bovis*-BCG, 4 cepas (3,3%) de *M. bovis* y 2 cepas (1,6%) de *M. africanum*.

La distribución de estas cepas por especies junto con la distribución de aquellas que no presentaban las características propias de *M. tuberculosis* «variedad clásica» se muestran en la tabla 2.

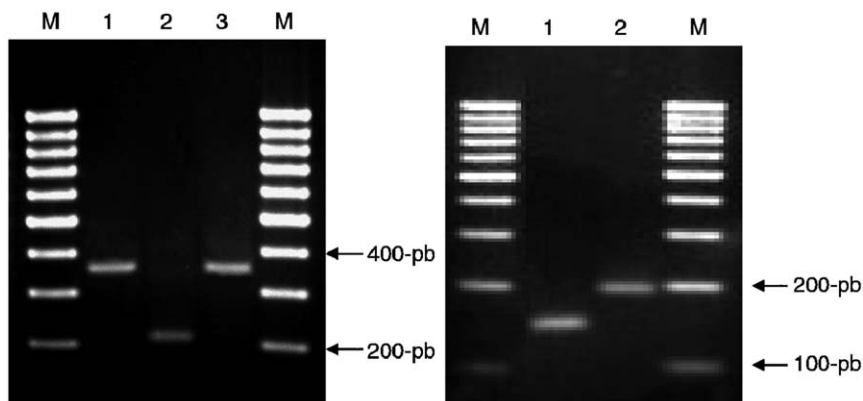


Figura 3. Productos de amplificación obtenidos en las PCR múltiples. A) RD9 y B) RD1. 3A) PCR múltiple RD9. Carriles: M: marcador 100pb; 1: *Mycobacterium tuberculosis*; 2: *Mycobacterium africanum* tipo II; 3: *M. africanum* tipo I. 3B) PCR múltiple RD1. Carriles: M: marcador 100pb; 1: *Mycobacterium bovis*; 2: *Mycobacterium bovis-Calmette y Guérin*. PCR: Polymerase chain reaction 'reacción en cadena de la polimerasa'.

Tabla 2

Distribución por especies de las cepas del grupo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* al aplicar estudios moleculares

Especie	n de cepas
Pacientes africanos	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	460
<i>Mycobacterium africanum</i> tipo I	57
<i>M. africanum</i> tipo II	12
<i>Mycobacterium bovis</i>	14
<i>Mycobacterium caprae</i>	2
Pacientes asiáticos	
<i>M. tuberculosis</i>	25
<i>M. tuberculosis</i> «variedad asiática»	10
Cepas aisladas de orinas	
<i>M. tuberculosis</i>	93
<i>Mycobacterium bovis-Calmette y Guérin</i>	23
<i>M. bovis</i>	4
<i>M. africanum</i> tipo I	2
Cepas sin <i>M. tuberculosis</i>	
<i>M. bovis</i>	60
<i>M. caprae</i>	20
<i>M. tuberculosis</i> Nitratos negativos	6
<i>M. bovis-Calmette y Guérin</i>	4
<i>M. africanum</i> tipo I	3
<i>M. tuberculosis</i> «variedad asiática»	2

No se identificó ninguna cepa como *M. microti*, *M. pinnipedii* o *M. canettii*.

Mayoritariamente las cepas procedían de muestras clínicas de pacientes, excepto 7 cepas de origen animal y una cepa obtenida de un control de esterilidad de un gastroscopio, que se identificó como *M. tuberculosis*. De las 7 cepas de origen animal, 3 se identificaron como *M. bovis* (todas éstas procedían de ganado bovino) y 4 cepas se identificaron como *M. caprae* (3 cepas aisladas de animales salvajes y una cepa aislada de cabra).

Discusión

La identificación de las especies que forman parte del CMTB ha estado clásicamente basada en el análisis de un número muy limitado de métodos fenotípicos. Estos métodos tienen una serie de inconvenientes: son lentos, al ser necesario el crecimiento de la bacteria (que para estas especies es de al menos 15 días), son de

lectura subjetiva y pueden llevar a errores en la identificación^{11,13} basándose en las características de estas bacterias. La *M. tuberculosis* posee una nitrato reductasa muy activa, pero en este estudio un número muy pequeño de cepas (18) carecía de esta enzima. Doce de estas 18 cepas se identificaron como *M. tuberculosis* «variedad asiática» al ser sensibles al TCH¹². También se ha demostrado la resistencia cruzada entre el TCH y la isoniácida, por lo que las cepas de *M. africanum* tipo I y las cepas de *M. bovis* resistentes a isoniácida lo son también a TCH²⁴. En este trabajo se pone de manifiesto la variabilidad fenotípica intraespecífica en las cepas de CMTB (tabla 3), por lo que se considera que el estudio exclusivo de estas características no es un buen método para la identificación de la especie y se debe complementar con la aplicación de técnicas moleculares basadas en el estudio de aquellos genes o de aquellas regiones del genoma en los que hayan diferencias interespecíficas.

Las especies que forman parte de este complejo están estrechamente relacionadas genéticamente. Poseen una homología superior al 95% en la hibridación ADN-ADN, tienen idénticas secuencias en los genes *rpoB*, 16S ácido ribonucleico ribosómico y en el espacio intergénico de los genes 16S y 23S ácido ribonucleico ribosómico y sólo la subespecie *M. canettii* difiere en el gen *hsp65*. Tienen el mismo perfil lipídico, excepto *M. bovis*-BCG, que presenta pequeñas diferencias con el resto de las especies. En base a estos datos, Van Soolingen et al indican que las especies reconocidas actualmente dentro del CMTB deberían considerarse taxonómicamente como subespecies de una sola especie. Las diferencias básicas entre éstas radican en el huésped, su origen geográfico y su patogenicidad⁴.

El esquema de identificación que se propone reúne las técnicas que aportan otros trabajos previamente publicados^{13,17–19}, pero interrelaciona unas con otras para llegar a la identificación individual de todas las especies del CMTB. En el esquema que propusieron Parsons et al¹³, se llega a la identificación de *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. africanum* y *M. tuberculosis*, pero no se diferencia entre subtipo I y II de *M. africanum* ni se diferencia al resto de las especies del complejo, mientras que en el esquema de Niemann et al¹⁸ se llega a la diferenciación específica de *M. africanum* tipo I, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG y *M. microti*, pero no diferencia *M. africanum* tipo II de *M. tuberculosis* ni identifica *M. canettii*. Por su parte, Goh et al¹⁹ y Talbot et al¹⁷ desarrollaron un método específico para la diferenciación de *M. canettii* y *M. bovis*-BCG, respectivamente. Con el esquema que se propone en este trabajo se llega a la identificación de todas las especies que componen el CMTB, excepto *M. pinnipedii* que, según los resultados de las pruebas moleculares estudiadas, sería indistinguible de

Tabla 3
Características fenotípicas de las cepas estudiadas

Especie	cepas, n	Morfología colonias	Aspecto cultivo	Reducción nitratos	Producción niacina	Crecimiento 10 µg/ml TCH	Crecimiento 50 µg/ml PZ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3.966	Rugosas	Eugónico	+	+	+	Variable
<i>M. tuberculosis</i>	6	Rugosas	Eugónico	-	+	+	-
<i>M. tuberculosis</i> ^a	12	Rugosas	Disgónico	-	+	-	-
<i>Mycobacterium africanum</i> tipo I	59	Rugosas	Disgónico	-	-	-	-
<i>M. africanum</i> tipo I ^b	3	Rugosas	Disgónico	-	-	+	-
<i>M. africanum</i> tipo II	8	Rugosas	Disgónico	+	+	+	-
<i>M. africanum</i> tipo II	4	Rugosas	Disgónico	+	-	-	-
<i>Mycobacterium bovis</i>	76	Lisas	Disgónico	-	-	-	+
<i>M. bovis</i> ^b	2	Lisas	Disgónico	-	-	+	+
<i>Mycobacterium bovis-Calmette y Guérin</i>	20	Rugosas	Eugónico	+	-	-	+
<i>M. bovis-Calmette y Guérin</i>	7	Rugosas	Eugónico	-	-	-	+
<i>Mycobacterium caprae</i>	20	Lisas	Disgónico	-	-	-	-

PZ: pirazinamida; TCH: ácido 2-tiofenocarboxílico.

^a Diez pacientes procedían de Asia.

^b Estas cepas fueron resistentes a isoniácida.

M. africanum de tipo I^{14,25}. Actualmente, *M. pinnipedii* no ha producido tuberculosis en humanos, sólo se ha aislado de diferentes especies animales (principalmente de pinnípedos)²⁶, por lo que la imposibilidad de identificar esta especie no sería un problema diagnóstico. Además, ambas especies pueden diferenciarse fenotípicamente, ya que *M. pinnipedii*, a diferencia de *M. africanum*, tiene preferencia por el piruvato¹⁴.

Un diagnóstico diferencial de la especie es importante, ya que implica la administración de una adecuada pauta de tratamiento. Todas las cepas de *M. bovis* son resistentes de forma intrínseca a pirazinamida debido a un cambio del nucleótido guanina por citosina en la posición 169 que origina la sustitución del aminoácido histidina por ácido aspártico, lo que produce la inactivación de la pirazinamidasa (enzima necesaria para convertir la pirazinamida en el principio activo eficaz sobre el bacilo tuberculoso)²⁷. De los 4.183 casos de tuberculosis estudiados, se identificaron como *M. bovis* 3 cepas de origen bovino y 75 cepas de origen humano que fueron la causa del 1,8% de los casos de tuberculosis en los que fue necesario un cambio en el tratamiento para evitar la aparición de nuevas resistencias por un procedimiento inadecuado. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de casos de tuberculosis que causó esta especie durante los 3 años analizados, 23 casos en 2005, 29 casos en 2006 y 26 casos en 2007. Se identificaron 20 cepas como *M. caprae*, 3 cepas se aislaron a partir de muestras de animales salvajes, una cepa a partir de muestra de cabra y el resto de las cepas a partir de muestras de pacientes de diversas comunidades autónomas, mayoritariamente con profesiones relacionadas con el tratamiento de este tipo de animales.

M. bovis-BCG se utiliza como complemento para potenciar la actividad inmunógena en el tratamiento de algunas enfermedades por su alto poder antigénico. En estos casos, un diagnóstico de la especie es fundamental para conocer si el aislamiento es *M. bovis*-BCG o si se trata de una infección que causa otra especie del grupo CMTB; en este caso hay que administrar un tratamiento anti-tuberculoso urgente. De las 27 cepas identificadas como *M. bovis*-BCG, 23 fueron aislamientos obtenidos a partir de orina tras la aplicación de un tratamiento inmunógeno sin valoración clínica. La aplicación del esquema molecular permitió diferenciar esta especie de otras especies causantes de una tuberculosis renal (93 cepas de *M. tuberculosis*, 2 cepas de *M. africanum* y 4 cepas de *M. bovis*). Se identificó *M. bovis*-BCG en 3 cepas de lesiones cutáneas producidas en el lugar de la vacunación con afectación ganglionar, en las que fue necesario aplicar tratamiento; este dato confirma las complicaciones posvacunales ya descritas en la literatura médica²⁸. También se aisló *M. bovis*-BCG en una muestra

respiratoria de un paciente que recibió tratamiento inmunógeno vesical, en el que se había producido una diseminación de la micobacteria por su estado de inmunodepresión (caso poco habitual pero no único)²⁹.

La diferenciación de las especies de este complejo también es una herramienta útil para un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad. Según el Sistema de Información Microbiológica, *M. tuberculosis* fue el agente causal de la mayoría de los casos de tuberculosis diagnosticados en España entre los años 2005 y 2006 (99,6%) (URL: http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/informacion_microbiologica/sim2006.pdf)³⁰. De las 12 cepas identificadas como *M. tuberculosis* «variedad asiática», 10 se aislaron de pacientes de ese origen geográfico y sólo en 2 casos los pacientes fueron españoles. Asimismo, se identificaron 74 cepas como *M. africanum*; todas las cepas, excepto 3, se aislaron de pacientes inmigrantes procedentes de África, mayoritariamente África subsahariana. Se ha observado un aumento paulatino en el número de aislamientos durante estos 3 años, lo que coincide con el aumento de la inmigración procedente de países en los que *M. africanum* es causante de un número muy elevado de casos de tuberculosis. La nacionalidad de los enfermos con tuberculosis que causa *M. africanum* y *M. tuberculosis* «variedad asiática» confirma la relación entre la especie y la procedencia geográfica, pero cada vez es más frecuente aislar estas especies de pacientes autóctonos que nunca han visitado esos continentes debido a los movimientos migratorios y a la integración de estas personas en la sociedad.

Este esquema basado en el estudio genotípico de las cepas del CMTB facilita y a su vez complementa el estudio fenotípico. Los resultados han demostrado que una combinación de ambos métodos proporciona una sensibilidad y una especificidad del 100% en la identificación de la especie de todas las cepas incluidas en este complejo, por lo que se propone como método idóneo para adscribir una cepa productora de tuberculosis, tanto en humanos como en animales, a una especie o a una subespecie concreta de este complejo.

Bibliografía

1. WHO. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. 2008 [citado 6 Oct 2008]. Disponible en: URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007.
2. Niemann S, Kubica T, Bange FC, Adjei O, Browne EN, Chinbuah MA, et al. The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. J Clin Microbiol. 2004;42:3958-62.
3. Niemann S, Rusch-Gerdes S, Joloba ML, Whalen CC, Guwatudde D, Ellner JJ, et al. *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. J Clin Microbiol. 2002;40:3398-405.

4. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:1236–45.
5. Palmer MV. Tuberculosis: A reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;315:195–215.
6. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:1785–9.
7. Van Soolingen D, Van der Zanden AG, De Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraïne NA, et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1840–5.
8. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:1305–14.
9. Brosnan SA. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. Techniques and results. *Urol Clin North Am.* 1992;19:557–64.
10. Talbot EA, Perkins MD, Silva SF, Frothingham R. Disseminated bacille Calmette-Guérin disease after vaccination: Case report and review. *Clin Infect Dis.* 1997;24:1139–46.
11. Kent PT aKG. Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. In: Services DpHaH, editor. Atlanta: Centers for Disease Control, Public Health Service; 1985.
12. Yates MD, Collins CH, Grange JM. "Classical" and "Assian" variants of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in South East England 1977–1980. *Tubercle.* 1982;63:55–61.
13. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2339–45.
14. Chimara E, Ferrazoli L, Leao SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:745–8.
15. Shah DH, Verma R, Bakshi CS, Singh RK. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;214:39–43.
16. Yeboah-Manu D, Yates MD, Wilson SM. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4166–8.
17. Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* 1997;35:566–9.
18. Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3231–4.
19. Goh KS, Legrand E, Sola C, Rastogi N. Rapid differentiation of *Mycobacterium canettii* from other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR-restriction analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3705–8.
20. Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2672–5.
21. Metchock B.N.F, Wallace R. *Mycobacterium*. En: Murray P.B.E, Tenover F, Tenover F, Tenover R., editores. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: American Society of Microbiology; 1999. p. 399–437.
22. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J Clin Microbiol.* 2000;38:301–8.
23. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:175–8.
24. Yates MD, Grange JM, Collins CH. A study of the relationship between the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isonicotinic acid hydrazide (isoniazid) and to thiophen-2-carboxylic acid hydrazide. *Tubercle.* 1984;65:295–9.
25. Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesselting A, Engelke E, De Kock M, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10:818–22.
26. Moser I, Prodinger WM, Hotzel H, Greenwald R, Lyashchenko KP, Bakker D, et al. *Mycobacterium pinnipedii*: Transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol.* 2008;127:399–406.
27. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* 1996;2:662–7.
28. Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, Dumitrescu N, Verron M, Couvet E. BCG complications. Estimates of the risks among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. *Adv Tuberc Res.* 1984;21:107–93.
29. Kristjansson M, Green P, Manning HL, Slutsky AM, Brecher SM, Von Reyn CF, et al. Molecular confirmation of bacillus Calmette-Guérin as the cause of pulmonary infection following urinary tract instillation. *Clin Infect Dis.* 1993;17:228–30.
30. Microorganismos notificados al Sistema de Información Microbiológica (SIM). Años 2005 y 2006. 2008 [citado 14 Oct 2008]. Disponible en: URL: http://www.isciii.es/hdocs/centros/epidemiologia/informacion_microbiologica/sim2006.pdf.