

**TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* EXTRAPULMONAR
EN COCHABAMBA*****Molecular Typification of Extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis
in Cochabamba***

* Zulema Bustamante García

** Claros Mireya

Recibido: 23 de julio de 2009 ; Aceptado: 22 de septiembre de 2009

RESUMEN

La tuberculosis extrapulmonar puede afectar a diversos órganos y tejidos que no sean los pulmones, en Bolivia no se conocen los diversos genotipos que se encuentran en este tipo de tuberculosis.

El propósito de este estudio fue determinar los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* que se presentan con mayor frecuencia y su asociación con diversas formas de tuberculosis extrapulmonar. Se analizaron 31 aislamientos procedentes de la Escuela Técnica de Salud, por el método IS6110 PCR, que se basa en el polimorfismo adyacente a la secuencia de inserción IS6110, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Se observó que el mayor número de aislamientos provenían de muestras de orina y se determinó una alta variabilidad genética, con 14 genotipos diferentes, pero con 3 predominantes. También se encontró que en la tuberculosis de vías urinarias, se presentaron con mayor frecuencia dos genotipos. Los genotipos que sobresalieron en la tuberculosis extrapulmonar fueron diferentes a los que se encontraban predominando en aislamientos de tuberculosis pulmonar, si bien se observó la presencia de algunos perfiles ya descritos previamente en *Mycobacterium tuberculosis* pulmonar.

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis extrapulmonar, PCR, genotipos.

ABSTRACT

Extrapulmonary tuberculosis can affect several organs and tissues other than the lungs. The genotypes found in this type of tuberculosis, but the genotypes found in this type of tuberculosis are not known in Bolivia.

The purpose of this paper is to identify the genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* that are most often found and their association with various forms of extrapulmonary tuberculosis. 31 isolates from the Technical School in Health were analyzed applying the IS6110 PCR method which is based on polymorphism adjacent to the insertion sequence IS6110 and making use of the polymerase chain reaction.

It was noticed that the greater number of isolates comes from urine samples and a high genetic variability was determined with 16 different genotypes, 3 of them being prevalent. It was also observed that in urinary tuberculosis, two genotypes are more common. The prevalent genotypes found in extrapulmonary tuberculosis are different from the isolates found in pulmonary tuberculosis. However some genotype profiles already described for pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* were also observed.

KEY WORDS: Extrapulmonary tuberculosis, PCR, genotypes.

* Fac. de Bioquímica y Farmacia. Universidad Mayor de San Simón.

** Escuela Técnica de Salud

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad principalmente pulmonar, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo este microorganismo también puede atacar a otros órganos o tejidos que no sean los pulmones produciendo la tuberculosis extrapulmonar¹. Entre las formas más frecuentes de tuberculosis extrapulmonar se encuentra la tuberculosis genitourinaria, la tuberculosis meningea, osea, miliar, cardiovascular, oftálmica y pleural.

La tuberculosis genitourinaria produce infección renal y luego infección urinaria; que es probablemente una de las más frecuentes. La tuberculosis meningea, se produce cuando el microorganismo se asienta en la meninge y puede producir migrogranulomas, los síntomas pueden ser, dolor de cabeza y convulsiones. La ósea, también se presenta con bastante frecuencia y puede afectar a las vertebrae y producir abscesos o afectar las articulaciones, causando la artritis tuberculosa, la tuberculosis miliar se debe a la diseminación sanguínea afectando a distintos órganos. La cardiovascular afecta al corazón pericarpio o vasos sanguíneos. La oftálmica afecta principalmente al iris, cuerpos filiares y coroides, la pleural afecta a la pleura con serias consecuencias².

La tuberculosis extrapulmonar es menos frecuente que la pulmonar y en otros países constituye entre 15 a 20% de los casos de tuberculosis^{3,4}. En Bolivia en los años 2002 a 2004, se reportaron un 13% a 15% de casos de tuberculosis extrapulmonar⁵.

El *Mycobacterium tuberculosis*, pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, dentro el orden de los Actinomycetales, tiene un cromosoma rico en C y G.^{6,7}

En nuestro país si bien se tienen algunos datos de los genotipos circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* pulmonar⁸, no se conoce si los genotipos que producen la tuberculosis pulmonar son los mismos o diferentes a los que producen la tuberculosis extrapulmonar y si existe algún genotipo que predomina en la infecciones producidas en los diferentes órganos o tejidos.

Para realizar los estudios de genotipificación, se toma regiones del genoma que son utilizadas como marcadores genéticos. Cada técnica produce un perfil genético que es específico para la cepa examinada, y estos perfiles son referidos como huellas digitales. La técnica más utilizada para realizar estudios a nivel de epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis*, es la técnica estandarizada

por Van Emden, (IS6110 – RFLP)⁹, pero debido a algunos inconvenientes que presenta la técnica IS6110-RFLP, como ser, el requerimiento de un cultivo masivo de la bacteria, difícil de lograr, el tiempo y costo, se han ido desarrollando otros métodos, entre estos se encuentra la técnica IS6110-PCR, propuesta por Otal¹⁰ y utilizada ya en estudios anteriores en nuestro país⁸. Esta última técnica se basa en el polimorfismo adyacente a las secuencia de inserción IS6110, usada como marcador molecular de esta bacteria.

El presente estudio tiene por objetivo, identificar los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* que produce la tuberculosis extrapulmonar, que se presentan con mayor frecuencia en Cochabamba y determinar si los genotipos que se encuentra en este tipo de tuberculosis son los mismos o diferentes a los que se encuentran en tuberculosis pulmonar y al mismo tiempo, ver si existe algún genotipo predominante. Este estudio pretende aportar datos de gran importancia para nuestra región y para que sean utilizados en bien de la salud poblacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 31 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar, aislados e identificados en la ESCUELA TÉCNICA DE SALUD DE COCHABAMBA, a partir de orinas, secreciones purulentas, heridas y Líquido Céfaloraquídeo (LCR), posteriormente derivadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UMSS, el 2006 y 2007

Para La genotipificación de este microorganismo, se utilizó la técnica molecular, IS6110-PCR ya utilizada y validada en un trabajo anterior por el método IS6110-RFLP⁸.

Para este trabajo se extrajo el ADN bacteriano, se realizó una amplificación por PCR y luego la visualización de las diferentes bandas, de acuerdo a los procedimientos previamente descritos.^{11,12}

EXTRACCIÓN DEL ADN

Del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, se tomó pocas colonias, se colocó en un buffer de Tris-HCl, 10 mM, EDTA 1 mM, se las hicieron hervir por un tiempo 30 minutos, se agregó cloroformo y se centrífugo a 12.000 rpm, tomando el sobrenadante donde se encontraba el ADN.

PCR PARA LA TIPIFICACIÓN IS 6110

Se utilizaron los cebadores CAR 2 A y CAR 2 B, con la siguiente secuencia; CAR 2 A (5'-GAC-TCA-CCG-GGG-TTC-A-3'); CAR 2 B (5'-GAC-ATG-CCG-GGG-CGG-TTC-A-3'), dirigidos a los extremos de la IS6110. Los mismos que fueron sintetizados por SIGMA. Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa fueron: 1 ciclo a 94 °C por 2 minutos (desnaturalización inicial); 40 ciclos de 94 °C por 10 seg, 62 °C por 20 seg, 72 °C por 1 minuto. Y 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos (extensión final).

-Los productos fueron analizados por electroforesis en agarosa al 1,4%, con bromuro de etidio en una concentración de 0,5 ug/ml y visualizados en un transiluminador de luz U.V.

RESULTADOS

Se analizó un total de 31 muestras, procedentes de diferentes órganos y tejidos. El detalle de las muestras se encuentra en la figura 1.



Figura 1. Distribución de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar. Or (Orina), Sup (Supuraciones), Asc (Líquido Ascítico) LCR (Líquido Cefalo raquídeo)

Como se observa en esta tabla de las 31 muestras analizadas, 23 aislamientos corresponden a orinas, representando un 74,19% del total, Supuraciones 2 (6,45%), Líquido ascítico 2 (6,45), Líquido cefalo raquídeo 4 (12,90%). Los análisis moleculares, realizados por la técnica IS6110-PCR, muestran una amplia variabilidad genética. (Figuras 2 y 3), donde se observan productos de amplificación de diferente número de pares de bases.

M C- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

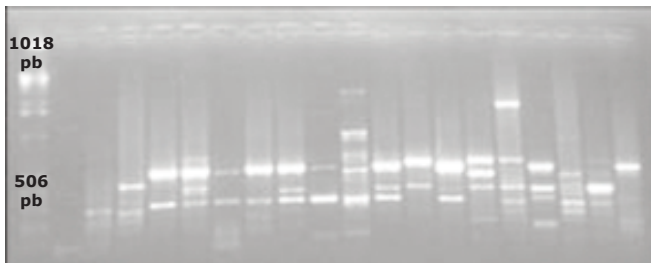


Figura 2. M (marcador),(C-), 1-17 orinas. 1(53),2 (635) 3(721,) 4 (294,) 5(417) 6 (94,); 7(1049) 8(328), 9(653); 10(615); 11 (537); 12 (551);13 (833); 14(730) ; 15 (934); 16 (974);17 (956); 18, (253) Sec. Purulenta).

M C- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

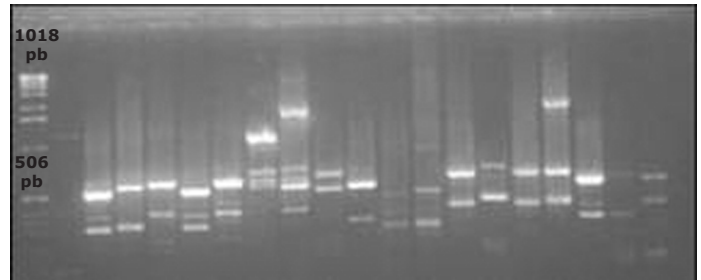


Figura 3. M (marcador), C (Control negativo) 1,3,4,5,6,7 orina ; 1(966), 2(928 LCR), 3(1086), 4(1186), 5(1271), 6(234), 7(230), 8(153 secreción), 9(370 Liq. Ascítico), 10(648 Liq. Ascítico), 11(204 pulmonar), 12(199 pulmonar), 13(153 Secreción), 14(632 LCR), 15(448 LCR), 16(889 LCR), 17(889 LCR), 18(C+ H37 Rv).

En base al análisis de las figuras 2 y 3 se encontró un total de 14 perfiles, de los cuales 5 genotipos fueron descritos en tuberculosis pulmonar como son el II, VIII, IV, VII y III 8, y los nuevos perfiles encontrados en estas muestras fueron en total 9 y corresponden a los genotipos X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVI y XVIII, mostrando una amplia variabilidad genética. El porcentaje de estos se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Genotipos encontrados en diferentes muestras de *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar

| Genotipos | N. de Aislamientos | Porcentaje % |
|-----------|--------------------|--------------|
| II | 9 | 29,03 |
| VIII | 6 | 17,35 |
| IV | 3 | 9,67 |
| VII | 1 | 3,22 |
| X | 1 | 3,22 |
| XI | 2 | 6,45 |
| XII | 1 | 3,22 |
| XIII | 1 | 3,22 |
| III | 2 | 6,45 |
| XIV | 1 | 3,22 |
| XV | 1 | 3,22 |
| XVI | 1 | 3,22 |
| XVII | 1 | 2,22 |
| XVIII | 1 | 3,22 |

Esta tabla muestra la variabilidad genética, sin embargo existen grupos claramente dominantes que corresponden a los genotipos II con 2 bandas de 500 y 200 pb ; VIII con 3 bandas de 200, 300 y 500 pb y el genotipo IV con 550 y 300 pb.

También se realizó un análisis de la distribución de genotipos en las diferentes formas clínicas, encontrando mayor variabilidad en orinas. (Figura 4)

De un total de 31 muestras 23 fueron orinas lo que nos permitió analizar los genotipos circulantes en esta forma clínica como se observa en la figura 5.



Figura 4. Distribución de genotipos en diferentes muestras clínicas.

En esta figura podemos apreciar que si bien hay un total de 11 genotipos, el II y el VIII, se encuentran predominando en la tuberculosis urinaria con un porcentaje de 26,08 cada uno.

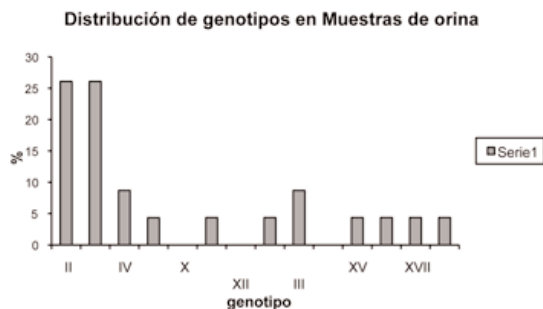


Figura 5. Gráfico de distribución de genotipos en orinas

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En relación al porcentaje de la tuberculosis de diferentes órganos y tejidos se pudo observar que los aislamientos procedentes de orinas son mayoritarios, representando un total de 74,19%. Este es un dato que llama la atención porque si bien en algunos trabajos indican que la tuberculosis urinaria es la más frecuente^{2,13}, en un estudio anterior se encontró que el mayor porcentaje de aislamientos provenían de muestras de orina¹⁴; en otras investigaciones realizadas en Cuba¹, reportan un porcentaje más alto de aislamientos provenientes de líquido pleural, seguido de tuberculosis ganglionar; así también en otro estudio en Maryland, encuentran una mayor prevalencia de tuberculosis cérico linfática y la tuberculosis genito urinaria solo en un porcentaje de un 4,9%⁴. Esta diversidad de resultados indican que el tipo de tuberculosis o los órganos más afectados varían en los diferentes

países y regiones.

Respecto a los genotipos encontrados observamos una alta variabilidad puesto que en total se encontró 14 genotipos diferentes en las 31 muestras analizadas, además se ve que no existe una estrecha relación entre los genotipos que fueron observados en tuberculosis pulmonar y tuberculosis extrapulmonar, si bien se presentaron genotipos ya descritos previamente en tuberculosis pulmonar, la frecuencia de los mismos es muy diferente, además aparecen otros que no fueron observados en aislamientos de tuberculosis pulmonar⁸. Es así que en *Mycobacterium tuberculosis* pulmonar predominaban los genotipos I y III y se encontraban en porcentajes muy bajos el II, VIII y IV⁸, que son los que se observaron con mayor frecuencia en la tuberculosis extrapulmonar.

En el trabajo de Torgersen¹⁴, encontraron una amplia variabilidad genética en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar y perfiles diferentes que en la tuberculosis pulmonar. La alta variabilidad genética de esta bacteria fue descrita en el estudio realizado por Nicol et al¹⁵ en Sud Africa, donde observaron 11 familias de genotipos en *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar. En otro estudio realizado en San Francisco¹⁶, encontraron que epidemiológicamente los genotipos de *M. tuberculosis* en su mayoría difieren de los de tuberculosis pulmonar, resultado que observamos cuando comparamos los perfiles de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en la ciudad de Cochabamba.

En relación a la presencia mayoritaria de 2 genotipos, ocurre normalmente cuando en los países se observa, que cuando hay una alta prevalencia de la enfermedad puede existir un mayor grado de parentesco en las cepas circulantes a causa de una transmisión activa y reciente¹⁷.

Cuando analizamos la relación entre el genotipo y la manifestación clínica de la tuberculosis extrapulmonar, se observa el predominio de dos genotipos en los aislamientos provenientes de muestras de orina; si bien existen reportes previos que indican que podría existir una relación por ejemplo entre determinados genotipos y su afinidad por tejidos cerebroespinales¹⁸, este resultado es discutible y variable, puesto que en otros estudio en Madagascar¹⁹, se analizó la relación entre los genotipos y las manifestaciones clínicas, para ver si determinados genotipos tienen preferencia para determinados órganos, no encontraron asociación entre diferentes órganos o tejidos y genotipo en especial.

Este trabajo nos permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- El mayor número de aislamientos *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar procedían de orinas en un porcentaje de 74,19%.
- Se encontró amplia variabilidad genética con un total de 14 genotipos diferentes, los genotipos que se presentaron con mayor frecuencia en las muestras analizadas fueron el II con 29,03%, el VIII con 17,35% y el IV con 9,67%.
- De los genotipos encontrados 9 fueron diferentes y 5 similares a los descritos en *Mycobacterium tuberculosis* de origen pulmonar, de estos, se observó en mayor porcentaje aquellos que fueron minoritarios en tuberculosis pulmonar como los genotipos II, VIII y IV.
- En las muestras de orina se observó 11 genotipos, de los cuales se encontraban en mayor porcentaje el II y el VIII en un 26,08% cada uno.

Los resultados nos permitieron conocer la variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* de origen extrapulmonar.

BIBLIOGRAFIA

1. Garcia Silvera E, Yera Perez D.M, Valdez Diaz S, et al. Comportamiento de la tuberculosis extrapulmonar eb el hospital Neumológico "Benéfico Jurídico" durante el quinquenio 1999-2003. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2006. 58(3).
2. Tuberculosis. Htt:// salud.discapnet.es. Fecha de consulta 21/01/09.
3. Lizarazo J. Tuberculosis extrapulmonar. Biomédica 2006 Mar: 6(1): 81-82
4. Torgersen J, Dorman SE, Baruch N, Hooper N et al. Molecular epidemiology of pleural and other extrapulmonary tuberculosis: a Maryland state review. Clin Infect Dis. 2006 May:42: 1375-82.
5. SEDES. Datos epidemiológicos. 2006
6. Reniero,A. Las Mycobacterias. Mycobacterium tuberculosis. http://www.rutasalud.com.ar/para_profesionales/5htm
7. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Dephering the biology of Mycobacterium tuberculosis from de complete geneome sequence. Nature Jun : 393(6685) : 537-44.
8. Bustamante Z. Tipificación Molecular de Mycobacterium tuberculosis De los departamentos de Cochabamba, La Paz y Santa Cruz. Tesis de grado.UMSS.2004.
9. Van Embden J, Cave M.D, Crawford J, et al. Strain identification of Micobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendation for a Standardized methodology. Journal of Clinical Microbiology 1993 Feb: 31(2): 406-40
- 10 Otal I.; Samper S, Asensio M.P, et al. Use a PCR Meted Based on IS6110 Polimorphism for Typing Mycobacterium tuberculosis Strains from Bacted Cultures.1997Jan:35(1):273- 7.
11. Otal I, Martin C, Vincent V, et al. Restriction Fragment Length Plymorphism Analysis Using IS6110 as an Epidemiological Marker in Tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology 1991 Jun: 29(6):1252-54
12. Yates M, Drobniewski F and Stuart W. Evaluation of a Rapid, PCR-Based Epidemiological Typing Method for Routine Studies of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology. 2002 Feb: 40(2):712-4.
13. Tuberculosis-capitulo 181.Madrid España. 2005
Htt://www.msdmes/publicaciones/merck
14. Chavez D. Aplicación de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa(PCR) en relación al cultivo para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. Tesis de grado. UMSS.2006.
- 15.Nicol MP, Sola C, February B, et al. Distribution of strain families of Mycobacterium tuberculosis causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa.Journal of Clinical Microbiology, 2005 Nov: 43(11): 5779-81.
16. Ong A, Creasman J, Hopewell PC, et al. Molecular epidemiological assessment of extrapulmonary tuberculosis in San Francisco. Clin Infect Dis. 2004 Jan:38(1):25-31
17. Sechi L, Zanetti S, Delogu G, et al. Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated from Different Regions of Italy and Pakistan. Journal of Clinical Microbiology 1996 Jul:34 (7):1825-8
18. Palittapongarnpim P,Rienthong S, and Panbangred. Comparison of restriction fragment length polymorphismo of Mycobacterium tuberculosis isolated from cerebrospinal fluid and sputum: a preliminary report Tubere. Lung. Dis.1993. 74: 202-207
19. Rasolofoz Razanamparany, V., D. Menard, G. Auregan, et al. Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in Antananarivo (Madagascar): high clustering rate in female patients. J. Clin. Microbiol Nov: 2002: 40(11):3964-3969