

Artículo original

Identificación de micobacterias no tuberculosas en pacientes VIH/SIDA por métodos convencionales y de fracciones de ácidos micólicos

Lilian María Mederos*, Jean Louis Frantz, Ma. Angeles Perovani,
Misleidis Sardiñas, Ernesto Hilario Montoro

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micobacterias y Tuberculosis,
Centro Colaborador OPS/OMS
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), La Habana, Cuba

Recibido 20 de diciembre de 2000; aceptado 10 de febrero de 2007

Resumen: Las micobacterias no tuberculosas son patógenos oportunistas capaces de producir infecciones pulmonares y extrapulmonares. El aumento de su incidencia se ha acelerado después de la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En este trabajo se estudiaron 40 cepas aisladas de pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, a los aislamientos con significación patológica se le aplicó el estudio de los patrones de las fracciones de ácidos micólicos. Los resultados fueron: 9 *Mycobacterium avium*, 8 *Mycobacterium fortuitum*, 4 *Mycobacterium flavescens*, 4 *Mycobacterium smegmatis*, 3 *Mycobacterium marinum*, 4 *Mycobacterium gastri*, 2 *Mycobacterium gordonae*, 2 *Mycobacterium chelonae*, 1 *Mycobacterium xenopi*, 1 *Mycobacterium phlei*, 1 *Mycobacterium triviale*, y 1 *Mycobacterium malmoense*. Sólo 5 de estas cepas estaban asociadas a cuadros clínicos: 2 *Mycobacterium avium* (micobacteriosis diseminada y renal respectivamente), 1 *Mycobacterium gordonae* (lesiones en piel), 1 *Mycobacterium fortuitum* (linfadenitis submaxilar), 1 *Mycobacterium malmoense* (linfadenitis submaxilar). Las especies más frecuentemente aisladas fueron *M. avium* y *M. fortuitum* acorde con lo revisado en la literatura. La aplicación simultánea de las técnicas convencionales y el estudio de las fracciones de ácidos micólicos ha permitido obtener resultados más confiables por lo que recomendamos su aplicación en estos estudios.

Palabras claves: *Mycobacterium*, micobacterias no tuberculosas, SIDA, ácidos micólicos

Identification of non tuberculosis mycobacteria from HIV/AIDS patients by conventional methods and by study of mycolic acid fractions

Abstract: Non tuberculosis mycobacteria are opportunist pathogens whose frequency in human infections has increased after the appearance of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). In this work we studied 40 strains isolated from patients infected by the Human Immunodeficiency Virus and isolates with pathogenic significance were further analyzed for diagnostic confirmation by the method that studies mycolic acid fractions. After identification, the results were: 9 *Mycobacterium avium*, 8 *Mycobacterium fortuitum*, 4 *Mycobacterium flavescens*, 4 *Mycobacterium smegmatis*, 3 *Mycobacterium marinum*, 4 *Mycobacterium gastri*, 2 *Mycobacterium gordonae*, 2 *Mycobacterium chelonae*, 1 *Mycobacterium xenopi*, 1 *Mycobacterium phlei*, 1 *Mycobacterium triviale*, and 1 *Mycobacterium malmoense*. Only five of these strains were associated to clinical symptoms: 2 *Mycobacterium avium* (disseminated and renal mycobacteriosis respectively), 1 *Mycobacterium gordonae* (skin lesions), 1 *Mycobacterium fortuitum* (submaxilar lymphadenitis), and 1 *Mycobacterium malmoense* (submaxilar lymphadenitis). The species most frequently isolated were: *M. avium* and *M. fortuitum*, in agreement with a bibliographic revision. The simultaneous application of conventional techniques and the study of mycolic acid allowed us to obtain more trustworthy results.

Keywords: *Mycobacterium*, non tuberculosis mycobacteria, AIDS, mycolic acids

* Correspondencia:
E-mail: mederos@ipk.sld.cu

Introducción

La tuberculosis es la enfermedad micobacteriana más antigua conocida, sin embargo hay otras especies de micobacterias, diferentes a las pertenecientes al Complejo tuberculosis, llamadas micobacterias atípicas, micobacterias no tuberculosas (MNT) o más recientemente denominadas como micobacterias oportunistas, que son capaces de provocar enfermedades denominadas micobacteriosis [1].

Estas especies cada vez toman mayor importancia por su asociación a casos clínicos en humanos y hasta ahora hay más de 80 especies descritas, que en muchas ocasiones son patógenos oportunistas con grados variables de virulencia. Antes de la pandemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), las micobacterias estaban confinadas principalmente a infecciones pulmonares. El surgimiento del SIDA ha cambiado dramáticamente la epidemiología de las micobacterias atípicas; entre un 25-50% de estos pacientes están infectados por ellas. Las infecciones pueden ser generalizadas en dependencia del grado de inmunodepresión del paciente, por lo que el diagnóstico puede resultar difícil ya que varias enfermedades pueden llegar a estar asociadas [2].

La importancia de las enfermedades producidas por este grupo de patógenos, lejos de disminuir con el aumento de los conocimientos científicos respecto a las mismas, continúa en franco ascenso. Este aumento ha llevado a un incremento paralelo en la investigación y conocimiento de estas especies micobacterianas, que ha derivado en la búsqueda de nuevos criterios diagnósticos y terapéuticos para cada una de ellas. Por todo ello pensamos que la microbiología clínica de las micobacterias es fundamental para el diagnóstico precoz y para el control de estas infecciones [2,3].

El objetivo de este trabajo es la identificación de especies micobacterianas a partir de muestras clínicas pulmonares y extrapulmonares procedentes de un grupo de pacientes VIH positivos sintomáticos, mediante esquemas bioquímicos de identificación y la aplicación de la técnica alternativa diagnóstica de cromatografía en capa delgada (CCD) para el estudio de los patrones de las fracciones de ácidos micólicos.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis y Micobacterias (LNR-TB/Micobacterias) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), La Habana, Cuba.

Se estudiaron 40 cepas aisladas de pacientes sintomáticos VIH/SIDA. Estos pacientes habían sido tratados en el IPK, Hospital Nacional de Referencia para la atención a pacientes VIH/SIDA. Las cepas fueron procesadas en el LNR-TB/Micobacterias. Todas las cepas aisladas fueron subcultivadas en medio Löwenstein-Jensen modificado (Unión Internacional de la Tuberculosis, UIT) incubándose a 37 °C durante 3-4 semanas para posteriormente realizar la clasificación e identificación micobacteriana por el

esquema bioquímico utilizado en nuestro laboratorio. Como controles positivos y negativos en las pruebas bioquímicas se utilizaron cepas de referencia pertenecientes a la colección de nuestro laboratorio [4].

Nuestro esquema de identificación consiste en el análisis de diferentes pruebas: caracterización fenotípica y cultural, producción de pigmentos, tiempo de crecimiento, temperatura, determinación de enzimas y crecimiento en presencia de diferentes sustratos y drogas siguiendo el protocolo de identificación bioquímica recomendado, como parte de una tarea de referencia que lleva nuestro laboratorio.

Las pruebas realizadas fueron: temperatura de crecimiento, producción de pigmento, tiempo de crecimiento, nitrataza, catalasa 68°C, catalasa vertical, ureasa, pirazidamida, arilsulfatasa, lipasa, niacina, telurito de potasio, crecimiento en agar, ácido pícrico, resistencia a la hidracida del ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH), al ácido paranitrobenzoico (PNB), a la hidroxilamina (HA), y a la isoniacida (INH), tolerancia al NaCl 5% y captación de hierro Fe. Las cepas fueron identificadas utilizando las tablas de identificación propuestas por el propio protocolo.

Varios han sido los protocolos de pruebas utilizadas en los laboratorios de Micobacteriología para la identificación fenotípica y bioquímica de especies micobacterianas; en nuestro caso se utilizó un esquema de 19 pruebas, como parte de un protocolo perteneciente a un proyecto internacional. Este esquema bioquímico de identificación se crea con el objetivo de tratar de lograr un algoritmo de trabajo homogéneo para los Laboratorios Nacionales de Referencia de Latinoamérica con el fin a poder realizar, en un futuro, estudios que garanticen la calidad del diagnóstico de las especies micobacterianas [4].

Para la extracción de las fracciones de ácidos micólicos se utilizó como proceso de liberación y esterificación la metanólisis ácida recomendada en la literatura [5-8]. La biomasa micobacteriana se somete a extracción con cloroformo-metanol (1:1 v/v) a temperatura ambiente durante 18 horas, se desecha el sobrenadante, posteriormente a la biomasa se le adicionó 4 mL de una mezcla de metanol-tolueno-ácido sulfúrico (30:15:1 v/v/v), esta mezcla se puso a 75 °C durante 18 horas, posteriormente se neutraliza para eliminar el exceso de ácido presente. Las fracciones de ácidos micólicos fueron extraídas con hexano, finalmente a este extracto se le aplica la técnica de cromatografía en capa delgada bidimensional.

Resultados y Discusión

Nuestro trabajo consistió en la identificación de 40 cepas micobacterianas aisladas de pacientes VIH+, utilizando el protocolo de identificación bioquímica recomendado [4].

Las cepas estudiadas e identificadas fueron: *M. avium* 9 cepas (22,5%), *M. fortuitum* 8 cepas (20%), *M. flavescens* 4 cepas (10%), *M. smegmatis* 4 cepas (10%), *M. marinum* 3 cepas (7,5%), *M. gastri* 4 cepas (10%), *M. gordonae* 2 cepas (5%), *M. chelonae* 2 cepas (5%), *M. xenopi* 1 cepa (2,5%), *M. phlei* 1 cepa (2,5%), *M. triviale* 1 cepa (2,5) y *M. malmoense* 1 cepa (2,5%).

En Cuba, Valdivia, JA y Ferrá, C realizaron estudios con el propósito de conocer la circulación de MNT a nivel nacional utilizando 12 pruebas de identificación y encontraron que el mayor porcentaje de aislamientos correspondía a las especies *M. fortuitum* y *M. avium*. Más recientemente Paneque A, obtiene resultados similares en un estudio incluye la identificación de 50 cepas procedentes de los diferentes Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE) del país. Los estudios anteriormente descritos no incluyeron cepas aisladas de pacientes VIH+ [9,10].

Nuestros resultados infieren el mayor número de aislamientos de *M. avium*, coincidiendo con lo descrito anteriormente. En la literatura internacional se mantienen a *M. avium* y *M. fortuitum* como las especies micobacterianas de mayor incidencia de aislamiento en humanos, principalmente en pacientes inmunocomprometidos y las que más se asocian a casos de micobacteriosis intra y extrapulmonares, aunque específicamente en estos pacientes como grupo de riesgo, se han encontrado otras especies micobacterianas asociadas a diferentes patologías [11-18].

La identificación micobacteriana es compleja, hasta el momento la utilización de protocolos de identificación con pruebas fenotípicas y bioquímicas no ha podido ser sustituida. Diferentes investigadores han recomendado la combinación de técnicas alternativas diagnósticas como el estudio de lípidos por técnicas cromatográficas y la utilización de técnicas moleculares, comparando estos tres métodos de identificación micobacteriana se podría llegar a un diagnóstico más certero, resultado muy importante para la oportuna administración al paciente de una terapia correcta [19,20].

Solamente a las cepas aisladas con criterio de implicación clínica se le aplicó como técnica confirmativa diagnóstica, el estudio de los patrones de las fracciones de ácidos micólicos micobacterianos, éstos fueron analizados empleando la técnica de cromatografía en capa delgada bidimensional [5-8].

Sólo 5 de las 40 cepas aisladas presentaron implicación patológica: 2 *Mycobacterium avium* (micobacteriosis diseminada y renal respectivamente), 1 *Mycobacterium gordonae* (lesiones en piel), 1 *Mycobacterium fortuitum* (linfadenitis submaxilar), 1 *Mycobacterium malmoense* (linfadenitis submaxilar) [14-18].

Los resultados de los patrones obtenidos de estas cepas están reflejados en la Tabla 1.

Estos resultados nos permitieron realizar la confirmación diagnóstica de especie de estas cepas.

Los ácidos micólicos son ácidos grasos β -hidroxilados con cadena lateral larga en la posición alfa y son los componentes lipídicos mayoritarios de la pared celular micobacteriana. Difieren en el número de átomos de carbono y en la presencia de los diferentes grupos funcionales. El patrón de ácidos micólicos de la pared celular micobacteriana varía generalmente con la especie, por esta razón el análisis de estos compuestos tiene gran utilidad en la identificación de especies [6,8,19,20].

Tabla 1. Distribución de los tipos de ácidos micólicos reconocidos en las 5 cepas analizadas.

Especies	Tipos de ácidos micólicos						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
<i>M. avium</i>	+	-	-	+	-	+	-
<i>M. fortuitum</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>M. gordonae</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>M. malmoense</i>	+	+	-	-	-	+	-

Leyenda: I alfa-micolato; II alfa'-micolato; III metoxi-micolato; IV ceto-micolato; V epóxi-micolato; VI carboxi-micolato; VII w-1 metoxi-micolato.

Los distintos patrones de ácidos micólicos micobacterianos determinados por cromatografía en capa delgada unidimensional o bidimensional, surgen como consecuencia de la composición cualitativa de una especie determinada, y de las diferentes movilidades de cada uno de los componentes en los disolventes empleados en base a sus polaridades [5-8].

La aplicación de la técnica de cromatografía en capa delgada para el estudio de estas fracciones nos permiten la diferenciación de los diferentes tipos de ésteres de ácidos micólicos: tipo I α -micolato, tipo II α' -micolato, tipo III metoxi-micolato, tipo IV ceto-micolato, tipo V epoxi-micolato, tipo VI carboxi-micolato, tipo VII w-1 metoxi-micolato. El tipo I esta presente en todas las especies de micobacterias, el tipo II se encuentra en algunas especies principalmente las no pigmentadas de crecimiento rápido, los otros tipos de ácidos micólicos se distribuyen diferentemente entre las especies; la mayoría de las especies micobacterianas solamente presentan patrones de 2 o 3 tipos de ácidos micólicos. Dado el número limitado de tipos de ácidos micólicos, en ocasiones varias especies corresponden al mismo patrón por lo que es necesario auxiliarse del estudio de las pruebas de identificación bioquímica para complementar estos resultados [7,8,19,20].

El análisis de las fracciones de ácidos micólicos por CCD junto con las pruebas bioquímicas convencionales es otra herramienta confirmativa diagnóstica de mucho valor para la identificación micobacteriana, pues este procedimiento permite detectar e identificar la mayoría de especies usualmente aisladas de infecciones humanas. La determinación de ácidos micólicos por CCD es una técnica sencilla y útil para los primeros pasos de búsqueda en la identificación micobacteriana, junto con los métodos convencionales, los laboratorios de mayor recursos estudian estos patrones utilizando técnicas cromatográficas más complejas como son la cromatografía líquida de alta resolución HPLC; por estos estudios se ha detectado especies nuevas, e infecciones mixtas que no se detectan por las pruebas convencionales de identificación [20].

Recientemente Tortoli EM recomienda en su trabajo de taxonomía micobacteriana, que para lograr un estudio verdaderamente confiable no se debe discriminar ninguno de los métodos de identificación establecidos, con respecto a la identificación fenotípica-bioquímica. A pesar de que

algunos autores opinan que están en caducidad, estos métodos hasta el momento siguen teniendo un papel importante en el diagnóstico micobacteriano [7,8,20].

Por otra parte Mondragón M, en un estudio comparativo de tres métodos para la identificación micobacteriana (métodos convencionales, cromatográficos y moleculares), analizando costo-beneficio y proponiendo un algoritmo de identificación sugiere que se debe aplicar los tres métodos en el siguiente orden: Si las pruebas bioquímicas indican una micobacteria no tuberculosa, el aislado será analizado por métodos cromatográficos (CCD, HPLC, GLC), si la identificación no es clara, el aislado será sometido al análisis molecular (reacción en cadena de la polimerasa "PCR"), finalmente si el aislado no pertenece a ningún patrón descrito se identificará por secuenciación de ADN [19]. El uso de todas estas tecnologías dependerá de los recursos de cada laboratorio de micobacteriología.

Como observación final debemos decir que en los laboratorios de micobacteriología, no se deben desestimar este tipo de estudios, para, de esa manera, mantener la vigilancia de micobacterias no tuberculosas, pues evidentemente en la lucha contra las enfermedades ocasionadas por micobacterias, el laboratorio de microbiología juega un papel de primera importancia, tanto para registrar los enfermos como para controlar u orientar los tratamientos o bien, para proporcionar datos epidemiológicos de interés a las autoridades sanitarias.

Referencias

- Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelman GN Jr. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:2492-6.
- Brown-Elliott BA, Griffith De, Wallace RJ. New described emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin N Am* 2002; 16:187-220.
- Adle-Biassette H, Heurre M, Breton G, Ruimy R. Non tuberculous mycobacterial diseases. *Ann Pathol* 2003; 23:216-35.
- Cardoso S Biochemical Identification Protocol INCO-PRA, 2003.
- Valero-Guillén PL. A thin layer chromatographic method for separating methyl esters of mycobacterial mycolic acid. *Acta Pathol Microbiol Scand sect B* 1986; 94:373-6.
- Minnikin DE. Chemical principles in the organization of lipids components in the mycobacterial cell envelope. *Res Microbiol* 1991; 142:423-27.
- Fujimora-Leite CQ, Oliveira de Souza CW, Andrade-Leite SR. Identification of mycobacteria by thin layer chromatography análisis of mycolic acid and conventional biochemical methods: four years of experience. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:801-5.
- Walkiewicz R, Saflanowska A, Grubek-Jaworska H, Zalewska-Schonhaler N, Glapinski J, Chazan R. Use of mycolic acids analysis in diagnosis of tuberculosis and mycobacteriosis three-year experience. *Pneumonol Alergol Pol* 2002; 70:444-9.
- Valdivia JA, Ferrá C, Olivares E, Gutierrez AM. Micobacterias no tuberculosas en pacientes sintomáticos de Ciudad de La Habana. *Rev Cub Med Trop* 1985; 37:231-7.
- Ferrá C, Montoro E, Gutierrez AM, Valdivia JA, Jiménez CA. Estudio de micobacterias no tuberculosas aisladas en Cuba durante el período 1985-1989. *Rev Cub Med Trop* 1992; 44:205-7.
- Stephen K, Field MD, Fisher D, Cowie R L. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest* 2004; 126:566-81.
- Field SK, Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *Chest* 2006; 129:1653-72.
- Smith M B, Schnadig, V J, Boyars M C. *Mycobacterium fortuitum* infectious: an emerging pathogen in patients with AIDS. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 673-7.
- Mederos LM, Rodríguez F, Blanco F, Cabrera J, Echemendía M, Montoro EH. Micobacteriosis diseminada asociada al complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI) en paciente infectado por el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Cub Med Trop* 2003; 55:126-8.
- Mederos LM, Rodríguez F, Blanco F, Cabrera J, Echemendía M, Montoro EH. Reporte de *Mycobacterium avium-intracellulare* asociado a micobacteriosis renal. *Rev Cub Med Trop* 2003; 55:58-60.
- Mederos LM, Ruíz A, Valero-Guillén PL. Micobacteriosis en piel en paciente VIH+. *Rev Hosp. Nac Baldomero Sommer* 2000; 3:26-8.
- Mederos LM, González D, Pérez D, Paneque A, Montoro E. Linfadenitis causada por *Mycobacterium malmoeense* en paciente infectado con el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Chil Infect* 2004; 21:229-31.
- Mederos LM, González D, Banderas F, Montoro EH. Linfadenitis ulcerativa por *Mycobacterium fortuitum* en un paciente con SIDA. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2005; 23:573-7.
- Mondragón M, Vázquez CA, Barrón C, Acosta P, Balandrazo S, Olivera H. Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública de México* 2000;6: 484-9.
- Tortoli EM. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomic: the new mycobacteria of the 1990. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:319-54.