

Identificación de especies micobacterianas en Cuba

Lilian María Mederos^a, Aboubacar Sidiki Fofana^a, Ma. Angeles Perovan^b, Grechen García^a, Ernesto Hilario Montoro a Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micobacterias y Tuberculosis, Centro Colaborador OPS/OMS Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), La Habana, Cuba

Autor por correspondencia:

Lilian María Mederos Cuervo (e-mail: mederos@ipk.sld.cu)

Recibido: 04/06/2007

Aceptado: 10/08/2007

Resumen

El aumento de las infecciones producidas por micobacterias ambientales u oportunistas (MAO) coincide en muchos casos con el declive de la infección tuberculosa y el incremento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Sobre todo en los países desarrollados donde se está produciendo un aumento global de la incidencia de enfermedad por MAO, y las micobacteriosis principalmente en pacientes inmunodeficientes cada vez son más frecuentes.

En este trabajo se estudiaron 80 cepas recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de TB y Micobacterias procedentes de diferentes Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología, con el fin de conocer el comportamiento en nuestro país de las especies de interés clínico.

Encontramos que al clasificar las micobacterias aisladas según los grupos establecidos por Runyon los siguiente: los grupos con mayor frecuencia fueron el Grupo III y el Grupo IV, por especie las de mayor por ciento de aislamiento fueron: *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium malmoense*. Estos estudios son de gran utilidad en los laboratorios de Micobacteriología, pues de esta forma se puede llegar a conocer cuales son las especies predominantes en la población y poder establecer una eficaz vigilancia sobre este tipo de infecciones sobre todo en pacientes "inmunodeficientes", grupo más sensibles a estas infecciones.

Palabras claves: micobacterias ambientales u oportunistas (MAO), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), clasificación de Runyon.

Summary

The increase of environmental or opportunistic mycobacteria (EOM) infections is coincident in many cases with the decrease of tuberculosis infections and increase of human immunodeficient virus (HIV). Overall in developed countries where there is a global increase of EOM incidence and mycobacteriosis are more frequently mainly in immunodeficient patients.

Eighty strains received in the National Laboratory of Reference and Research for Tuberculosis from the different Epidemiology and Hygiene Provincial Centers were studied in order to know the species interesting in Cuba since clinical point of view.

The results shows mycobacterium species belonging to Group III and IV as more frequently isolated, they were *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium malmoense*

This study are useful in Mycobacteriology Laboratories since it is possible to know the predominant species in the population and to establish an efficacy Surveillance particularly in "immunodeficient" patients which are the most susceptible to these infection.

Key words: environmental or opportunistic mycobacterium (EOM), human immunodeficient virus (HIV), mycobacteriosis, Runyon's classification.

Introducción

La enfermedad infecciosa más antigua ocasionada por una micobacteria es la lepra, producida por el *Mycobacterium leprae*, con tratamiento largo y todavía hasta nuestros días con un diagnóstico muy precario, donde la visualización microscópica sigue siendo el método más habitual en la rutina clínico-diagnóstica. Sin embargo, la tuberculosis y las micobacteriosis son enfermedades que han tenido un gran desarrollo en sus técnicas para el diagnóstico, de la resistencia a fármacos antimicobacterianos o en las técnicas de tipificación con fines epidemiológicos^{1,2}.

Con el desarrollo de la pandemia desatada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la coinfección VIH/SIDA/TB

contribuyó a la aparición del fenómeno de resistencia múltiple a fármacos (MDR), esto ha provocado el llamado fenómeno de la reemergencia de la tuberculosis. Por su parte las micobacterias, es decir las enfermedades ocasionadas por micobacterias atípicas u oportunistas son cada día más frecuentes. Por lo que se puede afirmar que la infección por el VIH, ha creado el sustrato que ha conducido en estos últimos años, al aislamiento de numerosas nuevas especies micobacterianas^{3,4}.

Durante muchos años estas enfermedades denominadas "micobacteriosis", era sólo un hecho ocasional y casi anecdótico, la gran mayoría ligado a situaciones de pacientes

con algún tipo de inmunodeficiencia. Sin embargo, en los últimos 15 años ha pasado a ser una patología relativamente frecuente sobre todo condicionada a la aparición de la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA).⁵

El objetivo de este trabajo fue la clasificación e identificación de diferentes cepas recibidas en nuestro Laboratorio de Referencia, estos aislamientos fueron realizados a partir de muestras clínicas pulmonares y extrapulmonares procedentes de pacientes sintomáticos de diferentes provincias de nuestro país, con vistas a analizar su frecuencia de aislamiento según los diferentes grupos establecidos para la clasificación micobacteriana.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó en el período comprendido entre Enero-Diciembre 2006, en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de TB y Micobacterias (LNR-TB-Micobacterias) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), Ciudad de La Habana, Cuba.

Se identificaron 80 cepas procedentes de diferentes Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE). Todas las cepas fueron subcultivadas en medio Löwenstein-Jensen modificado (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. Nuestro esquema de identificación consistió en el análisis de diferentes pruebas de identificación y caracterización fenotípica, producción de pigmentos, tiempo de crecimiento, temperaturas, 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: temperaturas, pigmento, tiempo de crecimiento, nitrataza, catalasa 68°C, catalasa vertical, ureasa, pirazidamidas, arilsulfatasa, lipasa, niacina, telurito de potasio, crecimiento en agar, ác. pícrico, 2 Thiophen Carboxilic Hidrazide (TCH), Ac. p-nitrobenzoico (PNB), Hidroxilamina (HA), Isoniazida (INH), Cloruro de Sodio al 5% (NaCl 5%) y toma de hierro. Las cepas analizadas, fueron identificadas utilizando las tablas de identificación propuestas por el propio protocolo⁶.

Resultados y Discusión

En el **Cuadro 1**, se muestran los resultados obtenidos después de ser clasificadas e identificadas las 80 cepas micobacterianas analizadas en este estudio, en el LNR-TB-Micobacterias del IPK.

Observando los resultados obtenidos en este estudio podemos decir que las especies micobacterianas de importancia clínica encontradas en mayor frecuencia fueron: *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium flavescens*, y *Mycobacterium scrofulaceum*.

Cuadro 1. Especies identificadas en este estudio

Especie micobacteriana	No. De cepas identificadas
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	15
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	11
<i>Mycobacterium chelonae</i>	10
<i>Mycobacterium malmoense</i>	8
<i>Mycobacterium kansasii</i>	6
<i>Mycobacterium flavescens</i>	5
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	5
<i>Mycobacterium gordonae</i>	3
<i>Mycobacterium gastris</i>	3
<i>Mycobacterium xenopi</i>	2
<i>Mycobacterium triviale</i>	2
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	2
<i>Mycobacterium marinum</i>	2
<i>Mycobacterium terrae</i>	2
<i>Mycobacterium abscessus</i>	2
<i>Mycobacterium vaccae</i>	1
<i>Mycobacterium bovis</i>	1
Total	80

Si analizamos los resultados obtenidos según clasificación propuesta por Runyon, se puede observar que el por ciento más elevado correspondió a las especies pertenecientes al **Grupo III**, con un 38.7% (31 cepas) dentro de este grupo la especie predominante fue *Mycobacterium avium-intracellulare* (15 cepas) para un 18.7%, le sigue *Mycobacterium malmoense* (8 cepas) con un 10%, continúa *Mycobacterium gastris* (3 cepas) y *Mycobacterium haemophilum* (3 cepas) con un 3.7%, y *Mycobacterium triviale* y *Mycobacterium terrae* (2 cepas respectivamente) con un 2.5%. En el **Grupo IV** con un total de 26 cepas para un 32.5% la especie predominante fue *Mycobacterium fortuitum* (11 cepas) para un 13.7%, *Mycobacterium chelonae* (10 cepas) para un 12.5%, *Mycobacterium peregrinum* y *Mycobacterium abscessus* (dos cepas) con un 2.5% respectivamente y *Mycobacterium vaccae* (1 cepa) con 1.2%. Pertenecientes al **Grupo II** se identificaron 14 cepas para un 17.5%, dentro de este Grupo las especies encontradas fueron, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium flavescens* (5 cepas respectivamente) con 6.5%, *Mycobacterium gordonae* (3 cepas) para un 3.7%, y *Mycobacterium xenopi* (1 cepa) para un 1.25%, finalmente la incidencia más baja encontrada fue en el **Grupo I** con 9 cepas identificadas para un 11.2%, las especies encontradas fueron *Mycobacterium kansasii* (6 cepas) para un 7.5%, *Mycobacterium marinum* (2 cepas) para un 2.5% y *Mycobacterium bovis* (1 cepa) para un 1.2%, estos resultados están reflejados en el **Gráfico #1** y **Gráfico #2**, donde los resultados se muestran en porcentaje con respecto a los Grupos establecidos para la clasificación micobacteriana y por el porcentaje de especies encontradas respectivamente.

Grafico #1. Por ciento encontrado según clasificación establecida Runyon

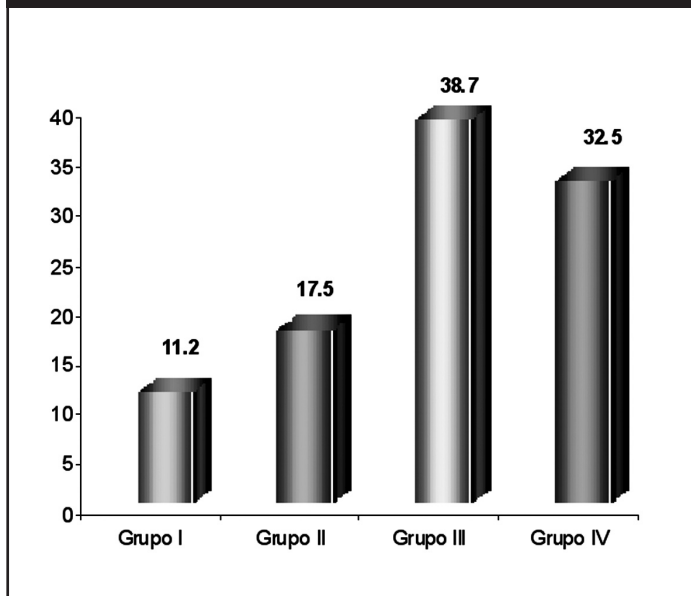
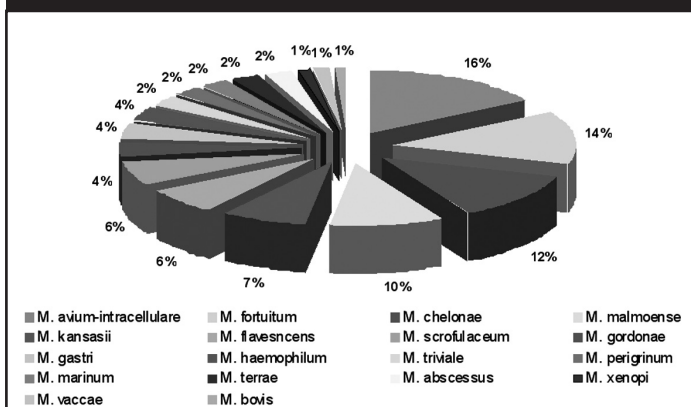


Grafico #2 Por ciento encontrado en base a las especies identificadas



Debemos decir que de las cepas analizadas para este estudio, 65 cepas para un 81.2% fueron muestras pulmonares (aislándose especies micobacterianas como: *M. avium intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. triviale*, *M. gastri*), o sea esputo o lavado bronquial, el resto, 15 cepas para un 18.7% fueron muestras extrapulmonares, líquido cefalorraquídeo, biopsia de ganglio, orina, hemocultivo y lesiones exudativas piel. (aislándose especies micobacterianas como: *M. gastri*, *M. marinum*, *M. vaccae*, *M. flavescens*, *M. scrofulaceum*, *M. terrae*, *M. bovis*, *M. malmoense*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. triviale*)

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 este esquema, como parte de la ejecución en el laboratorio 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 vistas a poder realizar en un futuro,

estudios de garantía de la calidad para el diagnóstico de las diferentes especies micobacterianas. Con la aplicación de este esquema de pruebas se logra determinar las características fenotípicas y bioquímicas más representativas para la identificación de especies de importancia clínica. Muchos laboratorios de Micobacteriología por escasez de recursos no pueden identificar hasta especie, sólo llegan a la clasificación establecida por Runyon en 1959, dato importante desde el punto de vista clínico, pues para cada Grupo ya se han establecido tratamientos específicos, aunque cuando sólo se puede llegar a esta clasificación no se puede conocer la prevalencia real de la enfermedad^{6,8}.

Los primeros estudios en Cuba se realizaron con el propósito de conocer la circulación de estos microorganismos en el país, las especies con mayor por ciento de aislamientos fueron *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium avium*. Nuestros resultados infieren que el mayor aislamiento correspondió a las especies pertenecientes al complejo *avium-intracellulare* coincidiendo con los descritos anteriormente^{9,10}.

En la literatura internacional se mantienen a *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium fortuitum* como las especies micobacterianas de mayor incidencia de aislamiento en humano principalmente en pacientes inmunocomprometidos y las especies que más se asocian a casos de micobacteriosis intra y extrapulmonares, aunque específicamente en estos pacientes como grupo de riesgo, se han encontrado también otras especies micobacterianas asociadas a diferentes patologías^{11,16}.

Se piensa que el aumento de las infecciones producidas por micobacterias atípicas, ambientales u oportunistas coincide con el incremento de la pandemia del SIDA, sobre todo en los países más desarrollados se está produciendo un aumento global de la incidencia de las micobacteriosis. Las infecciones producidas por *Mycobacterium kansasii* han cedido su espacio a las producidas por *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, del mismo modo se explica el incremento de las infecciones producidas por *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* y por micobacterias pertenecientes al Grupo IV de Runyon como son *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae*. Con respecto a las especies micobacterianas de crecimiento rápido, la frecuencia de micobacteriosis producidas por estos gérmenes en humano es mucho menor en comparación con las producidas por las especies de crecimiento lento, estas especies se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, de ahí la vía de contaminación al humano. Además estos gérmenes sobreviven en ausencia de nutrientes, resisten un amplio margen de temperatura y son resistentes a muchos desinfectantes clorados y al glutaraldehído, estos hechos contribuyen a explicar su presencia en diferentes ambientes hospitalarios causando algunos brotes epidémicos de infecciones nosocomiales, comprobados en algunos casos por epidemiología molecular. La mayoría de estas infecciones son a causa de inoculación post-traumática accidentalmente, por cirugía o inyección, para el caso de linfadenitis en niños lo más frecuente es ingestión por vía digestiva, la de mayor porcentaje de aislamiento ha sido *Mycobacterium fortuitum*^{8,13,17}.

Otras de las especies micobacterianas encontradas en este estudio con un porcentaje representativo fue *Mycobacterium*

malmoense, a pesar de que esta especie no tiene la misma frecuencia de aislamiento, los cuadros clínicos mayormente encontrados fueron los respiratorios, pero también se ha visto asociada a linfadenitis, principalmente en pacientes infectados por el VIH^{17,18}.

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.¹⁸⁻¹⁹.

Como observación final podemos decir que nuestros resultados concuerdan con los descritos por otros autores en la literatura internacional, estos estudios deben mantenerse en los Laboratorios de Micobacteriología, pues para poder enfrentar estas infecciones es necesario conocer las especies predominantes en la población. Además se debe poner especial interés a los aislamientos micobacterianos encontrados en el grupo de riesgo que constituyen los pacientes "inmunodeficientes", incluyendo los aislamientos de aquellas especies a las que generalmente no se les atribuye interés clínico, pues las consecuencias encontradas en este grupo de riesgo son muy complejas debido al deterioro inmunológico que presentan, pues los factores de riesgo, las características clínicas que presentan y la evolución de la enfermedad constituyen para estos pacientes una infección frecuente.

Referencias

1. Casal M, Casal MM. Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. *Enf Emerg* 2000;2:220-230.
2. Casal M. Las micobacteriosis como enfermedad emergente. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2000;18:55-58.
3. Casal M. Como denominar a las micobacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2003;21:296-298.
4. Casal M. Microbiología de las Enfermedades Infecciosas ocasionadas por Micobacterias. www.seimc.org/control/revi_Micobac/bkrev.html 08/12/2005.
5. Caminero JA. Micobacterias atípicas. *BSCP Can Ped* 2001;25:237-248.
6. Cardoso S. *Biochemical Identification Protocol INCO-PRA*, 2003.
7. American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by non tuberculous *Mycobacterium*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;56:526-551.
8. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NMT). *Indian J Med Res* 2004;120:290-304.
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;37:231-237.
10. Ferrá C, Montoro E, Gutierrez AM, Valdivia JA, Jiménez CA. Estudio de micobacterias no tuberculosas aisladas en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 1992;44:205-207.

11. Martín N, Roselló J, Grupo de Estudio sobre Micobacterias Ambientales. Micobacterias ambientales en España: aislamientos en el período 1976-1996. *Med Clin (Barc)* 2000;115:663-670.
12. Katoch VM, Mohan KT. Atypical mycobacterial infections. In: Sharma SK, editor. *Tuberculosis*, 1st ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd;2001:439-451.
13. Brown-Elliot B, Griffith D, Wallace R. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Clin Lab Med* 2002;22:911-925.
14. Mederos LM, González D, Banderas F, Montoro EH. Linfadenitis ulcerativa por *Mycobacterium fortuitum* en un paciente con sida. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2005;23:517-518.
15. Mederos LM, Frantz JL, Perovani MA, Sardiñas M, Montoro EH. Identificación de Micobacterias no tuberculosas en pacientes VIH/SIDA por métodos convencionales y de fracciones de ácidos micólicos. *RSVM* 2007;27:50-53.
16. Ausina V, Lonca J. *Mycobacterium fortuitum* y otras micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. www.seimc.org/control/revi_Micobac/pdf/mfortu.pdf 10/1/2007.
17. Mederos LM, González D, Pérez D, Paneque A, Montoro EH. Linfadenitis causada por *Mycobacterium malmoense* en paciente infectado con el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Chil Infect* 2004; 21:229-231.
18. Debrunner M, Salfinger M, Brandi O, Von Graenenitz A. Epidemiology and clinical significance of non-tuberculosis mycobacteria in patients negative for human immunodeficiency virus in Switzerland. *Clin Infect Dis* 1992;15:330-345.
19. Brown-Elliot BA, Griffith DE, Wallace RJ, Jr. Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin N Amer* 2002;16:187-220.