



Identificación de la formación de cordones de *Mycobacterium kansasii* e implicancia en la microbiología clínica

Identification of cords by *Mycobacterium kansasii* and its implications in clinical microbiology

Jesús Rojas Jaimes^{1,2,a} , Jorge Giraldo Chávez^{3,b} , Yudit Huyhua Flores^{3,c} , Tatiana Caceres Nakiche^{3,b} 

RESUMEN

Objetivos: Determinar si la formación de cordones ocurre en la microcolonias de *M. kansasii*. **Material y métodos:** Se sembraron en medio sólido 7H11, cuatro especies de micobacterias patógenas de alta prevalencia *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium neoaurum* y se evaluaron hasta por 21 días, realizando complementariamente las coloraciones Ziehl-Neelsen para cada una de ellas. Para observar la presencia de la formación de cordones en las microcolonias, se utilizó microscopía de fase invertida. **Resultados:** En todas las especies se observó a nivel de las microcolonias la formación de cordones, además se identificó la formación de cordones en etapa temprana por la coloración Ziehl-Nelsen en *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, y *Mycobacterium tuberculosis*. **Conclusiones:** *Mycobacterium kansasii* es capaz de desarrollar cordones a nivel microscópico, por lo que la premisa basada en la formación de cordones por *M. tuberculosis* como un patrón diferencial de las demás micobacterias deben ser tomadas con cautela.

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis, *Mycobacterium*, bacteria, enfermedad, virulencia

SUMMARY

Objectives: To determine if cord formation occurs in microcolonies of *M. kansasii*. **Methods:** Four species of highly prevalent pathogenic mycobacteria were seeded in the solid medium 7H11; *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium neoaurum* and observed for 21 days performing the Ziehl-Neelsen stain. Inverted light microscopy was used to detect cord formation. **Results:** All species produced cords, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium neoaurum* at earlier stages of their growth detected by Ziehl-Neelsen. **Conclusions:** *M. kansasii* is able to develop cords at microscopic levels indicating that this property is not distinctive of *M. tuberculosis* as was originally thought.

KEYWORDS: Tuberculosis, *Mycobacterium kansasii*, bacteria, disease, virulence.

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada del Norte

² Escuela de Medicina Humana, Universidad Científica del Sur. Lima, Perú

³ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Instituto de Enfermedades Tropicales Alexander von Humboldt. Lima, Perú

^a Magister en Biología Molecular

^b Biólogo

^c Técnica de Laboratorio

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades de amplia transmisión debido a la facilidad de contagio del *Mycobacterium tuberculosis* a través de la vía aérea mediante aerosoles, teniendo altas tasas de morbimortalidad en los países de alta endemia, siendo considerada esta enfermedad como una pandemia de importancia mundial. ⁽¹⁾

Es importante destacar que la identificación del tipo de micobacteria ya que el tratamiento antituberculoso puede ser específico dependiendo del agente causal ⁽²⁾. Algunas de las técnicas de identificación no son prácticas debido a que son demasiado complejas o de alto costo como los desarrollos de técnicas moleculares e inmunológicas para ser desarrollados en muchos centros hospitalarios donde no se destinan suficientes recursos económicos ^(3,4). El método “*microscopic-observation drug-susceptibility*” (MODS) que se creó en el Perú y se fundamenta en un cultivo líquido en placas y en la que se puede observar microcolonias mediante un microscopio de fase invertida en la que se destaca la formación típica de cordones de *M. tuberculosis* y en la que este método ha demostrado mayor sensibilidad y especificidad que los métodos automatizados BACTEC y Löwenstein-Jensen. ⁽⁵⁾

Existen diversos componentes bacterianos que nos indicarían diferencias en las colonias de los grupos de micobacterias como los ácidos grasos ⁽⁶⁾ que están vinculados a la forma de la colonia y la función de *Mycobacterium kansasii* ⁽⁷⁾. Cambios en *Mycobacterium abscessus* a nivel genético relacionado a la síntesis de la trehalosa 6,6– dimicolato se vincula a la formación de cordones, siendo reconocido como un factor de virulencia, resulta en el cambio morfológico de la colonia y al factor de poder colonizar y causar infección en modelos animales, donde se observó que las colonias crecieron en medio 7H11 en 7 días con una clara diferencia en la forma. ⁽⁸⁾

El objetivo de nuestro estudio fue determinar si la formación de cordones ocurre en la microcolonias de *M. kansasii*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Investigación microbiológica, prospectiva de corte transversal que se fundamenta en la identificación a nivel de colonia y celular a nivel microscópico de las especies de micobacterias que causan tuberculosis. Se utilizó la especie *M. kansasii* (CAP- College of American Pathologists) del cepario referencial del

Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Peruana Cayetano Heredia: También se trabajó con *M. abscessus* y *M. tuberculosis* (Cepa H37Rv ATCC) como cepas de crecimiento lento y controles de formación de cordones y *M. neoaurum* como una cepa control de crecimiento rápido. Las especies que se utilizaron estuvieron preservadas en medio indicador de crecimiento de micobacteria en tubo “MIGT”. Se tomó una alícuota del medio MIGT para cada especie ajustándolo a escala 5 de McFarland. Posteriormente se realizó una dilución 1/10 y se sembró en placas en medio sólido 7 H11.

Preparación de medio sólido 7H11 y siembra

El medio 7H11 fue preparado según método previamente descrito ⁽⁹⁾. Posteriormente se tomó 200 ul de la dilución 1/10 con una pipeta de 1 ml y se colocó en cinco puntos equidistantes en la placa de 7H11 y se homogenizó manualmente moviendo la placa en círculos concéntricos para que la siembra se extienda. Cada especie de micobacteria fue sembrada en tres placas para disponer de dos repeticiones por especie.

Lectura e interpretación

Las placas que se sembraron en el medio 7 H11 se colocaron a 37 C°, en una incubadora sin CO2 en el laboratorio de nivel III de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se realizó lectura con microscopio de fase invertida a un aumento de 100X diaria excepto sábados y domingos hasta por 21 días. Se empezó a fotografiar diariamente cada muestra de las especies estudiadas determinando sus características incluido la formación de cordones.

Tinción Ziehl Neelsen

Del tubo 5 de McFarland se colocó una alícuota de 50 ul aproximadamente y se extendió en una lámina portaobjeto limpia. Posteriormente se colocó fucsina fenicada sobre la muestra se calentó la muestra durante 5 minutos evitando que hierva y posteriormente se decoloró con alcohol ácido, se lavó y se adicionó el colorante de contraste azul de metileno por un minuto y se lavó para que finalmente la lámina seca pueda ser leída con un aumento total de 1000X. Se realizó el procedimiento por triplicado para cada especie de micobacteria. Se identificó la formación de cordones (agregación multicelular con disposición de cordones) o la formación de cadenas (agregación unicelular en continuidad) en bacterias alcohol ácido resistente tomadas del medio líquido debido a que los estudios primarios de la formación de cordones se han realizado en los medios líquidos por las propiedades físicas del medio para observar las tendencias de agregación.

COMUNICACIÓN CORTA / BRIEF REPORT

El estudio es de nivel básico sin involucrar animales y no fue derivado al comité de ética.

micobacterias estudiadas presentaron la presencia de cordones claramente marcado (figura 1).

RESULTADOS

La identificación microscópica de la primera colonia de las micobacterias en estudio fue entre el primero y catorceavo día (tabla 1). Todas las

Mediante coloración de Ziehl Neelsen, se observó la formación de cordones en *M. kansasii*, *M. abscessus*, y *M. tuberculosis* (figura 1), a comparación de la cepa control de crecimiento rápido *M. neoaurum* que no formó cordones y en contraste se observó bacilos unicelulares.

Tabla 1. Características microbiológicas de las micobacterias a 37 °C.

	Tiempo mínimo para la detección microscópica de las micobacterias en medio 7H11	Formación de cordón en medio 7H11 a nivel microscópico	Características macroscópicas de la colonia	Características de lectura Ziehl-Neelsen
<i>M. kansasii</i>	10 días	Si	Blanca, bordes irregulares y lisa	*Formación de cordones
<i>M. abscessus</i>	5 días	Si	Marfil, bordes irregulares y lisa	*Formación de cordones
<i>M. tuberculosis</i>	14 días	Si	Blanca, bordes irregulares y lisa	*Formación de cordones
<i>M. neoaurum</i>	1 día	No	Amarillas, lisas con borde regular	No formaron cordones

*Formación de cordones vistas en la lectura Ziehl-Neelsen

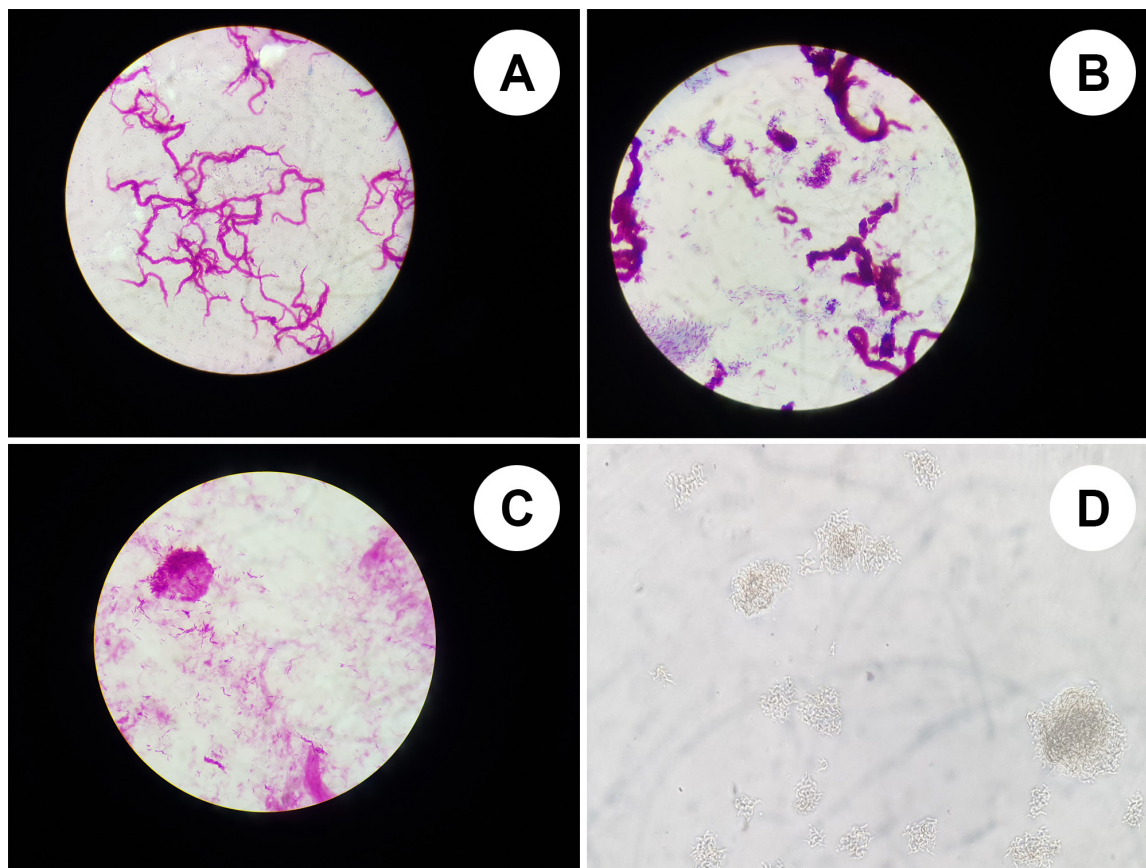


Figura 1. De izquierda a derecha hacia arriba (*M. tuberculosis* y *M. kansasii*) 1000X. De izquierda a derecha hacia abajo (*M. abscessus*) 1000X y microfotografía a los 14 días de crecimiento de *M. tuberculosis*, 100X. Todas las micobacterias tuvieron el mismo patrón en el medio solido 7H11.

DISCUSIÓN

El estudio realizado se basó en la investigación bacteriológica del tiempo de crecimiento y la forma de las microcolonias de diferentes especies de micobacterias patógenas (*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium neoaurum*) que pueden ser aisladas de muestras clínicas y en las cuales se pudo observar la formación de cordones⁽¹⁰⁾. En el estudio de las especies de micobacterias se encontró diferencias en cuanto al tiempo mínimo para la detección microscópica que varió entre uno y catorce días, lo que nos indica una detección temprana. Los resultados son relevantes porque identificó la formación de cordones a nivel microscópico en las especies evaluadas como en *M. abscessus* y *M. kansasii* aunque esto es particular de *M. tuberculosis* y se relaciona a los mecanismos de virulencia de la bacteria.⁽⁸⁾

Las características de agrupación celular en muestras teñidas con el método de Ziehl-Neelsen para cada colonia de *M. kansasii* y *M. tuberculosis* mostraron un patrón de bacilos agrupados formando una forma bien marcada de cordones, en los casos de *M. abscessus* formaban un agregado formando cordones finos y en el caso de *M. neoaurum* no se observó la formación de cordones.

Las micobacterias estudiadas formaron cordones en etapas tempranas en el medio 7H11. Esta particularidad de la formación de cordones fue reportada por primera vez por Robert Koch y se atribuye a una relación entre la virulencia y el fenotipo de *M. tuberculosis*⁽⁸⁾, posteriormente se descubrió la formación de cordones por *Mycobacterium abscessus*.⁽¹¹⁾

La relevancia clínica de estos hallazgos es que varias técnicas de diagnóstico para la tuberculosis como el MODS se basan en la identificación microscópica de los cordones relacionada con *M. tuberculosis*⁽⁹⁾, sin embargo, podría ser mal identificado cuando otra especie de micobacteria de crecimiento lento como *M. kansasii* también forma cordones en medio sólido como líquido como se corroboró en el medio 7H11 y por la técnica microscópica Ziehl-Neelsen (MIGT), pudiendo conducir a un mal diagnóstico, confundiendo a *M. kansasii* con *M. tuberculosis* suponiendo una identificación de *M. tuberculosis* multidrogo-resistente cuando se trataría de *M. kansasii* con resistencia natural a ciertas drogas antituberculosas, por lo que se haría necesario otro esquema terapéutico⁽¹²⁾. Se recomienda adicionalmente el uso del medio sólido 7H11 para

el aislamiento e identificación de resistencia a las drogas debido a que es de mejor bioseguridad que los medios líquidos y de corto tiempo de crecimiento de las micobacterias cuando se compara al MODS y al medio de Löwenstein-Jensen, respectivamente. Aunque estudios previos mostraron en *M. kansasii* la disposición bacilar para formar agregaciones como escaleras, nuestro estudio muestra claramente formación de cordones.^(13,14)

El cuadro clínico de la enfermedad pulmonar causada por *M. kansasii* en su mayoría es la presentación de la forma nodular bronquioectático, siendo además importante la identificación del agente etiológico que causa una enfermedad que requiere un tratamiento largo con un promedio de 15 meses.⁽¹⁵⁾

En este estudio se utilizó una metodología descrita previamente para determinar la formación de cordones tanto a nivel de microcolonias por microscopía de fase invertida como por microscopía óptica simple utilizando la tinción Ziehl-Neelsen.⁽¹⁶⁾

Una limitación del presente trabajo se basa en no haber realizado microscopía electrónica y observar la ultraestructura de agregación a nivel celular de las micobacterias. Aunque los hallazgos presentes son aportes para la salud pública.

Se concluye que *M. kansasii* fue capaz de formar cordones en una fase temprana.

Agradecimientos:

Al Dr. Carlton Evans del Imperial College London por el apoyo logístico al presente proyecto y a la Universidad Científica del Sur por su apoyo con el financiamiento del proyecto.

Declaración de financiamiento y de conflictos de interés:

El trabajo fue financiado por la Universidad Científica del Sur a través del área de investigación. Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Contribución de autoría:

JRJ: Participó en la concepción, recolección e interpretación de datos, así como en la revisión crítica del artículo y aprobación de la versión final. **JGC:** Participó en la interpretación de datos, así como en la revisión crítica del artículo y aprobación de la versión final. **YHF:** Participó en la recolección e interpretación

COMUNICACIÓN CORTA / BRIEF REPORT

de datos, así como en la aprobación de la versión final.
TCN: Participó en la recolección e interpretación de datos, así como en la aprobación de la versión final.

Correspondencia:

Jesús Rojas Jaimes
Av. El Sol 461, San Juan de Lurigancho 15434
Correo electrónico: jesus.rojas.jaimes@gmail.com
Número telefónico: 51 1 993638840

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palomino J, Leao S, Ritacco V. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care. Primera edición. Berlin: BourcillerKamps; 2007. (Citado el 18 de octubre del 2020) Disponible en: <http://pdf.flyingpublisher.com/tuberculosis2007.pdf>
2. Kremer K, Van Der Werf J, Au B, et al. Vaccine-induced Immunity Circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(2): 335–339. doi: 10.3201/eid1502.080795
3. Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, Demessie D, Lemma E. Evaluation of Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay (MODS) Detection of Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB). *J Clin Microbiol.* 2007; 45(4):1093-7. doi: 10.1128/JCM.01949-06
4. Moore D, Carlton A, Gilman R, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med.* 2006; 355(15):1539-50. doi: 10.1056/NEJMoa055524
5. Ernst J, Trevejo-Núñez G, Banaiee N. Genomics and the evolution, patogénesis and diagnosis of Tuberculosis. *J Clin Invest.* 2007; 117(7):1738-45. doi: 10.1172/JCI31810
6. Selvarangan R, Wu W, Nguyen T, et al. Characterization of a Novel Group of *Mycobacteria* and Proposal of *Mycobacterium sherrisii* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1):52-9. doi: 10.1128/jcm.42.1.52-59.2004
7. Fregnan G, Smith D, Randall H. Biological and Chemical Studies on mycobacteria relationship of colony morphology to mycoside content for *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium fortuitum*. *J Bacteriol.* 1961; 82(4):517-27. doi: 10.1128/JB.82.4.517-527.1961
8. Byrd T, Lyons R. Preliminary Characterization of a *Mycobacterium abscessus* Mutant in Human and Murine Models of Infection. *Infect Immun.* 1999; 67(9):4700-7. doi: 10.1128/IAI.67.9.4700-4707.1999
9. REMEL. Middlebrook 7H11 agar (Thin pour). Lenexa, Kansas, USA: REMEL; 2011. (Citado el 18 de octubre del 2020) Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU1606-PI.pdf>
10. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar.* 2007; 30(2):67-84.
11. Sánchez-Chardi A, Olivares F, Byrd T, Julián E, Brambilla E, Luquin M. Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(6):2293-5. doi: 10.1128/JCM.02322-10
12. Hee-Jae Huh, Su-Young Kim, Byung-Woo Jhun, Sung-Jae Shin, Won-Jung Koh. Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. *Meegid.* 2018; 72(1):1-71. doi:10.1016/j.meegid.2018.10.003
13. Attorri S, Dumbar S, Clarridge J. Assessment of Morphology for Rapid Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (4):1426–29.
14. Tu H, Chang S, Huaug T, Huaug W, Liu Y, lee S. Microscopic Morphology in Smears Prepared from MGIT Broth Medium for Rapid Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium kansasii*. *Ann Clin Lab Sci.* 2003; 33(2):179-83.
15. Moon SM, Park HY, Jeon K, im S-Y, Chung MJ, Huh HJ, et al. Clinical Significance of *Mycobacterium kansasii* Isolates from Respiratory Specimens. *PLoS ONE.* 2015; 10(10): e0139621. doi: 10.1371/journal.pone.0139621
16. Rojas Jaimes J, Giraldo-Chavez J, Huyhua-Flores Y, Caceres-Nakiche T. Identificación de micobacterias en medio solido mediante microscopía de fase invertida y tinción Ziehl-Neelsen. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2018; 35(2):279-84. doi:10.17843/rpmpesp.2018.352.3471.

Recibido: 31/10/2020

Aceptado: 07/07/2022