

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Análisis cromatográfico de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de un brote en pacientes VIH en Cuba

Lic. Lilian M. Mederos,¹ Lic. Yovany Quiñones,² Dr. Aroldo Ruiz,³ Lic. Ileana Teja⁴ y Dr. José A. Valdivia⁵

RESUMEN

Se realiza el estudio mediante técnicas cromatográficas, de un grupo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de un brote en pacientes infectados con el virus VIH. Se utilizaron como referencia un grupo de cepas de *M. tuberculosis* de pacientes sintomáticos respiratorios (SR+14) y cepas patrones de la colección del laboratorio, con el objetivo de comparar cualitativamente los patrones cromatográficos descritos por las cepas aisladas de pacientes. Se obtuvieron y compararon los perfiles cromatográficos de las cepas aisladas de pacientes (ST+) y de VIH+ por la técnica de cromatografía en capa delgada. Se identificó cada uno de los ácidos grasos presentes por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Todas las cepas estudiadas fueron clasificadas como *Mycobacterium tuberculosis*. Por resultados obtenidos se demuestra la utilidad de las técnicas cromatográficas como técnicas alternativas para el diagnóstico micobacteriano.

Descriptores DeCS: MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS/aislamiento & purificación; CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA/métodos; ESPECTROMETRIA DE MASA/métodos; CROMATOGRAFIA DE GASES/métodos; SEROPOSITIVIDAD PARA VIH; ACIDOS GRASOS/análisis; CUBA.

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas y ha sido una de las más estudiadas, no sólo por su gran incidencia en la población sino por afectar frecuentemente en la edad de mayor productividad.¹ En fecha reciente la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la tuberculosis constituye un problema de salud mundial.²

En nuestro país a partir de 1970, se organizó un Programa de Lucha Contra la Tuberculosis que ha reducido el índice de morbilidad y mortalidad del país, sin embargo, es significativo en estos últimos años el aumento que ha sufrido la incidencia de esta enfermedad, esto se confirma al comparar la tasa de incidencia de 1993 (7,53/100 000) con la de 1996 (14,3/100 000) (Departamento de Estadística del Ministerio de Salud Pública, Cuba, 1997).

A todo este evidente problema de salud está asociado la explosión mundial del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), cada vez son más los casos reportados de micobacteriosis por *M. tuberculosis* u otras micobacterias en pacientes con esta enfermedad lo que impone un estudio detallado de estos microorganismos, pues se ha considerado que es la segunda causa de muerte de estos pacientes inmunocomprometidos.³⁻⁵

Por la importancia clínica epidemiológica del género *Mycobacterium* en humanos y animales, y la dificultad para la clasificación mediante el empleo solo de las técnicas convencionales, culturales y bioquímicas, se han introducido y desarrollado nuevas técnicas, ejemplo de éstas son las técnicas cromatográficas, que unidas a las bacteriológicas convencionales han permitido estudiar más integralmente este género.⁶⁻¹¹

¹ Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

² Licenciada en Bioquímica.

³ Especialista de II Grado en Medicina Interna.

⁴ Licenciada en Microbiología.

⁵ Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Jefe del Laboratorio Nacional de Referencias a Investigaciones de Micobacterias y Tuberculosis.

El objetivo de este trabajo es realizar el estudio de un grupo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas del primer brote en pacientes infectados con el virus VIH y un grupo de cepas aisladas de pacientes (SR+14), mediante las técnicas de cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía gas-masas (GC) por el método referido por Knisley y otros, para comparar si los patrones cromatográficos descritos por estas cepas coinciden con el descrito por la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, pues algunos autores describen el Complejo tuberculosis formado por *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*. Esto es de gran interés pues es importante conocer si la cepa circulante en nuestros pacientes pertenecía a la especie *M. tuberculosis*; se escogió específicamente este método pues discrimina por cromatografía al *M. tuberculosis* del *M. bovis*.⁶ También se puede comprobar de esta forma si la cepa circulante en los pacientes SR+14 era la misma que circuló en los pacientes VIH.

MÉTODOS

Se analizaron 29 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes sintomáticos respiratorios, 25 de las cuales son aisladas de pacientes inmunocomprometidos y 4 de *M. tuberculosis* obtenidos de sintomáticos respiratorios (SR+14), todas de la colección del Laboratorio Nacional de Referencias e Investigaciones de Micobacterias y Tuberculosis del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Se utilizó como patrón de referencia la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Las cepas fueron cultivadas en medio UIT-L durante un período de 3 a 4 semanas a 37 °C.¹² El método de extracción utilizado fue el descrito por Knisley y otros.⁶

CONDICIONES UTILIZADAS PARA LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA

Se utilizaron placas de Silica Gel G (Merck) de 20 x 10 cm, la combinación de solventes empleados para la separación fue hexano-dietiléter (78:22 v/v), se aplica la corrida cromatográfica en forma unidimensional, las fracciones separadas en las placas son reveladas con dicromato de potasio al 6 % en ácido sulfúrico al 55 %, posteriormente las placas se calientan a 150 °C de 15 a 20 min, para observar los perfiles cromatográficos de cada cepa en estudio.

CONDICIONES UTILIZADAS PARA LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

Las muestras una vez metiladas se disolvieron en 100 µL de MSTFA, se calentaron a 60 °C durante 15 min, luego se espera a que tomen temperatura ambiente y se

inyectan 2 µL de dicha solución en el cromatógrafo, el tiempo de corrida fue de 30 min. El equipo utilizado fue el MD 800 (Fisons Instruments, Milano, Italia), se empleó una columna capilar de fused sílica OV-17, 25 m x 0,32 mm di.

El programa de temperatura utilizado fue 100 °C (10 °C/min final). La temperatura utilizada en el inyector y detector fue de 320 °C, el gas portador fue helio.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos al aplicar las técnicas de CCD y GC se muestran en las figuras 1 y 2.

En la figura 1 se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos, por la técnica de cromatografía en capa delgada, de la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, 25 cepas aisladas de pacientes VIH+ y 4 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes (SR+14). Todas las cepas habían sido identificadas por métodos convencionales como *M. tuberculosis*.

Observando dichos resultados y analizándolos de forma cualitativa podemos afirmar que todos los patrones cromatográficos coinciden desde los compuestos de menor polaridad hasta los de mayor polaridad, además coinciden en cuanto a forma de la mancha, color y relación frontal (Rf). Por los resultados obtenidos podemos afirmar que todo el grupo de cepas aisladas

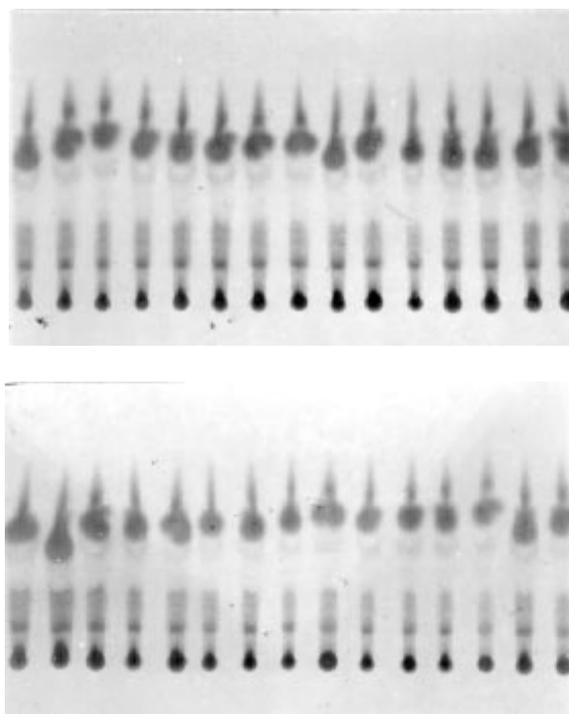


Fig.1. Cromatogramas (CCD) de las cepas aisladas de pacientes, de izquierda a derecha: *M. tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia), cepas de pacientes HIV+ (25) y cepas de (SR + 14); fase móvil: hexano- dietiléter (78:22 v/v), revelador: dicromato de potasio al 0,6 % en ácido sulfúrico al 55 %.

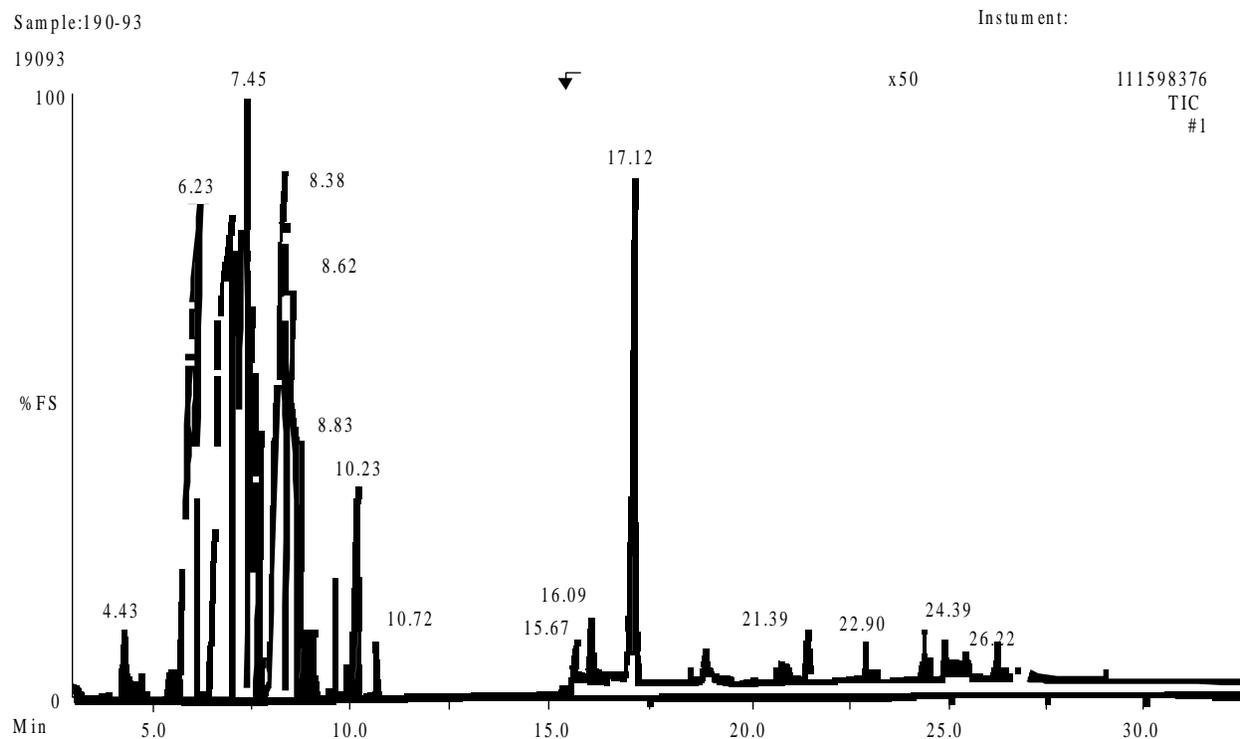


Fig.2. Resultados obtenidos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

de pacientes seleccionadas para este estudio fueron clasificadas por CCD como *M. tuberculosis*, lo que demuestra una vez más la especificidad de esta técnica cromatográfica.

Al obtener los resultados por CCD mediante el método anteriormente descrito, quisimos emplear la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, pues con esta técnica podemos identificar cada uno de los ácidos grasos presentes en dicha especie. Los resultados obtenidos aparecen en la figura 2.

Todas las cepas estudiadas presentaron el mismo perfil cromatográfico descrito en la figura anterior, cada uno de los ácidos grasos presentes fueron identificados. Cada ácido graso presentó un tiempo de retención definido (tabla), se destacan la alta concentración de ácido hexacosanoico (C:26:0) con concentración característica y posición definida, y la baja concentración del ácido tetracosanoico (C 24:0), esto fue un factor determinante a la hora de caracterizar al *M. tuberculosis*.

TABLA. Tiempo de retención de los ácidos grasos identificados

Tiempo de retención	Átomos de carbono	Compuestos identificados
6.23	14:0	Ácido mirístico, 3 hidroxi-éster
7.07	16:0	Ácido palmítico
7.45	18:1	9-Ácido octadecenoico metil-éster
7.58	18:0	Ácido octadecanoico
7.80	18:0	Ácido octadecanoico 10-metil-éster (Éster metílico del ácido tubérculo-esteárico)
8.38	18:1	Ácido oleico
8.62	18:0	Ácido esteárico
8.83	19:0	Ácido nonadecanoico
10:23		Ácido linoleico
10:72	20:0	Ácido docosanoico
15.67	24:1	Ácido nervonaico
16.09	24:0	Ácido tetracosanoico
17.12	26:0	Ácido hexacosanoico
19.44	28:0	Ácido octacosanoico

Además, la abundancia relativa de los ácidos de 18 átomos de carbono, constituye una forma importante de diferenciación entre especies micobacterianas, debido a la repetibilidad de dicha composición, cosa característica del género *Mycobacterium* y en particular del *M. tuberculosis*. Los tiempos de retención de estos ácidos grasos aparecen entre los 7 y 9 min en el cromatograma. Por todo lo antes expuesto se pudo clasificar a las cepas analizadas en nuestro estudio por las 2 técnicas cromatográficas como *M. tuberculosis*.

DISCUSIÓN

Al analizar y comparar los resultados obtenidos con los de otros autores, específicamente con los descritos por Knisley y otros,⁶ se puede comprobar el valor que tiene su método de extracción y la utilización de estas 2 técnicas aplicadas de forma simultánea para la clasificación de especies micobacterianas, en este caso específico para la especie *Mycobacterium tuberculosis*. Además, al aplicar la cromatografía gasmática, se obtiene la gran ventaja de identificar cada uno de los ácidos grasos presentes en cada especie micobacteriana.

En 1979, Tisdall y otros recomiendan la fusión de éstas técnicas para la identificación y clasificación de especies en el género *Mycobacterium*.¹³ Knisley y otros en 1985, reafirman su teoría y emplean las 2 técnicas en la clasificación de 14 especies de micobacterias, y describen un método rápido y sensible para la identificación de dichos microorganismos. Además, Knisley recomienda éste para diferenciar específicamente las especies *M. tuberculosis* y *M. bovis BCG*. La actualidad de este método lo describen Yassin y Bloom al emplear la misma metodología para diferenciar especies dentro de este género microbiano.^{8,11}

Coincidimos con los autores cuando recomiendan la utilización de estas técnicas para propósitos clínicos, como herramienta alternativa diagnóstica, ya que ellas dan un alto grado de precisión en la identificación de especies micobacterianas.⁶⁻¹⁰

SUMMARY

A group of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from an outbreak in HIV-infected patients was studied by chromatographic techniques. A group of strains of *M. Tuberculosis* from symptomatic respiratory patients (SR + 14) and patterns strains from the laboratory collection were used as a reference aimed at making a qualitative comparison of the

chromatographic patterns described by the strains isolated from patients. The chromatographic profiles of the strains isolated from patients (SR +) and from HIV + were obtained and compared by thin layer chromatography (TLC). Each of the present fatty acids was identified by using the gas chromatography technique (GC) coupled to mass spectrum analysis. All the studied strains were classified as *Mycobacterium tuberculosis*. According to the results attained, the usefulness of the chromatographic techniques as alternative techniques for the mycobacterial diagnosis is demonstrated.

Subject headings: MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS/isolation & purification; CHROMATOGRAPHY, THIN LAYER/methods; SPECTRUM ANALYSIS, MASS/methods; CHROMATOGRAPHY, GAS/methods; HIV SEROPOSITIVITY; FATTY ACIDS/analysis; CUBA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koch R. La etiología de la tuberculosis. Bol Unión Internac Contra Tuberculosis 1982;56:95-110.
2. OPS. Enfermedades y daños a la salud. Las condiciones de salud en las Américas. 1994;549(1):141-280.
3. Cumberworth VL, Robinson AC. Mycobacterium avium-intracellular cervical lymphadenitis in sibling: a case report and review. J Laryngol Otol 1995;109(1):70-1.
4. Friedman AW, Ike RW. Mycobacterium kansasii septic arthritis in a patient with AIDS. Arthritis Rheum 1993;36(11):1631-2.
5. Kaptue L. HIV and economic crisis in Cameroon. TB HIV SidAlerte Internationale, 1994;4:11.
6. Knisley CV, Damato JJ, McClatchy, Brennan PJ. Rapid and sensitive identification of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 1985;22:761-7.
7. Yassin A, Binder C, Schaal KP. Identification of mycobacterial isolates by thin-layer and capillary gas liquid chromatography under diagnostic routine conditions. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infec Dis 1993;278:621-6.
8. Hines ME, Frazier KS. Differentiation of mycobacteria on the basis of chemotype profiles using matrix solid-phase dispersion and thin-layer chromatography. J Clin Microbiol 1993;31:610-4.
9. Thibert L, Lapiere S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1993;31:1759-63.
10. Bloom R. Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. Bloom BR, PhD, ed. Washington DC: Asm, 1994.
11. Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Córdoba: Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, 1990.
12. Mederos LM, Gutiérrez AM, Valdivia JA. Utilization of new culture medium in test for the mycobacteria classification. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992;87:91.
13. Tisdall PA, Roberts GD, Anhalat JP. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas liquid chromatography alone. J Clin Microbiol 1979;10:506-14.

Recibido: 5 de abril de 1997. Aprobado: 25 de noviembre de 1997.

Lic. Lilian M. Mederos. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.