

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Rhodococcus equi en paciente VIH/sida: primera detección molecular en Cuba

Lic. Daniel Salazar Rodríguez,¹ Téc. Teresa Migdalia Reyes,¹ MSc. Francisco Rodríguez Delgado,¹ MSc. Francisco Bandera Tirado,¹ MSc. Angélica Reyes Pérez,¹ Lic. Vilma Z. Medina Almenares,¹ Dr. C. Jacobus H. de Waard,² MSc. Yaxsier de Armas Rodríguez¹

RESUMEN

Introducción: *Rhodococcus equi* es reconocido como un patógeno emergente que causa importante morbilidad y mortalidad entre los pacientes inmunocomprometidos. **Objetivo:** confirmar la presencia de *R. equi* en líquido pleural mediante la técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. **Métodos:** se empleó muestra de líquido pleural de un paciente sida con síntomas respiratorios. Se realizaron cultivos microbiológicos, pruebas de tinción, fenotípicas, bioquímicas y la técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción para el diagnóstico del microorganismo. **Resultados:** las técnicas de tinción, fenotípicas y bioquímicas brindaron un diagnóstico sugestivo de infección por *R. equi*, el cual fue confirmado por las técnicas moleculares utilizadas. **Conclusiones:** este trabajo reporta la detección molecular, por primera vez en Cuba, de *R. equi* en paciente VIH/sida. Los resultados obtenidos permiten sugerir que técnicas de biología molecular pueden ser aplicadas en el diagnóstico y la identificación de *R. equi*.

Palabras clave: *Rhodococcus equi*, reacción en cadena de la polimerasa, sida, VIH.

INTRODUCCIÓN

Rhodococcus equi es un cocobacilo aerobio, grampositivo, intracelular, no móvil y débilmente ácido alcohol-resistente, denominado antes *Corynebacterium equi*.¹ Este microorganismo está ubicado actualmente dentro del orden Actinomycetales, en el cual están incluidas otras especies bacterianas de importancia médica de los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Gordona*.²

El género *Rhodococcus* fue descrito por primera vez por Zopf en 1891 y cuenta con 30 especies, de las cuales *R. equi* es considerado el patógeno oportunista más importante en los animales, incluido el hombre. El primer caso de infección en

humanos fue reportado en 1967 y en la actualidad existen más de 200 casos descritos.³ En los últimos años, este microorganismo ha emergido como un importante patógeno asociado a infecciones pulmonares, sistémicas e invasivas en pacientes inmunocomprometidos.¹

Recientemente, Silva y otros encontraron 9,3 % de infección por *R. equi* en 546 pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar. Estos autores plantearon que este patógeno no es tan infrecuente y sugirieron la posible identificación de *R. equi* en muestras respiratorias de pacientes con sospecha de tuberculosis/VIH.² Este microorganismo en muy raras ocasiones infecta a individuos inmunocompetentes, sin embargo, puede causar la muerte hasta en 55 % de pacientes infectados por el VIH/sida.⁴

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

² Instituto de Biomedicina de Caracas. Venezuela.

La adecuada y definitiva identificación del microorganismo requiere de una batería de métodos bioquímicos y enzimáticos, que en muchas ocasiones no están disponibles en los laboratorios de microbiología clínica.⁵ *Heidmann* y otros plantean la importancia del cultivo del patógeno a partir de lavados transtraqueales y la posterior identificación por métodos citológicos y moleculares.⁶ Entre estos últimos, aquellos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, sigla en inglés) y en el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, sigla en inglés) muestran excelentes resultados para la identificación de *R. equi*.^{7,8}

Este trabajo tiene como objetivo confirmar la presencia de *R. equi* en líquido pleural mediante la técnica de RFLP.

MÉTODOS

Paciente: VIH/sida ingresado en el Hospital del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" por presentar síntomas respiratorios bajos con interposición líquida.

Muestra y condiciones de cultivo: el líquido pleural se inoculó en medio agar sangre (Biocen, Cuba) enriquecido con sangre de carnero 5 %, agar MacConkey (Biocen). Los medios inoculados se incubaron a 35 °C durante 24-48 h. Posteriormente, el medio agar sangre fue incubado a temperatura ambiente (TA) por 5 d adicionales. Una vez concluida la incubación, se realizó la lectura y a continuación la tinción de Gram, observación microscópica y pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas: se realizó la hidrólisis de la esculina, citocromo oxidasa, catalasa, ureasa y factor equi según lo descrito por *Prescott* en 1991.⁹

Extracción de ADN: una azada del cultivo del líquido pleural proveniente del paciente se introdujo en un vial estéril de 1,5 mL, al cual se le adicionó 400 µL de agua destilada estéril. Posteriormente, el contenido se incubó a 80 °C por 15 min en un baño termostático.⁸ El homogenizado obtenido de la ruptura celular fue utilizado para la PCR.

PCR: se amplificó un fragmento de 439 pares de base (pb) del gen que codifica para la proteína de choque térmico de 65 kDa (HSP) del género *Mycobacterium* conservada en microorganismos

del orden Actinomycetales.⁸ Se tomaron 5 µL del homogenizado previamente obtenido y se le adicionaron 45 µL de volumen de reacción de amplificación que contenía: Tris/HCl (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, desoxirribonucleótidos (dNTP) 200 µM, cebadores TB11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') y TB12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') 0,4 µM, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido). El perfil de amplificación se llevó a cabo según lo descrito por *Steingrube* y otros.⁸

Para la detección de los productos amplificados se analizaron 12 µL de cada mezcla resultante mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con solución reguladora de Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris, 89 mM Borato, 2mM EDTA). La electroforesis se realizó a 80 V por 1 h. Los resultados se visualizaron en un transiluminador ultravioleta (Macrovue 2011, LKB, Suecia) y luego se fotografiaron con una cámara digital Power Shot G6 (Cannon, Japón).

En las reacciones de amplificación se empleó como control positivo ADN extraído del cultivo de una cepa de *M. tuberculosis* (H₃₇Rv) y agua destilada estéril como control negativo.

PCR-RFLP: los productos de la PCR se dividieron en 2 alícuotas, que fueron utilizadas para el análisis de los patrones de restricción con las enzimas *BstE* II (New England Biolabs, Reino Unido) y *Hinf* I (New England Biolabs, Reino Unido). Las condiciones del análisis de restricción y del resto del protocolo se llevó a cabo según lo descrito por *Steingrube* y otros.⁸

RESULTADOS

Después de 24 h de inocular el líquido pleural del paciente en el medio agar MacConkey no se obtuvo ningún crecimiento bacteriano. En el medio agar sangre se observó un crecimiento de colonias de 1-2 mm de diámetro, las cuales fueron indistinguibles. A las 48 h de incubación de la muestra, se observaron colonias redondas, con apariencia irregular, lisas, semitransparentes, brillantes, mucoides, y unidas. Luego de 5 d de incubación a temperatura ambiente, las colonias variaron de tamaño (2-4 mm de diámetro) y mostraron un pigmento color salmón. Cuando se realizó la tinción

de Gram, esta mostró cocobacilos, grampositivos y pleomórficos.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas al cultivo del líquido pleural se muestran en la tabla. El análisis en su conjunto, sugiere una posible infección por *R. equi* en el paciente analizado. Sin embargo, un elemento esencial y confirmatorio para demostrar la infección por este microorganismo es la presencia del factor equi, el cual resultó negativo en la muestra analizada. Para demostrar la presencia de *R. equi* en el material estudiado, se requirió de un proceder adicional, la utilización de métodos moleculares.

Tabla. Reacciones bioquímicas para la identificación presuntiva de *R. equi*.

Prueba bioquímica	Reacción
Hidrólisis esculina	+
Catalasa	+
Citocromo oxidasa	-
Ureasa	+
Factor equi	-

+: positivo, -: negativo

La PCR del fragmento de 439 pb del gen que codifica para la proteína HSP fue exitosamente amplificada a partir del cultivo del líquido pleural del paciente. Este resultado no es concluyente de infección por *R. equi*, porque solo brinda información de que el microorganismo pertenece al orden Actinomycetales. Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron la presencia de *R. equi* cuando se realizó la restricción enzimática empleando las enzimas *BstE* II y *Hinf* I al producto de PCR. En la muestra analizada se obtuvo 1 banda amplificada de 439 pb al emplear *BstE* II y 2 bandas 310/70 pb para *Hinf* I; los patrones de restricción coincidieron con el algoritmo descrito por *Steingrube* y otros.⁸

DISCUSIÓN

R. equi es generalmente inactivo frente a un conjunto importante de sustratos. Es oxidasa negativo, no fermenta carbohidratos ni alcoholes, es no proteolítico y no produce productos metabólicos ácidos a partir de la glucosa. Sin embargo, hidroliza la esculina y es catalasa positivo.⁹ En los laboratorios

de microbiología, la identificación de un cocobacilo grampositivo y pleomórfico puede presentar dificultades, por lo que resulta importante el diagnóstico diferencial con bacterias diferomorfos, *Bacillus*, *Micrococcus* e incluso con los estreptococos, entre otros organismos.¹ En ocasiones, *R. equi* puede ser considerado presuntamente como un contaminante, microbiota o carente de significado clínico. Por otra parte, debido a su pleomorfismo y variabilidad con ciertos colorantes⁴ resulta necesaria su certera identificación porque puede ser confundido como *Acinetobacter* o como una micobacteria de crecimiento rápido.

En la práctica médica es un verdadero reto diagnosticar la infección por *R. equi*, porque esta infección comparte similares síntomas clínicos con otras enfermedades como la tuberculosis pulmonar.¹ Además, desde el punto de vista microbiológico se han detectado cepas de *R. equi* con ausencia del factor equi, prueba esencial para demostrar la infección por el patógeno.⁹ Por otra parte, su débil característica de ácido alcohol-resistencia dificulta su identificación en los laboratorios de microbiología.² Recientemente, métodos moleculares basados en la PCR han logrado identificar *R. equi* con 100 % de especificidad, mediante la amplificación del fragmento de 459 pb del gen que codifica para la colesterol oxidasa.⁷

La amplificación del fragmento de 439 pb del gen que codifica para la HSP de 65 kDa del género *Mycobacterium* y su posterior análisis con endonucleasas de restricción se ha convertido en una variante interesante para detectar patógenos de importancia médica del orden Actinomycetales con una precisión de 96,8 %.⁸ Este protocolo tiene otras ventajas adicionales: puede brindar un resultado confiable en un período de 24-48 h después de recibir la muestra en el laboratorio; discrimina con el mismo procedimiento micobacterias, *Nocardia*, *Rhodococcus* y otras especies más de importancia médica sin necesidad de la posterior secuenciación del amplicón; y puede ser instaurado en un laboratorio de microbiología como un protocolo de rutina sin un costo económico excesivo.

En este trabajo, la procedencia de la muestra, el tiempo necesario para el crecimiento, así como la morfología de las colonias y las características fenotípicas y bioquímicas de la cepa, brindaron un diagnóstico presuntivo de infección por *R. equi*.

Resultados que fueron confirmados mediante el empleo de la PCR- RFLP del gen que codifica para la HSP de 65 kDa.

En resumen, este trabajo demuestra la utilidad del PCR-RFLP como herramienta complementaria de los métodos microbiológicos para detectar e identificar patógenos de importancia médica. También, alerta a los profesionales médicos sobre la presencia de *R. equi* en muestras respiratorias de pacientes inmunocomprometidos. Finalmente, este protocolo pudiera resultar de mucha utilidad para conocer la verdadera incidencia de *R. equi* en pacientes seropositivos al VIH en Cuba. Este trabajo constituye la primera detección molecular en Cuba de *R. equi* en paciente VIH/sida.

First molecular detection of *Rhodococcus equi* in a HIV/aids patient in Cuba

ABSTRACT

Introduction: *Rhodococcus equi* is recognized as an emerging pathogen that causes important morbidity and mortality among immunocompromised patients. **Objective:** to confirm the presence of *R. equi* in pleural fluid through the restriction fragment length polymorphism technique. **Methods:** the pleural fluid sample from one AIDS patient with respiratory symptoms was used. Microbiologic culture, staining tests, phenotypic and biochemical tests and restriction fragment length polymorphism technique for the diagnosis of microorganism were performed. **Results:** the staining technique along with the phenotypic and biochemical tests provided the presumptive diagnosis of *R. equi* infection, which was further confirmed by the molecular techniques. **Conclusions:** this paper reported the molecular detection of

R. equi from one HIV/aids patient for the first time in Cuba. The results suggested that the molecular biology techniques could be used in the diagnosis and identification of *R. equi*.

Key word: *Rhodococcus equi*, polymerase chain reaction, aids, HIV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. von Bargen K, Haas A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. FEMS Microbiol Rev. 2009;33:870-91.
2. Silva P, Miyata M, Sato DN, Santos AC, Mendes NH, Leite CQ. *Rhodococcus equi* isolation from sputum of patients with suspected tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:199-202.
3. Kamboj M, Kalra A, Kak V. *Rhodococcus equi* brain abscess in a patient without HIV. J Clin Pathol. 2005;58:423-5.
4. Bell KS, Philp JC, Aw DW, Christofi N. The genus *Rhodococcus*. J Appl Microbiol. 1998;85:195-210.
5. Hsueh PR, Hung CC, Teng LJ, Yu MC, Chen YC, Wang HK, et al. Report of Invasive *Rhodococcus equi* Infections in Taiwan, with an Emphasis on the Emergence of Multidrug-Resistant Strains. Clin Infect Dis. 1998;27:370-5.
6. Heidmann P, Madigan J, Watson J. *Rhodococcus equi* pneumonia: clinical findings, diagnosis, treatment and prevention. Clin Tech Equine Pract. 2006;5:203-10.
7. Ladrón N, Fernández M, Agüero J, González Zörn B, Vázquez-Boland JA, Navas J. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the choE gene. J Clin Microbiol. 2003;41:3241-5.
8. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC, Blacklock Z, Gibson JL, et al. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic Actinomycetes, including *Actinadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol. 1997;35:817-22.
9. Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin Microbiol Rev. 1991;4:20-34.

Recibido: 14 de febrero de 2011. Aprobado: 15 de abril de 2011. *Yaxsier de Armas*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía. Km 6 ½. Lisa. La Habana, Cuba. AP 601, CP 11300. Teléf.: 255-3257. Fax: 2046051. Correo electrónico: yaxsier@ipk.sld.cu