

Comunicación breve

Linfadenitis por *Mycobacterium genavense*

RECIBIDO: 02/07/2017

REVISIÓN: 06/10/2017

ACEPTADO: 27/11/2017

Vargas, M. • Longoni, S. • Guerra, A.

Hospital Regional Río Grande "Nuestra Señora de la Candelaria"
Ameghino 709, Río Grande, Tierra del Fuego, Argentina, CP 9420,
02964-422088/422042. marcevargas50@hotmail.com

RESUMEN: La micobacteriosis atípica es una enfermedad granulomatosa crónica o aguda causada por micobacterias no tuberculosas que incluyen a un grupo de bacilos ácido alcohol resistentes pertenecientes al género *Mycobacterium* sp. que afectan principalmente a pacientes con déficit del sistema inmunitario celular. *Mycobacterium genavense* es una especie relativamente nueva de micobacterias no tuberculosas reportada como causa de infecciones diseminadas oportunista en pacientes con severa inmunodeficiencia celular en el contexto del síndrome de inmunodeficiencia adquirida en la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV/SIDA) y trasplantados de órganos sólidos bajo tratamiento inmunosupresor agresivo. Se presenta un caso de diagnóstico tardío de linfadenitis ganglionar diseminada por *Mycobacterium genavense* de dos años de evolución como enfermedad marcador de HIV/SIDA. En el análisis microbiológico la ausencia de

crecimiento en los medios de cultivos sólidos habituales para micobacterias, y el crecimiento solo en medio líquido, requirió el análisis de técnicas moleculares con el método de polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) que permitió identificar al microorganismo causante de la enfermedad.

PALABRAS CLAVES: micobacteriosis; *Mycobacterium genavense*, PCR-RFLP; HIV/SIDA

SUMMARY: *Lymphadenitis by Mycobacterium genavense*

The atypical mycobacteriosis is a chronic or acute granulomatous disease caused by nontuberculous mycobacterium including an important group of etiological agents that belong to the genus *Mycobacterium* sp. and occurs frequently in patients with any deletion in their immune cell system. *Mycobacterium genavense* is a

relatively new species of nontuberculous mycobacterium reported as a cause of opportunistic infection in patients with severe immunodeficiency cell in the context of the acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS) and aggressive immunosuppressive treatments such as solid organ transplant recipients. This paper presents a case of late diagnosis of disseminated infection for atypical mycobacterium of two years' evolution from a sample of cervical lymph node biopsy. In

the microbiological analysis the absence of growth in solid media for mycobacterium, and only growth in liquid media, required the need for restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified fragments by molecular biology that allowed identifying the causative microorganism of the disease.

KEYWORDS: mycobacteriosis; *Mycobacterium genavense*, PCR-RFLP; HIV/AIDS

Introducción

Las micobacterias atípicas son patógenos oportunistas ambientales que necesitan factores predisponentes del huésped para la progresión a enfermedad (1). *Mycobacterium genavense*, es un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) de muy lento desarrollo, seis semanas o más en medios de cultivos líquidos para micobacterias y en los medios de cultivos sólidos necesita la presencia de micobactina para su desarrollo (2). Su distribución geográfica es universal, siendo su reservorio ambiental primario el agua, animales domésticos y tracto gastrointestinal de individuos sanos (3). Es un patógeno clínicamente significativo que causa enfermedad diseminada grave en pacientes con inmunosupresión celular HIV y trasplantados de órganos sólidos principalmente (4). No existen datos de epidemiología en nuestro país. Lo que puede deberse a que la infección con *M. genavense* es subdiagnosticada por la escasa utilización del medio líquido para micobacterias de Middlebrook 7H9 suplementado contenido en los frascos de cultivo automatizados o manuales y a los períodos de incubación de 6 semanas relativamente cortos para esta micobacteria (5,6).

El objetivo de este trabajo es describir el diagnóstico de *Mycobacterium genavense* y transmitir la experiencia de un laboratorio de salud pública de mediana complejidad en la identificación de las micobacteriosis atípicas que ocurren en el contexto del déficit del sistema inmunitario celular, principalmente personas afectadas por HIV/SIDA y trasplantados de órganos sólidos en tratamiento con inmunosupresores (7,8).

El método PRA o PCR-RFLP del gen hsp65, es una técnica genotípica para la identificación rápida y específica de las infecciones por micobacterias que se basa en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de una zona de DNA conservada (gen hsp65), seguida de una restricción del producto de amplificación mediante dos enzimas de restricción (*Bst* EII y *Hae* III). El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) permite diferenciar las especies y, a veces, las subespecies micobacterianas (9) mediante la comparación de los patrones obtenidos con la base de datos PRASITE de acceso libre disponible en internet (10).

Materiales y métodos

Tejido de biopsia ganglionar cervical de paciente inmunosuprimido con infección por virus HIV, con linfadenopatía cervical y diagnóstico de micobacteriosis atípica de dos años de evolución sin confirmación microbiológica, que se remite al laboratorio de microbiología. Se realizó coloración de Ziehl Neelsen, al tratarse de una muestra estéril y semisólida el tejido ganglionar se cultivo, sin previa descontaminación, en los medios sólidos de Lowenstein-Jensen y Stonebrink para micobacterias que se incubaron por 60 días en estufa a 35°C y por inoculación en forma aséptica con aguja y jeringa en medio líquido para micobacterias en frasco del sistema comercial automatizado BACTEC MYCO/F Lytic Becton Dickinson que es una formulación de Middlebrook 7H9 con caldo de infusión de cerebro y corazón que se utiliza para la recuperación de micobacterias en muestras de sangre, tejidos y fluidos corporales estériles, los frascos fueron incubados en el instrumento BACTEC 9120 según el protocolo de análisis de 42 días a 37°C recomendado por el fabricante.

En el centro nacional de referencia de micobacterias se realizó la técnica de análisis molecular PRA: PCR-RFLP (*hsp65*) a partir del medio de cultivo líquido. El ADN se obtuvo mediante el método descrito por Telenti y colaboradores (11), por hervido de la suspensión bacteriana obtenida luego de centrifugado el cultivo en medio líquido. El segmento específico del gen *hsp65* se amplificó mediante PCR y el producto amplificado de 440 pares de bases se sometió a restricción enzimática con *Bst*E II y *Hae* III. La identificación se realizó por observación visual de los diferentes patrones de restricción con ambas enzimas (*Bst*

II y *Hae* III) obtenidos en la electroforesis en gel de agarosa al 4% en buffer Tris/Borato/EDTA (TBE). La interpretación de los patrones obtenidos se realizó de acuerdo a la base de datos PRASITE en la página web-disponible.

Resultados y discusión

En el examen microscópico directo de la muestra mediante coloración de Ziehl Neelsen se observaron BAAR que no desarrollaron en los medios de cultivo sólidos luego de 60 días de incubación. Al alcanzar las 6 semanas de incubación el frasco automatizado se positivizó, observándose en la coloración directa del frasco BAAR que no desarrollaron en los medios de cultivo sólidos Lowenstein-Jensen y Stonebrink luego de 60 días de incubación. Su identificación se logró únicamente a través de métodos moleculares sobre la cual se obtuvo por el método de biología molecular análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PRA o PCR-RFLP) el diagnóstico de *Mycobacterium genavense*. (Figura 1)

Los autores declaran que son responsables del diagnóstico, no aparecen datos de pacientes, no presentan conflicto de intereses, nota Letra CDI N°69 /2017 del comité de docencia

Conclusiones

Se destaca la importancia de la aplicación del método de biología molecular PRA o PCR-RFLP (*hsp65*) como una valiosa técnica y herramienta de orientación diagnóstica en todas las muestras y cultivos en medio líquido y sólidos para micobacterias provenientes de pacientes inmunosuprimi-

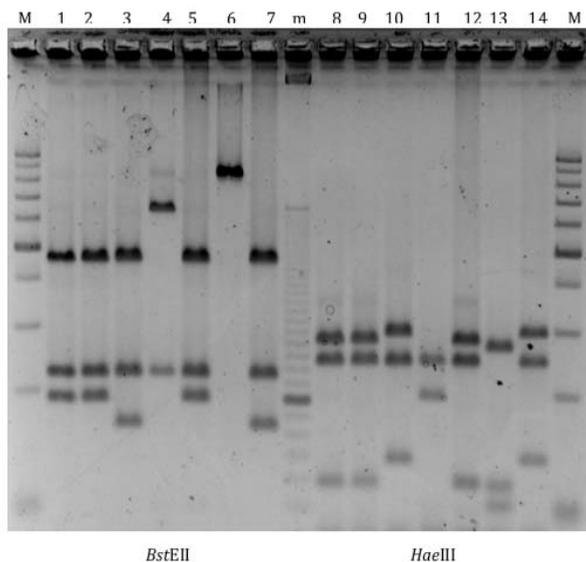


Figura 1. Digestión del producto de PCR del gen *hsp65* con *BstEII* y *HaeIII* en gel de agarosa al 4% teñido con Gel Red™. Calles M: Ladder de DNA de 50 bp; Calle m: Ladder de DNA de 10 pb; Calles 1 y 8, 2 y 9, 5 y 12: *Mycobacterium intracellulare*; calles 3 y 10, 7 y 14: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*; calles 4 y 11 (muestra del paciente en estudio): *Mycobacterium genavense*; calles 6 y 13: *Mycobacterium flavescens*

dos para el diagnóstico microbiológico de las micobacteriosis atípicas con rapidez y precisión. Sin la realización de la técnica PRA y la incubación del medio de cultivo líquido automatizado para micobacterias por un tiempo mínimo de 42 días no se hubiese arribado a la tipificación de *Mycobacterium genavense*.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de la Bioq. Roxana Paul del Servicio Micobacterias del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y el Kin. Marcos Prevasani Presidente del Comité de Docencia del Hospital Regional Río Grande.

Referencias bibliográficas

1. Núñez Cuadros E., Baquero Artigao F., y Grupo de trabajo sobre infección por micobacterias no tuberculosas de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica, 2012. Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y tratamiento de las adenitis por micobacterias no tuberculosas. *AnPediatr (Barc)*. **3**, 77:208.e1-208.e12.
2. Forbes B., Sahn D., Weissfeld A.; 2009. "Bailey & Scott .Diagnostico Microbiológico" Editorial Medica Panamericana.(Buenos Aires), **1**. 481-509
3. Uriz, J.; Reparaz, J.; Castiello, J. Y, Sola, J. Tuberculosis en pacientes infectados por el VIH. 2007. *Anales Sis San Navarra*. **30**. Suppl.2. 131-142.

4. Hoefsloot, W. Et al. *Mycobacterium genavense* in the Netherlands: an opportunistic pathogen in HIV and non-HIV immunocompromised patients. An observational study in 14 cases. 2013. *Clinical Microbiology and Infection*. **19**. Issue 5. 432 – 437.
5. Fernández de Vega, F; Moreno, J; González Martín, J; Palacios Gutierrez, J.; 9ª Micobacterias. 2005. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
6. Gilli, M.; Sequeira, M.; López, M.; Latini, O., 1999. Estudio comparativo de medios líquidos y sólidos en el diagnóstico de micobacterias. Comparación del medio 7H9 de Middlebrook y del sistema M-GIT con los medios clásicos en condiciones de terreno. *FABICIB*. **3**. 41-52.
7. De Lastours V, Guillemain R, Mainardi J-L, et al., 2008. Early Diagnosis of Disseminated *Mycobacterium genavense* Infection. *Emerging Infectious Diseases*. **2**,14:346-347.
8. M. Santos, A. Gil-Brusola, A. Escandell, M. Blanes, and M. Gobernado, 2014. *Mycobacterium genavense* Infections in a Tertiary Hospital and Reviewed Cases in Non-HIV Patients, *Pathology Research International*, **2014**, Article ID 371370, 8 pages.
9. Chimara E, Ferrazoli L, MisukaUeky SY, Martins MC, Durham AM, D Arbeit R y Cardoso Leão S. 2008. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol* **8**,48.
10. Disponible en: <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>
11. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. **31**. 175-8.