

Lesiones en *Mus musculus* inoculados con *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium fortuitum* aislados de suelos pampeanos (República Argentina)

Oriani, D.S.¹; Sagardoy, M.A.²

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad para producir lesiones macro y microscópicas de nueve aislamientos de micobacterias no tuberculosas (MNT) cuando eran inoculadas en ratones albinos (*Mus musculus*). Las micobacterias fueron aisladas de muestras de suelos destinados a la agricultura y ganadería de la provincia de La Pampa, Argentina. Se investigaron tres especies ambientales (*M. fortuitum*, *M. phlei* y *M. kansasii*) que eran dominantes en los suelos estudiados. Los animales fueron inoculados por vía endovenosa, con una suspensión de cultivos frescos de MNT, equivalente a 1 mg de bacterias mL⁻¹. Los animales se mantuvieron en un área restringida durante 60 días, en ese momento se les efectuó la eutanasia y la necropsia, recolectando órganos para realizar estudios bacteriológicos e histopatológicos. Las cepas de *M. phlei* y *M. kansasii* inoculadas produjeron lesiones en los ratones similares a las producidas por *M. tuberculosis* y/o *bovis*, mientras que *M. fortuitum* no desarrollo patogenicidad en el modelo animal utilizado bajo las condiciones en que se realizó este estudio. Es necesario continuar valorando otras micobacterias ambientales aisladas de suelos y otras vías de inoculación contribuyendo a colaborar en el diagnostico diferencial de la tuberculosis y las enfermedades granulomatosas.

Palabras clave: (micobacterias no tuberculosas), (lesiones macroscópicas), (lesiones microscópicas).

¹Departamento de Epizootiología y Salud Pública. Facultad de Cs. Veterinarias UNLPam. ²Departamento de Agronomía. UNS.

Recibido: octubre 2006 - Aceptado: diciembre 2007- Versión on line: diciembre 2007

***Mus musculus* lesions inoculated with *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium fortuitum* isolated from soil of La Pampa Province (R. Argentina).**

SUMMARY

The study objective was to determine the capacity of originate macroscopic and microscopic lesions of nine atypical mycobacteria inoculated in albino rats. The mycobacteria were isolated from farms soil samples at different places from La Pampa province (Argentina). It was investigated the three most frequent species (*M. fortuitum*, *M. phlei* and *M. kansasii*). The animals were endovenously inoculated with 1 mg of bacteria/ml⁻¹ of fresh culture and kept in a restricted area during 60 days. After euthanasia, samples from different organs, for bacteriologic and histopathologic studies, were collected. *M. phlei* and *M. kansasii* showed lesions resemble to that produced by *M. tuberculosis* or *M. bovis*, whereas *M. fortuitum* did not show lesions in the animal model descript in this study. It is necessary to value other atypical mycobacterium isolated from soil and other inoculation ways in order to assist in clarifying the differential diagnosis in tuberculosis and other granulomatose diseases.

Key words: (atypical mycobacterium), (macroscopic lesions), (microscopic lesions).

INTRODUCCIÓN

Las micobacterias que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis* son reconocidas como micobacterias no tuberculosas (MNT) o micobacterias atípicas; son ubicuas, generalmente se encuentran en muestras ambientales obtenidas de suelos, aguas, animales y alimentos^{5,11}. La transmisión de persona a persona es muy rara con MNT y es posible que los huéspedes susceptibles se infecten por ingestión, inhalación e inoculación a partir del ambiente^{6,25}. Inicialmente fueron consideradas como contaminantes ambientales o simples colonizantes; a partir de 1950 se reconocieron como patógenos potenciales pudiendo causar enfermedades similares a la tuberculosis en personas y animales inmunosuprimidos²⁷. En la actualidad los grupos de mayor riesgo son los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como aquellos que padecen fibrosis quística, cáncer, diabetes, pacientes con tratamientos

de corticosteroides y con enfermedades autoinmunes⁴. En la práctica de la medicina veterinaria se asocia la presencia de infección o colonización con MNT cuando se presentan reacciones paraespecificas en el diagnóstico de la tuberculosis por intradermorreacción, así como en el diagnostico diferencial de otras afecciones granulomatosas^{7,14}. En consecuencia es importante considerar si las MNT que se encuentran en el ambiente pueden provocar lesiones macro o microscópicas cuando infectan a animales.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la virulencia de tres especies de MNT aisladas de suelos pampeanos argentinos en un modelo animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las micobacterias utilizadas fueron aisladas tanto de suelos con pasturas naturales y/o cultivos con o sin pastoreo de animales de la

Provincia de La Pampa cuyas características e identificación fueron descriptas en trabajos anteriores^{18,19}. El poder patógeno de 9 MNT se determinó utilizando ratones *Mus musculus*, *Outbred mouse* (albino), provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa. Los animales presentaron un peso promedio de 30g. cada uno. Se utilizaron en total 40 ratones, agrupados en 10 grupos de cuatro ratones, mantenidos en un área parcialmente aislada. Se estudiaron 9 aislamientos de MNT, 3 correspondieron a *M. phlei*, 2 a *M. kansasii* y 4 a *M. fortuitum*. Un grupo fue inoculado con solución al 0,85% Na Cl estéril. Los animales fueron alimentados con alimento balanceado comercial y con suministro de agua potable mineralizada para consumo humano libre de micobacterias. Las camas fueron cambiadas cada 48 hs, realizando control de peso y temperatura de los animales cada dos días. Los animales fueron inoculados vía endovenosa, en las venas caudales laterales, con 0,05mL de una suspensión de cultivos frescos (cuatro a seis días) de cada MNT estudiada, equivalente a 1 mg de bacterias mL⁻¹, ^{2,15}. La inoculación se realizó con aguja y jeringa hipodérmica 25G x 5/8 (0,5 mm x 16 mm), inmovilizando al animal por medio de un dispositivo adaptado por nosotros sobre la base del método de restricción utilizada por Orme y Collins²⁰. La manipulación de los animales se efectuó respetando condiciones mínimas de bioseguridad. Transcurridos 60 días, los animales fueron sacrificados por dislocación de columna vertebral cervical y a continuación se realizó la necropsia de los mismos; se obtuvieron muestras de hígado, riñón, pulmón y bazo, en solución formolada al 10%, para realizar el análisis histopatológico de esos órganos. Se recolectaron además, muestras en forma aséptica, colocándolas en recipientes estériles para su estudio bacteriológico. La siembra fue

realizada dentro de un lapso de 3 h. El estudio se realizó previo a la utilización del método de decontaminación de Petroff. Con posterioridad, a la decontaminación de la muestra estudiada, se efectuó la siembra en dos tubos de medio Löwensten Jensen y en dos de medio Stonebrink por órgano de cada animal investigado, se incubó a 37°C durante 60 días, los cultivos se revisaron diariamente. A las colonias sospechosas se realizó coloración de Zielh Neelsen, la identificación de los bacilos ácido alcohol resistentes se realizó de acuerdo a lo propuesto por Kantor (1979), estudiando las siguientes características: velocidad de crecimiento, temperatura de desarrollo, producción de pigmento con y sin luz, catalasa a temperatura ambiente y 680C; nitrato reductasa; hidrólisis del Tween, ureasa, beta-glucosidasa; fosfatasa ácida; pirazinamidasa; reducción de hierro; aril sulfatasa; crecimiento en NaCl 5 %; y resistencia a hidrazida del ácido tiofenocarboxílico (2 mg L⁻¹); cicloserina (30 mg L⁻¹); ácido p-aminosalicílico (0,5 mg L⁻¹); isoniazida (0,2 mg L⁻¹); estreptomycin (4 mg L⁻¹); etambutol (2 mg L⁻¹); rifampicina (40 mg L⁻¹). A los cortes histológicos se les realizó coloración de Hematoxilina Eosina y de Ziehl Neelsen¹⁶.

RESULTADOS

Durante el tiempo transcurrido entre la inoculación de las MNT y la necropsia de los animales no se observaron alteraciones en la conducta de los ratones albinos inoculados.

Examen macroscópico

En los animales inoculados con los tres aislamientos de *M. phlei*, se observó el aumento del tamaño de los ganglios inguinales, mientras que la mayoría no mostró alteraciones macroscópicas en los órganos internos, con la excepción del hígado perteneciente a uno de los individuos inoculado con uno de los aislamientos, que

presentó en el borde del lóbulo hepático nódulos de 0,5 a 1 mm de diámetro, de color pardo gris (Figura 1), no resumiendo contenido al corte. A partir de esta muestra se reaisló el *M. phlei* en los medios Löwenstein Jensen y Stonebrink.

La necropsia de los animales que fueron inoculados con los dos aislamientos de *M. kansasii* presentaron lesiones puntiformes de 1 a 2 mm en la superficie, de color blanco gris en uno o ambos riñones (Figura 2). El cultivo posterior de las mismas demostró el reaislamiento de *M. kansasii*. En estos animales los ganglios inguinales se encontraron de mayor tamaño que los normales, mientras que el resto de los órganos no presentaron alteraciones apreciables a simple vista, a excepción de los bordes festoneados en los hígados de los ratones inoculados con uno de los aislamientos.

Los ratones inoculados con los cuatro aislamientos de *M. fortuitum*, no presentaron alteraciones macroscópicas en los órganos internos, salvo el aumento de tamaño en los gánglios linfáticos inguinales, donde no se lograron recuperar micobacterias de los mismos.

Estudio microscópico

Los cortes histológicos coloreados con Hematoxilina–Eosina de los órganos presentaron las mismas características, aunque se observaron diferencias de distinta intensidad, siendo las más severas las de *M. phlei* y *M. kansasii* y las menos significativas las de *M. fortuitum*.

En el hígado la imagen que dominó fue la presencia de microgranulomas (Figura 3) constituidos por agregados de células mononucleares, principalmente macrófagos con abundante citoplasma rosado impreciso y algunos linfocitos en ubicación centro lobulillar y con menor frecuencia mediozonal, con focos linfocitarios en los espacios portales. En los hepatocitos se observaron cambios

degenerativos (tumefacción turbia e hidrópica) leves. En el corte correspondiente a los nódulos descriptos en el hígado de los ratones inoculados con *M. phlei*, se observó un típico granuloma de tuberculosis con depósito de calcio y necrosis en proximidad del área portal (Figura 4).

En los riñones se observaron glomérulos muy celulares, ocupando el espacio de la cápsula de Bowmann, con tubulos tumefactos en la zona cortical, en ocasiones se observó infiltrado linfocitario discreto interticial.

Los pulmones de los ratones no presentaron cambios microscópicos. Los órganos linfoideos, bazo y ganglios linfáticos presentaron distintos grados de hiperplasia linfocitaria. En los cortes histológicos coloreados con Ziehl Neelsen se observaron bacilos ácido alcohol resistentes en la muestra del hígado perteneciente al animal inoculado con *M. phlei*.

DISCUSIÓN

En ambientes como el suelo y el agua existen micobacterias no tuberculosas que juegan un rol importante en la salud humana, puesto que tienen capacidad para enfermar al hombre^{9,24,25}, *M. phlei* ha sido aislado de conjuntivitis, uretritis y artritis¹ así como de peritonitis crónica en pacientes dializados²¹ y en muestras de pacientes con fibrosis quística²³.

En éste estudio las tres especies (*M. phlei*, *M. kansasii* y *M. fortuitum*) inoculadas mostraron capacidad infecciosa para producir diferentes grados de lesiones en los órganos internos de los ratones, especialmente en el hígado en los que la gama de lesiones fue desde infiltrados poco organizados pasando por microgranulomas y culminando con la inflamación granulomatosa crónica con calcificación, indistinguible de la producida por *M. tuberculosis* y/o *M. bovis*. Estos resultados confirman los estudios realizados por otros autores^{6,17}, *M. phlei* fue la

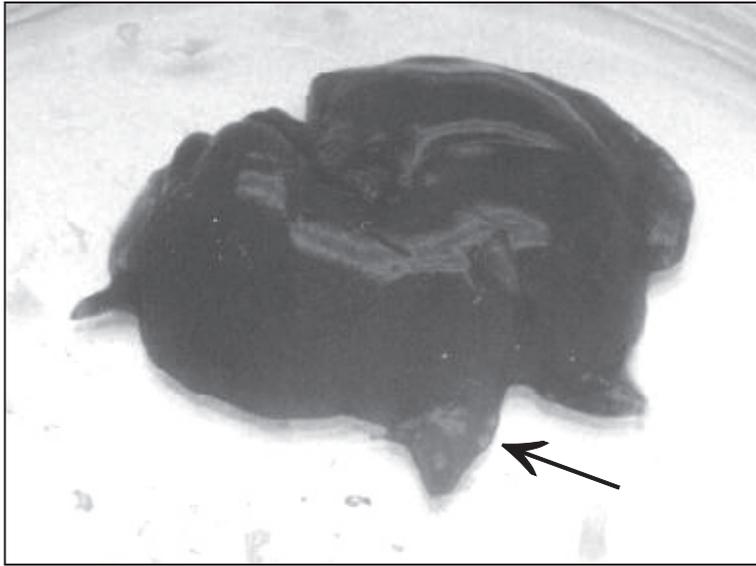


Figura 1. Nódulos hepáticos de *Mus musculus* inoculado con *M. phlei*

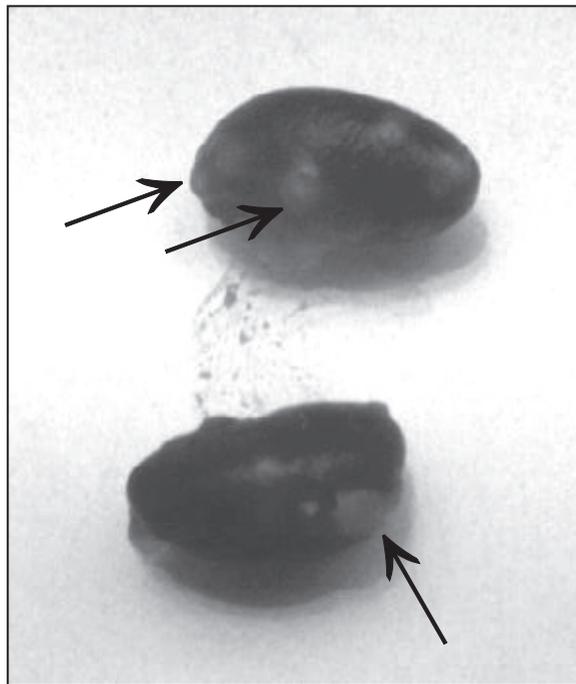


Figura 2. Nódulos renales en *Mus musculus* inoculado con *M. kansasii*

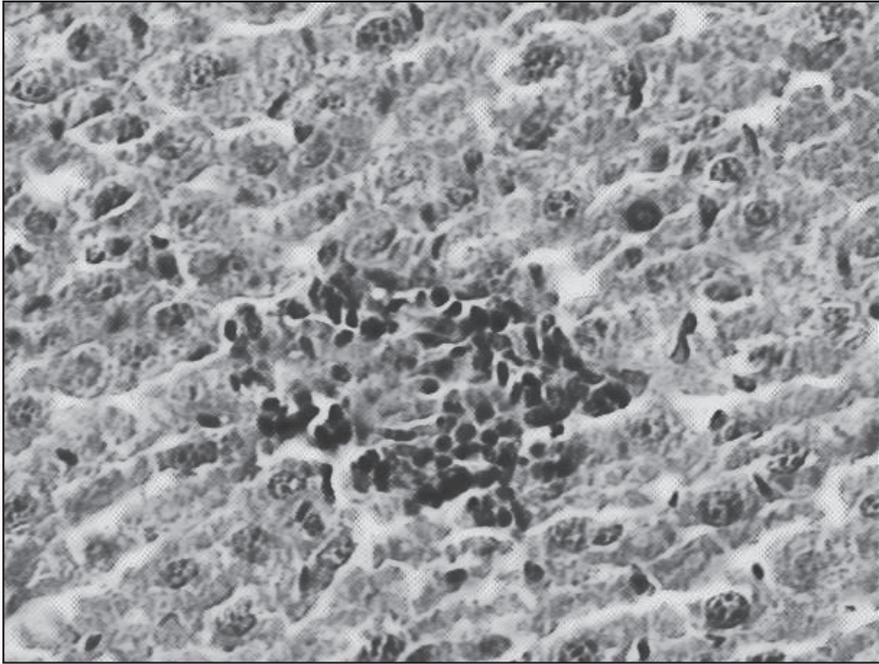


Figura 3. Microgranuloma hepático (40x) HE

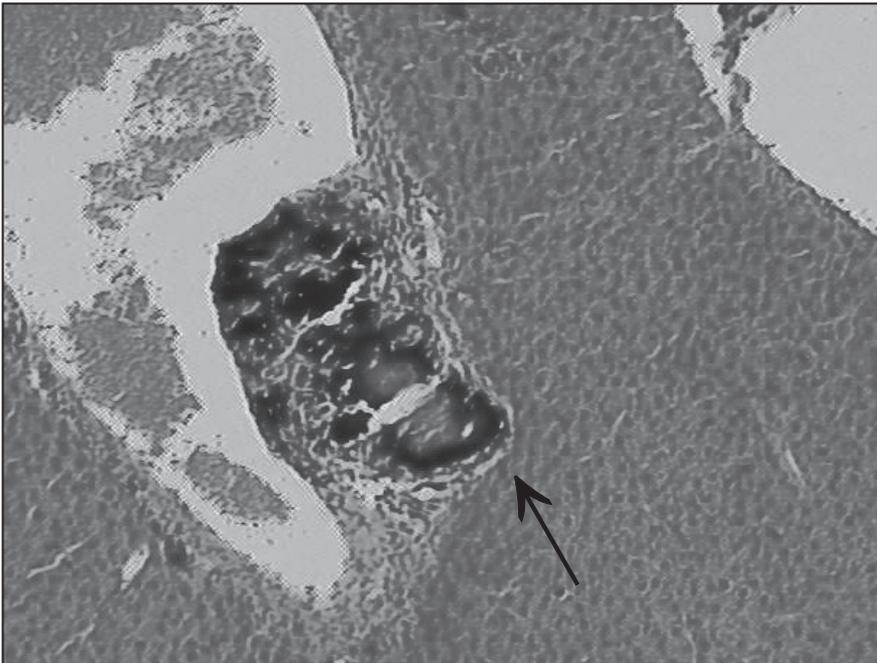


Figura 4. Granuloma calcificado en hígado (20x) HE

especie más agresiva de las tres estudiadas al producir lesiones granulomatosas caseificadas.

Por otra parte, distintas especies de micobacterias atípicas, entre ellas *M. kansasii* y micobacterias del complejo MAIS, fueron reconocidas como patógenas para animales de laboratorio, siendo el hamster más susceptible que el ratón y el merion²² demostrándose, además, que la vía de inoculación intratraqueal era más apropiada que la vía intravenosa para evaluar la patogenicidad de las micobacterias utilizadas⁸.

Desde el punto de vista de la patología, en este estudio, *M. kansasii* por la intensidad de las lesiones que ocasionó en órganos internos de los animales inoculados. fue la segunda especie en orden de importancia. De acuerdo con la vía de inoculación utilizada, el riñón fue el blanco de las lesiones producidas. En la práctica, es reconocido el poder patógeno de *M. kansasii*^{9,13}; en nuestro país Kantor (1979)¹⁵ describió que *M. kansasii* inoculado en el ratón por vía endovenosa (1 mg de micobacterias) provocó lesiones en el pulmón y en el riñón con muerte del animal en tres meses. En humanos, *M. kansasii* puede provocar infección pulmonar crónica en pacientes tratados por quimioterapia, a su vez existen infecciones extrapulmonares muy diversas como linfadenitis cervical en niños, celulitis, abscesos cutáneos, artritis, sinovitis, tendinitis, osteomielitis²⁸.

M. fortuitum, la MNT que predominó en los suelos investigados¹⁸, fue la especie que resultó menos agresiva para los ratones en este estudio. Los animales inoculados con dicha micobacteria no presentaron síntomas ni lesiones macroscópicas y sólo leves alteraciones en los órganos internos de los mismos. Los animales no mostraron signos de septicemia después de la inoculación bacilar ni se observaron alteraciones en el oído medio que se reflejen en la conducta de girar sobre sí mismos tal como fue descrito

oportunamente²⁶. Los resultados de este trabajo coinciden con aquellos autores que demostraron que distintas cepas de *M. fortuitum*, inoculadas en ratones, podían tener un grado distinto de agresividad¹⁰. En nuestro país, se lo ha detectado en esputo y material purulento obtenido de la aspiración de abscesos subcutáneos de un paciente con enfermedad avanzada debida al Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1³. Woods y Washington (1987)²⁸ aseveran que las manifestaciones clínicas en humanos, producidas por *M. fortuitum* incluyen enfermedad diseminada, lesiones cutáneas y una amplia gama de infecciones variadas como celulitis, abscesos, enfermedad pulmonar, endocarditis, pudiéndose presentar esta MNT en pacientes inmunodeprimidos o no.

Podemos concluir que si bien las MNT aisladas de los suelos pampeanos provocaron diferente grado de lesiones en ratones albinos inoculados, siendo algunas de ellas similares a las producidas por *M. tuberculosis*, ninguna presentó la capacidad de diseminación y de virulencia que manifiestan las especies del complejo tuberculosis. Finalmente, en función de los datos obtenidos y de que existe una escasa información sobre los modelos animales aplicables a MNT ambientales¹² es aconsejable continuar con los estudios de patogenicidad en distintos tipos de animales experimentales considerando por ejemplo, esquemas de animales inmunocompetentes y estresados.

AGRADECIMIENTOS

Al Médico Veterinario Jorge Blando por su colaboración en las inoculaciones y mantenimiento de los animales de laboratorio.

Al profesor Jesús Rodríguez de la Facultad de Cs. Veterinarias de San José de Las Lajas (La Habana, Cuba) por el asesoramiento y colaboración en la técnica histológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, J.L.; Sanchez, E.F.; Carrillo, C.; Alarcon, G.S. and Silicani, A. (1989). Septic arthritis due to Mycobacterium phlei presenting as infantile Reiter's syndrome. *J. Rheumatol.* 16:1377-1378.
2. Corner, L.A. and Pearson, C.W. (1978). Pathogenicity for cattle of atypical mycobacteria isolated from feral pigs and cattle and the correlation of lesions with tuberculin sensitivity. *Aust. Vet. J.* 54:280-286.
3. Corti, M.; Soto, I.; Villafañe, F.; Esquivel, P. y Di Lonardo, M. (1999). Infección diseminada por Mycobacterium fortuitum en un paciente con SIDA. *Medicina* (Buenos Aires) 59: 274-276.
4. Crespo Ortiz, M. del P.; Corral Prado, R.; Alzate, A. (1997). Micobacterias no tuberculosas en personas VIH positivas y en personas sin factores de riesgo a la infección. *Colombia Médica*; 28:136-144
5. Dailloux, M.; Laurain, C.; Weber, M.; Hartemann, Ph. (1999). Water and nontuberculous mycobacteria. *Wat. Res.* 33:2219-2228.
6. Davies, L. and Davies, Pdo. (1995). Non-tuberculosis mycobacterial infections: no fire without a smoke. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155:715.
7. Di Lonardo, M.; Isola, N.; Ambroggi, M.; De Bianchi, A. y Kantor, In.De. (1981). Non tuberculous mycobacterioses in Buenos Aires. *Medicina* (Buenos Aires) 41: 419-422.
8. Doi, N. (1998). Development of the intratracheal infection model of experimental murine mycobacteriosis: comparison with the intravenous infection model. *Kekkaku* 73:339-347.
9. Du Moulin, G.C.; Stottmeier, K. (1986). Waterborne mycobacteria: an increasing threat to health. *ASM News* 52:525-529.
10. Emori, M.; Tomioka, H. and Saito, H. (1991). Macrophage respiratory burst-inducing activity of Mycobacterium fortuitum: relationship with its virulence to mice. *Kekkaku* 66:421-424.
11. Falkinham III, J.O. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:177-215.
12. Holland, S.M. (2001). Nontuberculous mycobacteria. *Am. J. Med. Sci.* 321:49-55.
13. Jenkins, P.A. (1981). The epidemiology of opportunist mycobacterial infections in Wales 1952-1978. *Rev. Infect. Dis.* 3:1021-1023.
14. Kantor, I.; Bioch, D. and Roswurm, J.D. (1978). Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *Am. J. Vet. Res.* 39:1233-1234.
15. Kantor, I.N DE (1979). Bacteriología de la tuberculosis. Centro Panamericano de Zoonosis (PAHO/WHO), *Serie Monografías Científicas y Técnicas N° 11*, Martínez, Argentina, 63 p.
16. Lillie, R.D. (1960). *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.* McGraw-Hill, New York, 220 p.
17. O'Brien, D.P. and Rawluk, D.J. (1999). Iatrogenic Mycobacterium infection after an epidural injection. *Spine* 24:1257-1259.
18. Oriani, D.S. (2001). Tesis de Magister. *Micobacterias no tuberculosas aisladas de suelos de la Provincia de La Pampa, su comportamiento frente a agentes químicos y en modelos animales.* Bahía Blanca, Universidad Nacional del Sur, Departamento de Agronomía, 162 p.
19. Oriani, D.S.; Sagardoy, M.A. (2002). Nonuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). *Rev. Arg. Microbiol.*, 34:132-137.
20. Orme, I.M. and Collins, F.M. (1994). Mouse model of animal. En: *Tuberculosis pathogenesis, protección and control.* BR Bloon (Ed.), AMS Press, Washington DC, p. 113-134.
21. Paul, E. and Devarajan, P. (1998). Mycobacterium phlei peritonitis: a rare complication of chronic peritoneal dialysis. *Pediatr. Nephrol.* 12:67-68.
22. Saenz, A.; Thorel, M.F.; Perdomo, E.; López, E.; Errico, F. and Paullier, C. (1985). Experimental pathogenicity of so-called atypical mycobacteria in mice, hamsters and meriones. *Anatomopathological*

- study. *Ann. Reach Vet.* 16:219-226.
23. Segal, E.; Diez, G.S.; Prokopi, E.; Aguirre, A.; Poggio, G. y Chertkoff, L. (1998). Micobacterias no tuberculosas en pacientes con fibrosis quística. *Medicina* (Buenos Aires) 58:257-261.
24. Soto, L.; Esquivel, S.P.; Corti, M.E.; Masini, R.; Di Lonardo, M. (1995). Infección por *Mycobacterium kansasii* en pacientes con SIDA. *Rev. Arg. Infectol.* 8:21-24.
25. Wallace, R.; Brown, B.; Griffith, D. (1998). Nosocomial outbreak/pseudo outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:453-490.
26. Wayne, L.G. and Kubica, G.P. (1986). Family Micobacteriaceae. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe and JG Holt (Eds.), Vol 2, p. 1436-1457, Williams and Wilkins, Baltimore.
27. Wolinsky, E. (1979). Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119:107-159.
28. Woods, G.L. and Washington, I.I. (1987). Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiological and clinical aspects. *Rev. Infect. Dis.* 9:275-294