

Aislamiento de *Mycobacterium intracellulare* a partir de un pulmón bovino comercializado en una carnicería de la zona oeste del conurbano bonaerense

Isolate of *Mycobacterium intracellulare* from a bovine lung marketed in a butcher shop from western of Greater Buenos Aires.

MARFIL, MJ¹., GARBACCIO, SG²., HUERTAS, PG²., BARANDIARAN, S³., ALONSO, B⁴., ZUMÁRRAGA, MJ¹.

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA. N. Repetto y De Los Reseros s/n, (B1686IGC) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. e-mail: zumarraga.martin@inta.gob.ar. Teléfono: +541146211447 interno 109. ²Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA. N. Repetto y De Los Reseros s/n, (B1686IGC) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. ³Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Av. Chorroarín 280 (C1427CWN) CABA, Buenos Aires, Argentina. ⁴DILAB-SENASA. Talcahuano 1660, (B1640CZT) Martínez, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Se realizó un muestreo de 62 pulmones bovinos en una carnicería y un frigorífico de la zona oeste del conurbano bonaerense. De uno de ellos, adquirido en una carnicería, y sin lesiones visibles compatibles con tuberculosis, se obtuvo por cultivo en medio Stonebrink desarrollo de bacilos ácido alcohol resistentes. Por *polymerase chain reaction restriction analysis* y secuenciación del gen que codifica 16S ARN ribosomal se identificó *Mycobacterium avium* subsp. *intracellulare*. Esta especie pertenece al complejo *Mycobacterium avium* y es considerada una micobacteria oportunista ya que normalmente no produce signos clínicos, aunque ha sido aislada de mamíferos enfermos. Este hallazgo en un pulmón bovino nos alerta sobre el potencial riesgo de transmisión a animales que consumen este tipo de alimento crudo y a personas inmunosuprimidas que lo manipulan.

Palabras clave: (*Mycobacterium intracellulare*), (reacción en cadena de la polimerasa), (tipificación molecular).

Correspondencia e-mail: Martín Zumarraga zumarraga.martin@inta.gob.ar

Recibido: 01/12/2015

Aceptado: 28/10/2016

ABSTRACT

Sixty two bovine lungs were sampled in one butcher shop and one slaughterhouse from the western region of Greater Buenos Aires. In one of them, purchased in a butcher shop, which showed no lesions compatible with tuberculosis, we obtained an isolate of acid fast bacilli on Stonebrink medium. *Mycobacterium avium* subsp. *intracellulare* was identified using polymerase chain reaction restriction analysis and sequencing of the gene encoding 16S rRNA. This species belongs to the *Mycobacterium avium* complex and is regarded as opportunistic mycobacteria because it usually does not cause clinical signs, but it has been isolated from diseased mammals. This finding in a bovine lung alerts us about the potential risk of transition to animals that consume this type of food raw and to immunosuppressed people who manipulate it.

Keywords: (*Mycobacterium intracellulare*), (polymerase chain reaction), (molecular typing).

Running title: Isolate of *Mycobacterium intracellulare* from bovine lung

INTRODUCCION

La tuberculosis en bovinos es producida principalmente por *Mycobacterium bovis* que pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Asimismo, el bovino es susceptible a otras micobacterias denominadas no tuberculosas (MOTT, del inglés *mycobacteria other than tuberculosis*)¹⁶. *Mycobacterium intracellulare* (MI) es una MOTT perteneciente al complejo *Mycobacterium avium* (MAC) que está conformado por: *Mycobacterium avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*; *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *silvaticum*), *M. colombiense*, *M. chimaera*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bocherdurhonense*, *M. vulneris*, *M. arosiense* y MI¹⁸. Estas especies son ambientales y están distribuidas principalmente en la tierra y el agua¹². MI es frecuentemente aislada de pacientes inmunosuprimidos con patologías pulmonares^{13, 20, 10, 15} comportándose como patógeno oportunista¹⁴, aunque también se ha identificado en personas inmunocompetentes^{1, 22}. Esta especie de micobacteria también ha sido aislada de mamíferos salvajes como carpinchos¹⁷, mamíferos domésticos como cerdos¹⁹ y bovinos¹⁶ y de animales de compañía como perros y gatos²⁴. Si bien en animales en general no produce infección, en condiciones de estrés e inmunosupresión puede ocasionar lesiones. Éstas son macroscópicamente

indistinguibles de aquellas producidas por *M. bovis* requiriéndose, además de los métodos bacteriológicos tradicionales, de técnicas moleculares para su apropiada identificación y diferenciación dentro del MAC. El método oficial de diagnóstico de tuberculosis (TBC) en bovinos en pie es la intradermorreacción, mientras que la confirmación se realiza por cultivo y la observación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) mediante la tinción de Ziehl-Neelsen²¹. Para la identificación certera de la especie se utilizan técnicas moleculares⁴. Debido al prolongado tiempo que insume el desarrollo de colonias visibles en el cultivo, cada vez es más utilizada la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de tejidos para arribar al diagnóstico rápidamente^{26, 2, 3}. La inspección bromatológica en frigorífico constituye una de las últimas barreras de protección al consumidor antes de la cocción del alimento. La prevalencia de tuberculosis bovina estimada a partir del hallazgo de lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis detectadas en frigorífico con inspección federal fue de 0,3% en el año 2014²¹.

El objetivo del presente trabajo fue la detección de micobacterias a partir de pulmones bovinos inspeccionados bromatológicamente y procedentes de dos establecimientos del oeste del conurbano bonaerense.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: se seleccionaron por conveniencia dos establecimientos de la zona oeste del conurbano bonaerense y se procesaron 62 pulmones bovinos, de los cuales 4 fueron adquiridos en una carnicería y 58 fueron recolectados en un frigorífico después de la inspección bromatológica de rutina.

Inspección macroscópica: cada uno de los pulmones fueron palpados externamente en busca de lesiones granulomatosas compatibles con tuberculosis y se realizaron cortes de los distintos lóbulos, especialmente los lóbulos diafragmáticos, tomándose muestras tanto de las zonas donde se percibía alguna irregularidad como de tejido sano. También se recolectaron muestras de los linfonódulos traqueobronquiales y mediastínicos. Este procedimiento fue realizado en una cabina de seguridad biológica tipo II en un laboratorio de acceso restringido con presión negativa.

Cultivo: los tejidos fueron cortados con tijera y colocados en una bolsa estéril junto con 20 mL de agua bidestilada estéril para luego ser macerados mecánicamente en *Masticator* (Iul instrument, España). Luego se realizó la descontaminación por el método de Petroff con NaOH al 4%⁵. Posteriormente fue sembrado en medio Stonebrink por triplicado y cultivado a 37°C. Se realizó la observación de los mismos semanalmente hasta los 60 días.

Tinción ácido alcohol resistente de Ziehl-Neelsen: se realizó según el protocolo descrito en el manual de normas técnicas para bacteriología de la tuberculosis, CEPANZO, 1988⁵.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de tejido: la extracción de ADN se realizó mediante el kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen©, Alemania) a partir de tejido pulmonar y linfonódulos, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Extracción de ADN a partir de cultivo: las colonias desarrolladas en el medio de cultivo se tomaron con un ansa estéril y se suspendieron en 200uL de agua destilada estéril contenidos en un tubo de 2mL de capacidad con tapa

a rosca. Luego se incubó a 95°C durante 30 minutos, con el propósito de inactivar y lisar los bacilos.

Reacción en cadena de la polimerasa: para la identificación de las micobacterias del CMTB se amplificó la secuencia de inserción *IS6110* utilizando un programa de ciclado con la modificación de *Touch-Down*²⁷. Para la detección de MOTT se amplificó un fragmento del gen *hsp65* que codifica la proteína de estrés térmico de 65kD, seguida de la restricción de los productos amplificados con enzimas de *BstEII* y *HaeIII*, según la técnica de PCR *Restriction Analysis* (PRA)²³. Los tamaños de los fragmentos de restricción fueron estimados mediante la utilización de marcadores de peso molecular (50pb DNA, Marker, Promega Corp. USA) y con la ayuda del programa de análisis de imágenes *BioNumerics* (Applied Maths, Bélgica). Los patrones obtenidos se compararon con los incluidos en la base de datos *PRAsite* (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Secuenciación: se amplificó un fragmento de 1,37Kb del gen 16S ARNr utilizando los oligonucleótidos descritos por Kirschner y Bottger, (1998)¹¹. Seguidamente los productos obtenidos se purificaron utilizando el kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (General Electric, UK) siguiendo las especificaciones del fabricante. La cuantificación se realizó por espectrofotometría (NanoDrop® 1000, Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) y luego se secuenció en un secuenciador de 16 capilares (ABI3130xl sequencer Applied Biosystems, USA) usando *Big Dye Terminator v3.1* (Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de INTA. Las secuencias resultantes fueron comparadas con aquellas disponibles en *Ribosomal Database Project* (RDP) (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) y *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

RESULTADOS

En ninguno de los 62 pulmones inspeccionados se encontraron lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis. La PCR a partir de los tejidos fue negativa en todos los casos y para todas las secuencias blanco investigadas. Al cabo de 35 días de observación regular de los cultivos, de una sola muestra se obtuvo desarrollo de colonias en el medio Stonebrink, observándose BAAR por la tinción de Ziehl-Neelsen. A partir de las colonias aisladas, se realizó la identificación molecular. La amplificación por PCR de *hsp65* (440pb) fue positiva mientras que la de *IS6110* (245pb) fue negativa, descartándose la presencia de micobacterias del CMTB. Por la técnica de PRA, se obtuvieron los siguientes fragmentos de restricción: *BstEII*: 235; 120 y 100pb y *HaeIII*: 145; 130 y 60pb; compatible con el patrón de MI según la base de datos *PRAsite* (Figura 1). El análisis y comparación de la secuencia de 16S ARNr por BLAST y RDP, permitió la identificación de *M. intracellulare* con 99,9% y 98,8% de identidad respectivamente.

DISCUSIÓN

La inspección bromatológica de TBC en frigoríficos sigue siendo una estrategia de vigilancia efectiva implementada por el Plan Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina²¹. La ausencia de lesiones compatibles con TBC en todas las muestras analizadas durante este trabajo sustenta dicha eficacia. Sin embargo, debido a las características de la patogenia de la enfermedad puede haber microlesiones no detectables macroscópicamente²⁵. Esta situación puede favorecer un escenario donde la inspección bromatológica en playa de faena no sea suficiente y en el que las vísceras actúen como fuente de infección de los animales que consumen el alimento crudo. Esto puede estar potenciado por la costumbre de alimentar a los gatos con pulmón bovino (popularmente conocido como bofe) crudo fuertemente instaurada en ciertas regiones de la Argentina²⁸. Como antecedente, se estudiaron 19 aislamientos de *M. bovis* de gatos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), donde la fuente de infección más probable fue la alimentación con bofe crudo²⁸.

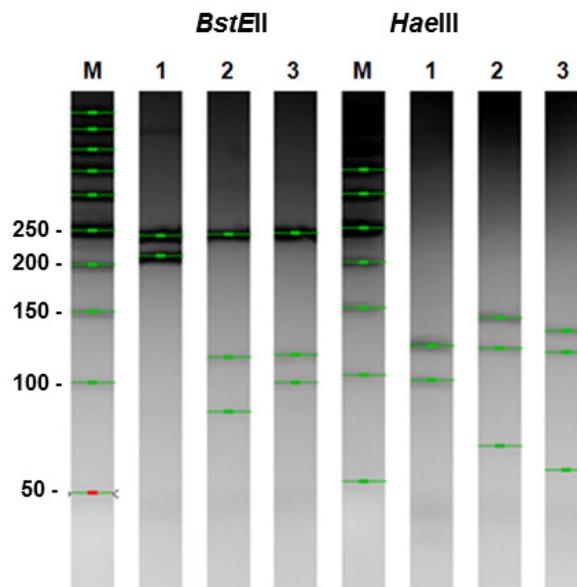


Figura 1: Gel de agarosa al 4% mostrando los patrones de restricción de PRA. A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares en pares de bases (pb). 1) *M. avium* subsp. *avium*; 2) *M. bovis*; 3) *M. avium* subsp. *intracellulare*; M: Marcador de peso molecular 50bp DNA Ladder (Promega Corp., USA).

Asimismo en un caso de tuberculosis séptica por *M. bovis* de una paciente de la CABA, la epidemiología del caso indicaba que la fuente de infección podría haber sido los gatos con los que cohabitaba y/o la manipulación de los bofes crudos con que los alimentaba diariamente⁶. Sin embargo, la mayoría de los casos de zoonosis detectados en la Argentina fueron por transmisión aerógena y tuvieron como factor de riesgo asociado la actividad laboral, como trabajadores de frigorífico, rurales y veterinarios, entre otros^{7,8}.

El hallazgo en este estudio de MI en una muestra de tejido pulmonar obtenido a partir de un bofe comprado en una carnicería de la zona oeste del conurbano bonaerense, reafirma la hipótesis que, a pesar de la rigurosa inspección veterinaria que se realiza en frigorífico, existen algunas micobacteriosis que pasan inadvertidas a la inspección de rutina. Dado que *Mycobacterium avium* subsp. *intracellulare* es un potencial patógeno para el hombre, es necesario que su presencia sea considerada en los productos librados al consumo ya que pueden producir enfermedad en personas inmunosuprimidas^{10,15}. Adicionalmente, el hecho que esta especie oportunista sea resistente natural a dos de los antibióticos usados en el tratamiento, isoniacida y ácido paraaminosalicílico⁹, es un factor que remarca la importancia de la identificación de este eventual oportunista.

CONCLUSIONES

El hallazgo de una micobacteria en un pulmón comprado en una carnicería, evidencia la necesidad de implementar medidas sanitarias y de educación apropiadas tanto para la manipulación de vísceras como para su cocción, y evitar que se administren a las mascotas en estado crudo. Asimismo, la utilización de métodos moleculares contribuye con la identificación precisa de los microorganismos permitiendo una mejor comprensión y accionar ante la ocurrencia de los distintos casos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, proyecto PICT2012 N°0368.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez J.; Gómez García I.; Aranaz A., et al. Genetic Diversity of *Mycobacterium avium* Isolates Recovered from Clinical Samples and from the Environment: Molecular Characterization for Diagnostic Purposes. *J Clin Microbiol.* 2008; 46 (4): 1246-1251.
2. Araújo C.P.; Osório A.L.; Jorge K.S; et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLoS One.* 2014; 9(3):e91023.
3. Araújo C.P.; Osório A.L.; Jorge K.S., et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(2):633-40.
4. Barandiaran S.; Pérez A.M.; Gioffré A.K.; Martínez Vivot M.; Cataldi A.A.; Zumárraga M.J. Tuberculosis in swine co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium bovis* in a cluster from Argentina. *Epidemiol Infect.* 2015; 143(5):966-74.
5. CEPANZO, (1988). Manual de normas técnicas para Bacteriología de la Tuberculosis. 1 La muestra. El examen microscópico. OMS. Nota técnica 26, pp.30.
6. Colmegna I.; Ricci B.G.; Zumárraga M., et al. *Mycobacterium bovis* and septic glenohumeral arthritis. *Clin Rheumatol.* 2004; 23(4):379-80.
7. de Kantor I.N.; Ambroggi M.; Poggi S.; et al. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis* (Edinb). 2008; 88(4):358-65.
8. Etchechoury I.; Valencia G.E.; Morcillo N.; et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57: 375-81.
9. Imperiale B.; Zumárraga M.; Gioffré A.; Di Giulio B.; Cataldi A.; Morcillo N. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Rev Argent Microbiol.* 2012; 44(1):3-9.
10. Kim S.H.; Son D.W.; Lee S.W.; Song G.S. An unusual case of post-operative spondylitis caused by

- Mycobacterium intracellulare* in an immunosuppressed patient. *J Korean Neurosurg Soc.* 2011; 50(5):460-3.
11. Kirschner P; Bottger E.C. Species Identification of Mycobacteria Using rDNA Sequencing. *Mycobacteria Protocols.* 1998; Volume 101 of the series *Methods in Molecular Biology*TM pp 349-361.
 12. Kríz P; Slaný M.; Shitaye J.E.; Pavlík I. Avian mycobacteriosis in humans remains a threat in the Czech Republic. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2010; 16(1):10-7.
 13. Murdoch D.M.; McDonald J.R. *Mycobacterium avium-intracellulare* cellulitis occurring with septic arthritis after joint injection: a case report. *BMC Infect Dis.* 2007; 7:9.
 14. Nakata N.; Fujiwara N.; Naka T.; Yano I.; Kobayashi K.; Maeda S. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure of glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol.* 2008; 190(3):1064-71.
 15. Negatu, Y.; Mekonen, E. A case report of *Mycobacterium avium complex* peritonitis in an AIDS patient. *Case Rep Infect Dis.* 2013; 2013: 590478.
 16. Oloya J.; Kazwala R.; Lund A. et al. Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. *BMC Microbiol.* 2007; 7:95.
 17. Pezzone N.; Eberhardt A.T.; Fernández A., et al. *Mycobacterium intracellulare* infection in a capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *J Zoo Wildl Med.* 2013; 44(4):1098-101.
 18. Rindi L.; Garzelli C. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet Evol.* 2014; 21: 375-83.
 19. Saitanu K., Holmgaard P. An epizootic of *Mycobacterium intracellulare*, serotype 8 infection in swine. *Nord Vet Med.* 1977; 29(4-5):221-6.
 20. Schluger N.W. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections in older adults. *Clin Chest Med.* 2007; 28(4):773-81.
 21. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agropecuaria. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina, 2014. http://www.senasa.gov.ar/prensa/DNSA/dir_programacion_sanitaria/Prog.Nacional_Control-Eradicacion_Tuberculosis_Bovina/Situacion_tuberculosis_bovina_en_la_Republica_Argentina_2014.pdf
 22. Song J.Y.; Park C.W.; Kee S.Y.; et al. Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in an immunocompetent pregnant woman. *BMC Infect Dis.* 2006; 6:154.
 23. Telenti, A.; Marchesi, F.; Balz, M.; Bally, F.; Bottger, E. C.; Bodmer, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(2): 175:78.
 24. Thorel M.F.; Huchzermeyer H.F.; Michel A.L. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev Sci Tech.* 2001; 20 (1):204-18.
 25. Zanella G.; Duvauchelle A.; Hars J.; Moutou F.; Boschioli M.L.; Durand B. Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Vet Rec* 2008; 163, 43-47.
 26. Zumárraga M.J., Paolicchi F., Garbaccio S., Gioffré A. y Cataldi A. Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido de terneros. *Veterinaria Argentina* 2001; Vol.XVIII N°179: 669-677.
 27. Zumárraga M.J.; Meikle V.; Bernardelli A.; Abdala A.; Tarabla H.; Romano M.I.; Cataldi, A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17(3):232-8.
 28. Zumárraga M.J.; Martínez Vivot M.; Marticorena D.; et al. *Mycobacterium bovis* in Argentina: isolates from cats typed by spoligotyping. *Rev Argent Microbiol.* 2009; 41(4):215-7.