

## UTILIZACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LA IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIA DE CRECIMIENTO RAPIDO

MAYE BERNAL R.,\* LUIS CARLOS OROZCO V.\*\*

**Se realizó un estudio para evaluar la prueba de los hidratos de carbono en la identificación de microorganismos del género *Mycobacterium* de crecimiento rápido. Se encontró que este tipo de pruebas puede ser fácilmente utilizable estandarizando el procedimiento mediante el cultivo sobre el medio de Tsukamura adicionado del hidrato de carbono correspondiente usando como indicador de pH, el indicador de Andrade, una temperatura de incubación de 37°C y un inóculo de 0,2 ml de una suspensión de aproximadamente 1 g de masa bacilar por ml.**

### INTRODUCCION

La utilización de los hidratos de carbono y la formación de ácido a partir de los mismos ha sido extensamente usada en la identificación de microorganismos, particularmente en aquellos de rápido crecimiento, como las enterobacterias (1). Sin embargo, este tipo de pruebas no ha sido evaluado suficientemente en el diagnóstico de los microorganismos del género *Mycobacterium*. El presente trabajo fue realizado con el objeto de explorar la utilización de estas pruebas en nuestro medio, normalizar una técnica reproducible y evaluar un adecuado medio de cultivo para microorganismos del género *Mycobacterium* de crecimiento rápido.

### MATERIALES Y METODOS

#### Cepas:

Se seleccionaron quince cepas de *Mycobacterium* de crecimiento rápido, del cepario del Grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.

#### Medios de Cultivo:

Se seleccionó el medio básico de Tsukamura (2) y se utilizaron dos tipos de indicadores: el azul de bromotimol, recomendado por Tsukamura y el de Andrade recomendado por nosotros.

#### Hidratos de Carbono:

Se utilizaron doce hidratos de carbono (arabinosa, dulcitol, fructosa, galactosa, glucosa, inositol, manitol, ramnosa, sorbitol, sucrosa, trealosa y xilosa), obtenidos comercialmente (Difco, BBL, Merck y Sigma).

Cada una de las cepas del estudio se cultivó en medio de Lowenstein Jensen; después de una incubación de 8 días, la cepa se emulsionó en solución salina fisiológica y se dió a la suspensión una turbidez igual al tubo No. 3 de la escala de McFarland. De cada una de estas suspensiones se tomó con pipeta una cantidad de 0,2 ml y se depositó sobre la superficie inclinada del medio que contenía el hidrato de carbono.

\* Bacterióloga, Grupo de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud.

\*\* Jefe, Grupo de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud.

UTILIZACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LA IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIA . . . . .

Este medio está constituido según formulación de Tsukamura (2) así:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	2,65	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,5	g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5	g
Extracto de levadura . . . . .	0,2	g
Agar . . . . .	20	g
Azul de bromotimol 0,2 o/o (p/v) en NaOH 0,02M . . . . .	20	ml
Agua destilada . . . . .	980	ml

Para algunos experimentos se utilizó, en vez de azul de bromotimol, el indicador de Andrade en la misma forma que se utiliza en el estudio de las enterobacterias, según lo recomendado por Ewing (3).

Para preparar el medio se mezclaron todos los componentes, ajustando sus cantidades al número de litros requeridos, se disolvieron por calentamiento teniendo cuidado de agitar constantemente. El pH fue ajustado a 7,0 con NaOH 1N y luego se distribuyó en fiolas en cantidades de 200 ml, las cuales se esterilizaron a 15 libras de presión por 30 minutos, manteniéndose posteriormente en baño maría a 80°C, para adicionarles el hidrato de carbono correspondiente, a una concentración final de 0,5% (p/v); el pH fue nuevamente ajustado a 7,0 con NaOH 1N. Finalmente, se distribuyó en tubos de ensayo de tapa-rosca de 13 X 100, en cantidades de 6 ml y se esterilizó nuevamente a 10 libras de presión por 10 minutos, luego de lo cual se colocaron en posición inclinada para dejarlos solidificar. El medio así preparado fue conservado a 4°C hasta su utilización.

Con el objeto de buscar las condiciones de estandarización, se seleccionaron las siguientes especies de *Mycobacteria*:

- M *chelonei*
- M *diernhoferi*
- M *fortuitum*
- M *phlei*
- M *vaccae*

utilizándose de cada una de ellas varias cepas para determinar si el patrón de utilización de los hidratos de carbono era reproducible. Para precisar si la densidad del inóculo influía en la utilización del hidrato de carbono se hicieron experimentos utilizando en unos una concentración de 1 g de masa bacilar por ml que corresponde al patrón No. 3 de McFarland y en otros una concentración de 10 g que corresponde al tubo No. 10.

Igualmente, se utilizó incubación a diferentes temperaturas con el fin de determinar la temperatura óptima; algunos experimentos fueron incubados a 30°C y otros a 37°C; también se utilizaron dos tipos de indicadores en unos se utilizó el indicador de Andrade y en otros se utilizó el azul de bromotimol. Las lecturas se realizaron a los 15 y 20 días de incubación.

## RESULTADOS

Cada una de las especies estudiadas mostró un patrón de producción de ácido a partir de los hidratos de carbono específico y reproducible, lo cual permite su identificación. En la tabla No. 1 se muestra un ejemplo de dos de las cepas patrón incluidas en este estudio; estos datos son coincidentes con los hallazgos de otros autores, como puede verse en la tabla No. 2 (2, 4-9). No se observó ninguna diferencia cuando se utilizó un inóculo de 1 g o de 10 g de masa bacilar por ml. No se observó tampoco diferencia consistente cuando se incubó a 30°C ó 37°C. La tabla No. 3 muestra claramente que la reproducibilidad del test es mayor con el indicador de Andrade (indicador 1) que con el azul de bromotimol (indicador 2).

El análisis global del resultado del estudio demuestra que se debe utilizar un inóculo que corresponda a 1 g de masa bacilar por ml, una temperatura de incubación de 37°C por facilidad práctica y como indicador de pH, el indicador de Andrade.

## DISCUSION

Los estudios de fisiología bacteriana han demostrado que las micobacterias pueden asimilar distintos tipos de hidratos de

TABLA Nº 1. PRUEBAS DE HIDRATOS DE CARBONO EN LA IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS. 1- *M. phlei* , 2- *M. vaccae*

Azúcar Nº Ensayos	Arabinosa		Dulcitol		Fructosa		Galactosa		Glucosa		Inositol		Manitol		Ramnosa		Sorbitol		Sucrosa		Trealosa		Xilosa		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
6	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
7	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
8	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

oqt

TABLA Nº 2. Identificación de Mycobacteria por pruebas de Hidratos de Carbono.

	aurum	austroafricanum	chelonei	chiitae	diernhoferi	duvalii	fortuitum	gadium	gilvum	komossense	neoaerum	obuense	parafortuitum	phlei	rhodesiae	smegmatis	sphagni	senegalense	thermore-sistibile	vaccae
ARABINOSA	+		-	-	+	-	-	-	-	-	80	+	80	+	-	+	2		-	90
DULCITOL	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-		-	-
FRUCTOSA	+		7/16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GALACTOSA	40		-	-	-	-	-	-	-	-	70	-	20	+	-	+	2		-	10
GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
INOSITOL	+		-	+	+	-	11	V	+	39	+	V	75	-	+	+	+		-	+
LACTOSA	-							-	-			V			-					-
LEVULOSA	+					+		V	+			+		+						+
MALTOSA	-					-		-	-			-			-					-
MANITOL	+		-	+	+	+	11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	+
MANOSA	+	9			+	+	+	+	+	67	+	+	+	V	+	+	+		-	V
RAFINOSA	V					-		-	-			-			-					-
RAMNOSA	80		-	-	-	-	-	-	-	+	50	-	30	-	-	+	2		-	+
SORBITOL	80		-	-	-	+	-	+	+	+	10	+	75	+	-	+	-		-	+
SUCROSA	80		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75	-	-	-			-	+
TREALOSA	+		+	+	+	+	+	-	+	94	+	-	+	+	-	+	90		-	+
XILOSA	+		-	-	+	-	-	-	-	-	80	-	95	+	+	80	2		-	+

oqt

+ Indica que el 100 o/o de las cepas probadas producen ácido.

V Indica que el 50 o/o de las cepas probadas producen ácido.

- Indica que el 100 o/o de las cepas probadas no producen ácido.

Los números indican el porcentaje de cepas probadas que producen ácido.

UTILIZACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LA IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIA.....

TABLA Nº 3 Porcentaje de reproducibilidad de las pruebas de Hidratos de Carbono en las cepas estudiadas.

1. Indicador de Andrade. 2. Indicador de Azul de Bromotimol

Nº Cepa	INDI-CADOR	Arabí-nosa	Dulci-tol	Fructo-sa	Galaç-tosa	Glucosa	Inosi-tol	Mani-tol	Ramno-sa	Sorbi-tol	Sucro-sa	Trea-losa	Xilo-sa
22	(n=7) 1	100	100	100	100	100	100	100	71	100	100	100	100
	(n=3) 2	100	100	67	100	100	100	100	67	100	100	100	100
23	(n=6) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83	100
	(n=2) 2	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100
522	(n=5) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=2) 2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
218	(n=4) 1	100	100	100	100	100	100	75	100	100	100	100	100
	(n=3) 2	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	75	100
497	(n=5) 1	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=2) 2	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100
340	(n=4) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=2) 2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
25	(n=6) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=3) 2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
41	(n=7) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=3) 2	67	100	100	67	100	100	67	100	100	100	67	100
58	(n=5) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=2) 2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50	100
72	(n=8) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	63	100	100
	(n=3) 2	100	100	67	67	100	100	100	67	100	100	67	100
183	(n=6) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=3) 2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
185	(n=7) 1	100	100	100	67	100	100	71	100	100	100	100	100
	(n=3) 2	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100	67	100
66	(n=5) 1	50	100	100	67	60	100	100	100	100	60	100	60
	(n=3) 2	100	100	100	67	100	67	100	100	100	100	100	100
374	(n=6) 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	(n=3) 2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
375	(n=6) 1	100	100	100	100	50	100	100	83	100	100	83	100
	(n=3) 2	67	100	67	67	100	67	100	67	100	67	67	100

carbono a través de un complejo equipo enzimático y metabolizarlos, hasta un metabolito intermediario: el piruvato.

Sin embargo, la manera como los azúcares son transportados del exterior al interior de las micobacterias, no está claramente establecido y no existe mucha información al respecto. El sistema de traslocación para la toma de los azúcares que involucran un sistema de fosfoenol-piruvato dependiente de la fosforilación del hidrato de carbono ha sido ciertamente demostrado en algunos procariontes pero este proceso no ocurre en *M. smegmatis* y probablemente tampoco en otras micobacterias (10). Esto se debe probablemente a que el sistema fosfoenol-piruvato dependiente está confinado a los anaerobios facultativos y a los anaerobios estrictos, los cuales poseen un sistema glicolítico anaeróbico (11). Estos investigadores han demostrado que el *M. smegmatis* posee un sistema constitutivo para la toma de la glucosa y puede ser inhibido por el dinitrofenol y la azida. Para la toma de la fructosa, el microorganismo posee un sistema inducible o adaptativo, en otras palabras, un sistema que se aumenta cuando se cultiva el microorganismo sobre fructosa.

Además de utilizar un gran número de pentosas y pentoles, las micobacterias

pueden utilizar numerosos hexoles y hexosas. El *M. smegmatis* crece más rápidamente sobre fructosa, manosa y manitol que sobre glucosa (12). La micobacteriología en la actualidad busca obtener la identificación exacta de las especies del género para lo cual es necesario utilizar una gran variedad de pruebas de tipo bioquímico. Las pruebas de hidratos de carbono han sido usadas desde los inicios de la bacteriología, habiendo tenido su máxima utilidad en el estudio de las enterobacterias (1), en donde ha permitido la clara definición de las distintas especies que integran la familia Enterobacteriaceae.

En el estudio de la micobacteriología en nuestro medio, estas pruebas no han sido lo suficientemente evaluadas y normalizadas como para introducirlas de rutina. Los resultados del trabajo preliminar aquí presentados, nos permiten predecir que adecuadamente estandarizadas, pueden tener gran utilidad en la identificación de especies. El medio recomendado por Tsukamura (2) que empleamos como medio básico, permite un buen desarrollo de las especies estudiadas; el indicador de Andrade por su gran sensibilidad, permite una fácil lectura (Fig. No. 1); además de que detecta más rápidamente el cambio de pH, no permite su reversión y es menos costoso (3); es por lo tanto, el indicador que recomendamos utilizar. La lectura de las

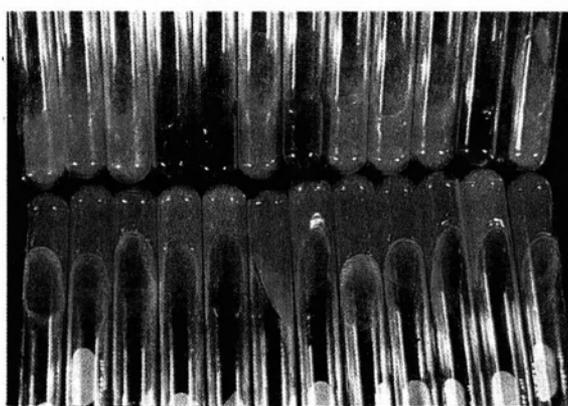


Figura No. 1. Muestra una prueba de utilización de hidratos de carbono. La prueba superior utilizando azul de bromotimol y la inferior utilizando el indicador de Andrade.

pruebas en el día 20 permite definir aquellas lecturas que fueron débiles en la lectura inicial, hecha a los 15 días de incubación. Durante la realización de los experimentos se encontró que es importante que la suspensión del microorganismo en estudio sea hecha en una solución salina buffer de pH 7,0 ya que si este pH no es controlado puede falsear los resultados. Sería conveniente, partiendo de la estandarización aquí propuesta, realizar un estudio posterior con un número extenso de cepas para definir el porcentaje de positividad o negatividad de producción de ácido a partir del hidrato de carbono por parte de cada una de ellas.

#### SUMMARY

An experimental study to evaluate the carbo-hydrate test in the identification of rapid growing microorganisms from genus *Mycobacterium* was performed. It was found that this kind of tests are very useful standardizing the procedure by culturing the microorganisms on Tsukamura medium adding to this the respective carbo-hydrate; as pH indicator Andrade's indicator was found as the most convenient; the optimal incubation temperature was 37°C, the reading of the tests was best performed on the 20th day of incubation given a sharp result; it also was found that 1 g/ml of bacillary mass was optimal inoculum.

#### BIBLIOGRAFIA

1. McFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana. Buenos Aires. 1980
2. Tsukamura M. Adansonian Clasification of *Mycobacteria*. J. Gen. Microbiol. 1966; 45: 253.
3. Ewing WH, Davis BR. Media and for differentiation of Enterobacteriaceae. US Department of Health and Welfare, Public Health Service. Centers for Disease Control. Publicacion No. CDC 76-8236. 1970.
4. Saito H, Gordon RE, Juhlin I, et al. Cooperative numerical analysis of rapidly growing *Mycobacteria*. Second report. Internat. J. Systemat Bacteriol. 1977, 27: 75.
5. Casal M, Calero JR. *Mycobacterium gadium* sp. Nov. A new species of rapid-growing scotochromogenic *Mycobacteria*. Tubercle. 1974; 55: 299.
6. Tsukamura M, Van der Meulen HJ, Grobow WOK, Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic *Mycobacteria* of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. Nov. and *Mycobacterium diernhoferi* sp. Nov. nom. rev. Internat. J. System. Bacteriol. 1983; 33: 460.
7. Kazda J, Muller K. *Mycobacterium Komossense* sp. Nov. Internat. J. Systemat. Bacteriol. 1979; 29: 361.
8. Kazda J. *Mycobacterium sphagni* sp. Nov. Internat J. Systemat Bacteriol. 1980; 30: 77.
9. Goodfellow M, Wayne LG. Taxonomy and Nomenclature. Chapter 10 in: The Biology of the *Mycobacteria*. Volumen I, edited by Colin Ratledge and John Stanford. Academic Press 1982 London- New York.
10. Romano AH, Eberhard SJ, Dingle SL, McDowell td. The distribution of the phosphoenolpyruvate glucose phosphotransferase in bacteria, J Bacterol. 1970; 104:808.
11. Jayanthi Bai N, Romachandra Pai M, Suryanarayana Murthy P, Venkatasubramanian TA. Uptake and transport of hexoses in *Mycobacterium smegmatis*. Indian J. Biochem Biophys. 1978; 15:369.
12. Hey Ferguson A., Elbein AD. Purification of D-mannose isomerase from *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol. 1970; 101:777.