

# AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS MEDIOAMBIENTALES EN SUELOS DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA

Guillermo J. Ballarino, M. Verónica Eseverri, Andrea V. Salas, Víctor O. Giayetto, Silvia González, Lidia Wolff, Oscar Pessah.

Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas; Escuela de Medicina;  
Facultad de Ciencias Médicas; Universidad Nacional de Córdoba.

## Resumen

Durante los últimos años ha resurgido el interés por el estudio de las micobacterias medioambientales debido al aumento en incidencia de las micobacteriosis atípicas. Estudios realizados en todo el mundo señalan al suelo como una fuente importante de contaminación humana. En el país existen trabajos que documentan la prevalencia de las micobacteriosis atípicas en Córdoba (1997), y su aislamiento en suelos de La Pampa (1999). El objetivo fue demostrar la existencia de micobacterias medioambientales en suelos de la ciudad de Córdoba.

Se dividió la ciudad en nueve regiones. Se recogieron un total de 120 muestras en lugares de fácil acceso a suelos orgánicos; cada una se obtuvo en un área cuadrada de 10 cm de lado, hasta 1 cm de profundidad. Se conservaron en heladera hasta 7 días. Fueron homogeneizadas con agua tridestilada en relación 1:1, y decontaminadas según el método de Petroff. Se procedió a la siembra en medio de Lowestein-Jensen, y se incubó en estufa a 37°C con controles cada 7 días durante 2 meses. Se realizó tinción de Ziehl-Neelsen a los cultivos positivos.

Veintitrés muestras (19%) fueron descartadas por contaminación. En 20 muestras (17%) se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes. Las colonias obtenidas fueron enviadas para su identificación al Servicio de Micobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos G. Malbrán, a cargo de la Lic. Lucía Barrera. Hasta el momento uno de los aislamientos fue identificado como *Mycobacterium triviale*. Con respecto a la distribución regional de los aislamientos, se observó correlación entre el porcentaje de muestras positivas y el número de muestras obtenidas en espacios parquizados.

Se demostró la presencia de micobacterias medioambientales en suelos de la ciudad de Córdoba. Los resultados sugieren mayores probabilidades de aislamiento en parquizaciones y suelos habitados por animales. Nuevos trabajos permitirán aclarar características del suelo que favorecen la proliferación de micobacterias, el microorganismo aislado más frecuente, y tal vez brindar armas para la prevención de la enfermedad.

**Palabras claves:** micobacterias, medioambientales, atípicas, suelo, epidemiología, mycobacterium triviale.

## Abstract

The interest for the research on environmental mycobacteria has risen over the last decades, in part, due to a significant incidence rate rise. Reports from all over the world address the soil as the major source for human contamination. In Argentina two documents report the prevalence of atypical mycobacteriosis at Córdoba (1997), and the isolation of environmental mycobacteria from soils of the Province of La Pampa (1999) respectively. The aim of our study was to confirm the presence of environmental mycobacteria in soil of the city of Córdoba.

The map of the city was divided in 9 regions according to avenues and major streets distribution. A total of 120 soil samples were collected with spatula from a 10 x 10 cm square up to 1 cm deep. Samples were kept at 4°C no more than 7 days. Soil samples were homogenized with distilled water in a 1:1 proportion, and decontaminated according to Petroff's method. The cultures were made in Lowestein-Jehnsen media and incubated at 37°C controlling development every 7 days for

2 months. An acid-fast-bacilli smear was made from colonies obtained.

Twenty three cultures (19%) were discarded due to contamination. Twenty cultures (17%) developed acid fast bacilli (AFB). Colonies obtained were sent to the Mycobacteria Service of the *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos G. Malbrán*, in the city of Buenos Aires, for identification. A single isolation was identified as *Mycobacterium triviale*. A positive correlation was observed between the frequency of positive AFB isolation and the number of samples taken from park areas.

The presence of environmental mycobacteria in soils of Córdoba was confirmed. Results suggest higher odds of isolation in parklands and soils where animals live. Extensive works are needed to assess the features that allow and contribute the proliferation of mycobacteria in soils.

**Key Words:** mycobacteria, environmental, atypical, soil, epidemiology, mycobacterium triviale.

## Introducción

Durante los últimos años ha resurgido el interés por el estudio de las micobacterias medioambientales debido al aumento en incidencia de las micobacteriosis (3, 5, 6, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 34). Se ha sugerido que las micobacterias pueden hallarse en cualquier lugar del medioambiente (7, 8, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 34). Estudios realizados en todo el mundo señalan al suelo como una de las fuentes más importantes de colonización humana. En el país existen trabajos que documentan la prevalencia de las micobacteriosis por micobacterias medioambientales en la ciudad de Córdoba (1997) (31, 32, 33), y el aislamiento de micobacterias medioambientales en suelos de la provincia de La Pampa (1999) (22).

Un gran número de investigadores se embarcaron en la búsqueda de micobacterias en el medioambiente, desde que aparecieron los primeros indicios del aumento en su incidencia. Los compartimientos medioambientales más ampliamente estudiados en la literatura son el suelo (2, 8, 18, 20, 21, 34, 35), y el agua (4,

7, 9, 11, 12, 24, 30) de diferentes orígenes; en ambos, los aislamientos de micobacterias medioambientales abundan. Además, muchos investigadores comparan sus hallazgos medioambientales con la distribución de los casos clínicos para poder establecer una correlación entre ésta y la fuente hipotética (5, 7, 8, 9, 15, 21).

El objetivo de este trabajo fue demostrar la existencia de micobacterias medioambientales en suelos de la ciudad de Córdoba.

## Materiales y Métodos

**Muestras.** Se dividió a la ciudad de Córdoba en 9 regiones, denominadas con letras del alfabeto, desde la A hasta la I, considerando la Av. Circunvalación como límite externo del área total, y utilizando como criterio de división la distribución de calles y avenidas principales. Cada región se dividió posteriormente en 10 áreas más pequeñas, con el mismo criterio, para facilitar la distribución de los puntos de recolección. Entre julio y octubre del año 2000, se recogieron un total de 120 muestras (a razón de 1 o 2 por área) en lugares de fácil acceso a suelo orgánico. Se colocó sobre el mismo un marco de madera con dimensiones internas de 10 cm por 10 cm y con una espátula se obtuvo una porción de tierra hasta una profundidad de 1 cm. Las muestras se conservaron en heladera a 4°C durante 7 días hasta su procesamiento en el laboratorio.

**Procesamiento y Cultivo.** Cada muestra fue diluida y homogeneizada con agua estéril tridistilada, en proporción 1:1. Posteriormente se sometieron a un proceso de decontaminación según el método descrito por Petroff (1). Se procedió a la siembra del material en medio de Löwenstein-Jensen, y se incubó en estufa a 37°C (1). Los cultivos se examinaron cada 7 días durante 2 meses. Se realizó extendido y tinción de Ziehl-Neelsen (1) a los cultivos positivos. Se descartaron los cultivos contaminados. Los cultivos positivos fueron enviados al Servicio de Micobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos G. Malbrán, a cargo de la Lic. Lucía Barrera, para su identificación.

Tabla 1.

Región	n	Contaminadas n (%)	Viables	
			Negativas n (%)	Positivas n (%)
A	18	6 (33)	10 (56)	2 (11)
B	16	1 (06)	12 (75)	3 (19)
C	13	1 (08)	9 (69)	3 (23)
D	18	7 (39)	8 (44)	3 (17)
E	10	0 (00)	7 (70)	3 (30)
F	10	1 (10)	9 (90)	0 (00)
G	10	1 (10)	7 (70)	2 (20)
H	14	3 (21)	7 (50)	4 (29)
I	11	3 (27)	8 (73)	0 (00)
<b>Totales</b>	<b>120</b>	<b>23 (19)</b>	<b>77 (64)</b>	<b>20 (17)</b>

Gráfico 1. Resultados porcentuales del procesamiento de las muestras.

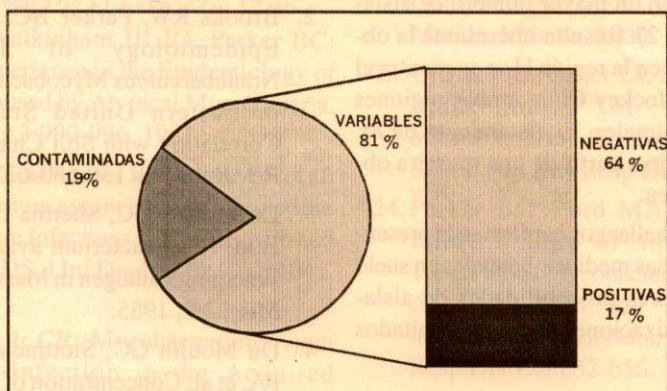
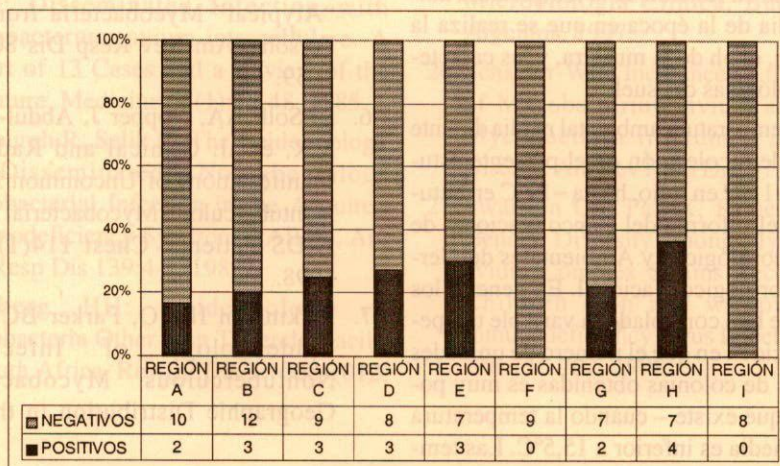


Gráfico 2. Resultados porcentuales del procesamiento de las muestras viables. Discriminación regional.



## Resultados

De las 120 muestras de suelo procesadas, 23 (19%) fueron descartadas por contaminación. Veinte (17%) muestras desarrollaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Las 77 muestras restantes (64%) dieron resultados negativos. Uno de los aislamientos fue identificado como *Mycobacterium triviale*; se aguardan los resultados de los restantes aislamientos. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla I y gráfico 1.

## Discusión

Se observa correlación positiva entre la distribución regional de los aislamientos (gráfico 2) y el número de muestras obtenidas en espacios parquizados abiertos. Dos de las regiones no presentaron tinciones positivas, y la región H presentó un mayor número de aislamientos (gráfico 2). Resulta interesante la observación de que en la región H se encuentra el hipódromo y el Jockey Club, ambas regiones habitadas por animales. El aislamiento de *M. triviale* se produjo a partir de una muestra obtenida de esta área.

Nuestros hallazgos confirman la presencia de micobacterias medioambientales en suelo y sugieren mayores probabilidades de aislamiento en parquizaciones y suelos habitados por animales.

Otros trabajos de la literatura disponible sobre el tema, plantean que los hallazgos a partir del cultivo de muestras medioambientales se modifican en función de la temperatura ambiente media de la época en que se realiza la recolección, el pH de la muestra, y las características ecológicas del suelo.

La temperatura ambiental media durante los meses de recolección en el presente estudio fue de ~11°C en julio, hasta ~19°C en octubre, según el informe del Banco Nacional de Datos Meteorológicos y Ambientales del Servicio Meteorológico Nacional. En general los trabajos que han controlado la variable temperatura coinciden en que el número de unidades formadoras de colonias obtenidas es muy pobre – si es que existe – cuando la temperatura ambiente media es inferior a 15,5°C. Las tem-

peraturas óptimas serían aquellas que superan los 20°C (2, 3, 9, 12).

Otros investigadores hallaron mayor número de aislamientos en suelos con pH ácido (2).

No se tomaron las consideraciones necesarias para clasificar a los suelos de acuerdo a sus características ecológicas. Sin embargo, resulta interesante la observación de que el aislamiento de *M. triviale* provino de una muestra de aserrín que servía de lecho a caballos de carrera. Otros trabajos mencionan la relación entre las características del suelo y la recuperación de micobacterias (20, 35).

## Bibliografía

1. Balows A, Hausler Jr WJ, Hermann KL, et al: Manual of Clinical Microbiology. 5ta Ed. American Society of Microbiology, 1203-1315, 1991.
2. Brooks RW, Parker BC, Gruft H, et al: Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. V. Numbers in Eastern United States Soils and Correlation with Soil Characteristics. Am Rev Resp Dis 130:630-633, 1984.
3. Du Moulin GC, Sherma IH, Hoaglin DC, et al: Mycobacterium avium Complex, an Emerging Pathogen in Massachusetts. J Clin Mic 22:9, 1985.
4. Du Moulin GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, et al: Concentration of Mycobacterium avium by Hospital Hot Water Systems. JAMA 260:1599, 1988.
5. Edwards LB, Palmer CE: Isolation of "Atypical" Mycobacteria from Healthy Persons. Am Rev Resp Dis 80:747-749, 1959.
6. El-Solh AA, Nopper J, Abdul-Khoudoud MR, et al: Clinical and Radiographic Manifestations of Uncommon Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease in AIDS Patients. Chest 114(1):138-145, 1998.
7. Falkinham III JO, Parker BC, Gruft H: Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. I. Geographic Distribution in the Eastern

- United States. *Amer Rev Resp Dis* 121:931-937, 1980.
8. Fry KL, Meissner PS, Falkinham III JO: Epidemiology of Infection by Non tuberculous Mycobacteria. VI. Identification and Use of Epidemiologic Markers for Studies of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium scrofulaceum. *Am Rev Resp Dis* 134:39-43, 1986.
  9. George KL, Parker BC, Gruft H, et al: Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. II. Growth and Survival in Natural Waters. *Am Rev Resp Dis* 122:89-94, 1980.
  10. Good RC, Snider Jr DE: From the Centers for Disease Controls. Isolation of Nontuberculous Mycobacteria in the United States. *J Inf Dis* 146(6):829-833, 1982.
  11. Goslee S, Wolinsky E: Water as a Source of Potentially Pathogenic Mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* 113:287-292, 1976.
  12. Gruft H, Falkinham III JO, Parker BC: Recent Experience in the Epidemiology of Disease Caused by Atypical Mycobacteria. *Rev Inf Dis* 3:990-996, 1981.
  13. Guthertz LS, Damsker B, Bottone EJ, et al: Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare Infections in Patients with and without AIDS. *J Inf Dis* 160(6):1037-1041, 1989.
  14. Horsburgh Jr CR: Mycobacterium avium Complex Infection in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med* 324(19):1332-1338, 1991.
  15. Horsburgh Jr CR, Mason III UG, Farhi DC, et al: Disseminated Infection with Mycobacterium avium-intracellulare. A Report of 13 Cases and a Review of the Literature. *Medicine* 64(1):36-48, 1985.
  16. Horsburgh R, Selik R: The Epidemiology of Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *Am Rev Resp Dis* 139:4-7, 1989.
  17. Kleeberg HH: Epidemiology of Mycobacteria Other than Tubercle Bacilli in South Africa. *Rev Inf Dis* 3:1008-1012, 1981.
  18. Kubica GP, Beam RE, Palmer JW: A Method for the Isolation of Unclassified Acid-fast Bacilli from Soil and Water. *Am Rev Resp Dis* 88:718-720, 1963.
  19. Masur H: Mycobacterium avium-intracellulare: Another Scourge for Individuals with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *JAMA* 248(22):3013, 1982.
  20. Meissner G, Anz W: Sources of Mycobacterium avium Complex Infection Resulting in Human Diseases. *Am Rev Resp Dis* 116:1057-1064, 1977.
  21. Nel EE: Mycobacterium avium-intracellulare Complex Serovars Isolated in South Africa from Humans, Swine and the Environment. *Rev Inf Dis* 3(5):1013, 1981.
  22. Oriani DS, Sugardoy MA: Micobacterias no Tuberculosas (MNT) en Suelos de la Provincia de La Pampa. XV Congreso Latinoamericano de Microbiología - XXXI Congreso Nacional de Microbiología. Merida, México, 2000.
  23. O'Brien RJ, Geiter LJ, Snider Jr. DE: The Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Diseases in the United States. *Am Rev Resp Dis* 135:1007, 1987.
  24. Parker BC, Ford MA, Gruft H, et al: Epidemiology of Infection by non Tuberculous Mycobacteria. IV. Preferential Aerosolization of Mycobacterium intracellulare from Natural Waters. *Am Rev Resp Dis* 128:652-656, 1983.
  25. Pérez H, Kaufman S, Barrera L, et al: Micobacteriosis y HIV. [abstract 350] I Congreso Internacional de Infectología y Microbiología Clínica, Buenos Aires, Argentina, 1997.
  26. Schaefer WB: Incidence of the Serotypes of Mycobacterium avium and Atypical Mycobacteria in Human and Animal Disease. *Am Rev Resp Dis*, 97:18-22, 1968.
  27. Swanson OS, Pan X, Kline MW, et al: Genetic Diversity among Mycobacterium avium Complex Strains Recovered from Children with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Inf Dis* 178:776-782, 1998.

28. Thoen CO, Karlson AG, Himes EM: Mycobacterial Infection in Animals. *Rev Inf Dis* 3(5):960-971, 1981
29. Wayne LG, Sramek: Potentially Pathogenic Enviromental Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 5:1-19, 1992.
30. Wendt SL, George KL, Parker BC, et al: Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. III. Isolation of Potentially Pathogenic Mycobacteria from Aerosols. *Am Rev Resp Dis* 122:259, 1980.
31. Wolff LS, Giayetto VO, Barrera L, et al: Infección mixta por *Mycobacterium avium* - *Mycobacterium simiae* en un paciente con SIDA. [abstract N7] VIII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina, 1998.
32. Wolff LS, Giayetto VO: *Mycobacterium avium* Complex (MAC): un protagonismo cambiante. [abstract A-047] III Congreso Argentino de SIDA. Mar del Plata, Argentina, 1997.
33. Wolff LS, Giayetto VO, González S, et al: Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* (TM) and Nontuberculous Mycobacteria (NTM) between ordinary population and patients with AIDS. [abstract 75008] 9<sup>th</sup> International congress on Infectious Diseases. Buenos Aires, Argentina, 2000.
34. Wolinsky E: Nontuberculous Mycobacteria and Associated Diseases. *Am Rev Resp Dis* 119:107-159, 1979.
35. Wolinsky E, Rynearson KT: Mycobacteria in Soil and their Relation to Disease-associated Strains. *Am Rev Resp Dis* 97:1032-1037, 1968.