

Revista de la Facultad de Medicina

Volumen
Volume **46**

Número
Number **3**

Mayo-Junio
May-June **2003**

Artículo:

Viabilidad de micoplasmas de interés médico en presencia de diferentes antibióticos

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Facultad de Medicina, UNAM

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Artículo original

Viabilidad de micoplasmas de interés médico en presencia de diferentes antibióticos

José Antonio Rivera Tapia,¹ Omar Romero Arenas,² Ma. del Rayo Santellan Olea,³ Cristian Román Méndez³

¹Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

²Escuela de Biología de la BUAP.

³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Resumen

La importancia médica de los micoplasmas se debe a su relación con diversas enfermedades como las articulares, del tracto respiratorio, tracto urogenital; incluso se les ha considerado como cofactor del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se estudió la viabilidad de los micoplasmas en presencia de diversos antibióticos que no interfieran en su metabolismo y facilitan su aislamiento. *Mycoplasma fermentans* en presencia de los antibióticos vancomicina, bacitracina, ceftriaxona, netilmicina y amikacina presentó un metabolismo lento, respecto a los demás micoplasmas evaluados. *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma pneumoniae* presentaron crecimiento a las 24 horas en presencia de los antibióticos utilizados.

Palabras clave: *Mycoplasmas, viabilidad, medio de cultivo, aislamiento.*

Summary

Medical importance of mycoplasmas is related with various illnesses such as joint, respiratory and urogenital tract diseases. It has even been considered as cofactor of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Viability of mycoplasma was studied in various culture media with different antibiotics that do not interfere with its metabolism and facilitate its isolation. *Mycoplasma fermentans* in presence of vancomycin, gentamycin, bacitracin, ceftriaxone, netilmycin and amikacin shows a slow metabolism, in comparison with other mycoplasmas. *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae* presented growth at 24 hours in presence of these antibiotics.

Key words: *Mycoplasmas, viability, culture medium, isolation.*

Introducción

Los micoplasmas representan a los microorganismos de vida libre autorreplicables más pequeños hasta ahora descritos. Además presentan características fenotípicas y genotípicas particulares como son la ausencia de pared celular, formas pleomórficas, un genoma reducido pero con información genética capaz de sintetizar diversos tipos de enzimas que les han permitido destacar como parásitos exitosos.¹

Son 16 las especies de micoplasmas las que se han aislado a partir de tejidos o fluidos de humanos. El sitio de colonización y su substrato metabólico son esenciales para mantener su viabilidad tanto en sus hospederos como en medios de cultivo.²

Mycoplasma pneumoniae se reconoce como un patógeno común respiratorio, particularmente en gente joven, reportándose que causa un 20% de los casos de neumonía en la población en general. *Mycoplasma hominis* está involucrado con la enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis posparto y en neonatos se considera agente causal de meningitis.³⁻⁴ Además este micoplasma se asocia a otras infecciones como la prostatitis y cistitis.⁵

Aislamientos frecuentes de *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma fermentans* se han reportado de pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), los aislamientos se han hecho a partir de médula ósea, articulaciones, tracto respiratorio y urogenital.⁶

El aislamiento de micoplasmas representa un problema en el laboratorio, ya que estos microorganismos son muy exigentes desde el punto de vista nutricional y sensibles a los cambios de pH. De tal forma cuando se intenta realizar un aislamiento primario a partir de una muestra, la cual viene acompañada del resto de la flora microbiana propia del sitio anatómico del cual se tomó en el hospedero, comúnmente no se logran aislar viables a los micoplasmas. Es cierto que existen las técnicas de biología molecular que permiten determinar la presencia del material genético de los microorganismos, pero en ciertas ocasiones se requiere de recu-

perarlos viables para estudios diversos. Por tanto, la combinación de un medio de cultivo para micoplasmas, como puede ser el caldo Eaton o el SP-4, con una mezcla de antibióticos que no interfieran en su metabolismo se plantea en el presente trabajo.

Material y métodos

Material biológico

Las cepas de referencia *Mycoplasma pneumoniae* (cepa Eaton), *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma hominis* PG21, *Mycoplasma fermentans* PG-18 y *Mycoplasma penetrans* GTU-54 fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla (CIM-ICBUAP).

Medios de cultivo

Caldo Eaton para micoplasmas: 65 mL de agua destilada, 2 g de base para micoplasmas Becton Dickinson, 0.5 g de dextrosa, 1 mL de rojo de fenol al 0.4%, 25 mL de suero de caballo *Hy Clone*, 10 mL de dializado de levadura.

Agar Eaton: 65 mL de agua destilada, 2.0 g de base para micoplasmas Becton Dickinson, 0.5 g de dextrosa, 1.3 g de agar bacteriológico, 25 mL de suero de caballo *Hy Clone*, 10 mL de dializado de levadura.

Cultivo de las cepas

En caldo Eaton se cultivaron las cepas a 37° C bajo condiciones aerobias, una vez obtenido el crecimiento de cada una de las cepas de micoplasmas se procedió a ajustar el inóculo con el cual se trabajaría (1×10^6 UFC/mL) por medio de diluciones decimales. El inóculo se confirmó resembrando 5 μ L de los cultivos en agar Eaton, incubándose a 37° C y realizando la cuenta al microscopio estereoscópico.

Antibióticos evaluados en el trabajo

Se utilizaron los antibióticos amikacina 30 μ g, vancomicina 30 μ g, netilmicina 30 μ g, gentamicina 10 μ g, ceftriaxona 30 μ g, trimetoprim-sulfametoazol (SXT) 25 μ g, bacitracina 10 UI y penicilina 10 UI (Sensi-Disc Becton Dickinson and Company BBL™).

Esquema de trabajo I

Cada una de las cepas utilizadas se sometieron al siguiente tratamiento: en series de ocho tubos se depositaron 800 μ L de caldo Eaton más 200 μ L de cepa (1×10^6 UFC/mL) y un Sensi-Disc Becton Dickinson de cada uno de los antibióticos ensayados (cuadro 1), las muestras se incubaron a 37° C hasta presentarse el vire del indicador metabólico (24-72 horas). Cada serie de ocho tubos se repitió diez veces y contaron con sus cultivos control por duplicado. A partir de cada una de las muestras se resembraron 5 μ L en agar Eaton y se incubaron a 37° C para corroborar la viabilidad de los micoplasmas por medio de microscopia estereoscópica.

Esquema de trabajo II

Cada una de las cepas utilizadas se sometieron al siguiente tratamiento: en series de cuatro tubos se depositaron 800 μ L de caldo Eaton más 200 μ L de cepa (1×10^6 UFC/mL) y combinaciones de antibióticos (cuadro 2), las muestras se incubaron a 37° C hasta presentarse el vire del indicador metabólico (24-72 horas). Cada serie se repitió diez veces y contaron con sus cultivos control por duplicado. A partir de cada una de las muestras se resembraron 5 μ L en agar Eaton y se incubaron a 37° C para confirmar la viabilidad del microorganismo por medio de microscopia estereoscópica. Los experimentos dos y tres consistieron en variar las combinaciones de antibióticos ensayados (cuadro 2). Los datos obtenidos se sometieron a la prueba estadística de Kruskal-Wallis (Software INSTAT versión 2).

Cuadro 1. Tiempo en horas en que se presenta crecimiento de micoplasmas en presencia de diferentes antibióticos.

Antibiótico	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. pirum</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. penetrans</i>
SXT *	24 h	48 h	24 h	48 h.	48 h
Vancomicina	24 h	48 h	48 h	72 h	24 h
Netilmicina	24 h	48 h	48 h	48 h	24 h
Gentamicina	24 h	24 h	48 h	24 h	24 h
Bacitracina	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
Ceftriaxona	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
Amikacina	24 h	48 h	24 h	72 h	48 h
Penicilina	24 h	24 h	24 h	24 h	48 h

* Trimetoprim-sulfametoazol

Cuadro 2. Tiempo en horas en que se presenta crecimiento de micoplasmas en presencia de dos antibióticos.

Antibióticos	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. pirum</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. penetrans</i>
SXT,* ceftriaxona	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h
Penicilina, gentamicina	24 h	48 h	48 h	72 h	24 h
Bacitracina, vancomicina	24 h	48 h	48 h	72 h	48 h
Netilmicina, amikacina	48 h	48 h	72 h	72 h	48 h
SXT,* penicilina	24 h	24 h	24 h	48 h	24 h
Ceftriaxona, gentamicina	48 h	24 h	72 h	72 h	24 h
Bacitracina, netilmicina	24 h	24 h	24 h	48 h	24 h
Vancomicina, amikacina	48 h	48 h	24 h	72 h	24 h
SXT,* bacitracina	24 h	24 h	24 h	48 h	24 h
Vancomicina, gentamicina	24 h	24 h	24 h	48 h	24 h
Penicilina, netilmicina	24 h	24 h	24 h	48 h	48 h
Ceftriaxona, amikacina	48 h	48 h	48 h	72 h	24 h

* Trimetoprim-sulfametoazol.

Resultados

Los tiempos de crecimiento de los micoplasmas en presencia de los diferentes antibióticos presentaron fluctuaciones. La evaluación estadística mostró que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) cuando se somete a *Mycoplasma fermentans* con los antibióticos vancomicina y amikacina respecto a las cuatro especies restantes de micoplasmas (cuadro 1). *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma penetrans* presentan un crecimiento óptimo a las 24 horas en promedio. La viabilidad de los micoplasmas se corroboró con la resiembra en agar Eaton, presentándose el crecimiento característico de las colonias. Los cultivos control presentaron crecimiento a las 24 horas.

Al estudiar la viabilidad de los micoplasmas en presencia de dos antibióticos se observó que *Mycoplasma fermentans* en presencia de penicilina-gentamicina, bacitracina-vancomicina, netilmicina-amikacina, ceftriaxona-gentamicina, vancomicina-amikacina o ceftriaxona-gentamicina su metabolismo se retardó. La comparación de los tiempos de crecimiento entre las especies de micoplasmas con respecto a las doce combinaciones de antibióticos presentó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre *M. fermentans* y las otras especies (cuadro 2).

Mycoplasma pneumoniae y *Mycoplasma penetrans* en presencia de las doce combinaciones de antibióticos tuvieron crecimiento a las 24 horas. Aunque existieron variaciones en los tiempos de crecimiento de *Mycoplasma pirum* y *Mycoplasma hominis* en presencia de las combinaciones de antibióticos no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$), los cultivos control presentaron crecimiento a las 24 horas.

Discusión

Los trabajos relacionados a la resistencia de los micoplasmas a diferentes antimicrobianos son diversos, por ejemplo a

nivel mundial los aislamientos clínicos de *Mycoplasma hominis* presentan resistencia a las tetraciclinas debido a la presencia del determinante de resistencia tetM.⁷ Por otra parte, se ha demostrado que la actividad de la trovafloxacina a una concentración de 0.25 µg/mL inhibe al 90% de las cepas estudiadas, excepto para las mutantes resistentes a fluorquinolonas de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*.⁸ La eritromicina presenta actividad favorable inhibiendo todas las cepas de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium* a una concentración < 0.015 µg/mL. *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis* resultan susceptibles a trovafloxacina y sparfloxacina.^{8,9}

En relación a lo expuesto anteriormente, en el presente estudio se planteó establecer una mezcla de antimicrobianos que permitieran mantener viables a los micoplasmas para estudios posteriores. Los datos presentados permiten considerar un medio de cultivo con diferentes combinaciones de antimicrobianos que no inhiban el metabolismo de los micoplasmas y puedan favorecer su aislamiento a partir de muestras clínicas. Lo anterior se establece bajo el criterio de que los antimicrobianos que se evaluaron tienen efecto principalmente a nivel de pared celular, estructura no presente en los micoplasmas.

Cepas de *Mycoplasma fermentans* aisladas a partir de humanos durante el año de 1967 mostraron susceptibilidad a los antibióticos del tipo aminoglucósidos en un rango de 0.5-25 mg/mL; recientemente cepas de este micoplasma aisladas de humanos mostraron una resistencia contra los aminoglucósidos (> 500 mg/mL). La resistencia a tobramicina, kanamicina o gentamicina emerge después de siete, ocho y catorce ciclos de exposición a los antibióticos, respectivamente.¹⁰ Ensayos cuantitativos de susceptibilidad a antimicrobianos, en *Mycoplasma fermentans* (cepa incognitus), han mostrado no ser sensibles a la eritromicina, el antibiótico utilizado frecuentemente en infecciones de humanos por micoplasmas. De tal manera se ha demostrado que este micoplasma es sen-

sible *in vitro* a la tetraciclina, doxiciclina, cloramfenicol, clindamicina y ciprofloxacina.¹¹⁻¹²

Determinar la susceptibilidad o viabilidad de micoplasmas y ureaplasmas contra agentes antimicrobianos es particularmente difícil, ya que los cultivos no presentan turbidez y el inóculo no se puede estandarizar. Por tanto, es recomendable tomar en cuenta estos criterios cuando se requiera aislar micoplasmas a partir de muestras clínicas.

Conclusiones

El estudio de la viabilidad de los micoplasmas de interés médico en presencia de los diferentes antibióticos estudiados, permitió observar que *Mycoplasma fermentans* presentó crecimiento lento cuando estuvo en presencia de vancomicina, gentamicina, bacitracina, ceftriaxona, netilmicina y amikacina.

Por su parte *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma pirum*, en este orden, presentaron actividad metabólica favorable en presencia de los antibióticos utilizados.

Referencias

1. Razin S, Yoge D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1094-156.
2. Tully JG. Current status of the Mollicutes flora of humans. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 1): 2-9.
3. Duffy LB, Crabb D, Searcey K, Kempf MC. Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clinda-mycin against *Mycoplasma* spp. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45 (Suppl 1): 29-33.
4. Cassell GH, Waites KB, Crouse DT. Perinatal mycoplasmal infections. *Clin Perinatol* 1991; 18: 241-62.
5. Cassell GH, Davies JK, Waites KB, et al. Pathogenesis and significance of urogenital mycoplasmal infections. *Adv Exp Med Biol* 1987; 224: 93-115.
6. Cassell GH, Blanchard A, Duffy L, Crabb D, Waites KB. Mycoplasmas. In: Howard BJ, Keiser JF, Weissfield AS, Smith TF, Tilton RC., (Eds). *Clinical and Pathogenic Microbiology*. St. Louis, MO. Mosby Year Book 1994: 491-502.
7. Roberts MC, Koutsuky LA, Holmes KK, LeBlanc DJ, Kenny GE. Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal tetM sequences. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 141-3.
8. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Gruson D, Lefrancois M, Bebear C. *In vitro* activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluorquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2557-60.
9. Hannan PC, Woodnutt G. *In vitro* activity of gemifloxacin (SB 265805; LB20304a) against human mycoplasmas. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 367-9.
10. Hannan PC. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma fermentans* strains from various sources and the development of resistance to aminoglycoside *in vitro*. *J Med Microbiol* 1995; 42: 421-8.
11. Hayes MM, Wear DJ, Lo SC. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing for the newly identified AIDS-associated *Mycoplasma*. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain). *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 464-6.
12. Pereyre S, Gonzalez P, de Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, et al. Mutation in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3142-50.