



Evaluación de Medios de Cultivo para *Mycoplasma pneumoniae*.

Iraní Pérez¹.
Morelys Villaroel².
María Gómez³.
Susana González-Rico⁴.

¹Sección de Bacteriología. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela. iraniperez@yahoo.es

²Sección de Bacteriología. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela.

³Sección de Bacteriología. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela.

⁴Sección de Bacteriología. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 24 de Enero del 2008 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El cultivo de *Mycoplasma pneumoniae* representa un importante reto para el laboratorio de Bacteriología, debido a sus características de crecimiento y variedad de requerimientos nutricionales. El control de calidad de los medios de cultivo es un proceso que debe ser continuo y se extiende desde las materias primas hasta el producto final. En este trabajo se evaluaron varios medios de cultivo para *M. pneumoniae*, preparados de manera “casera” en el laboratorio, empleando estrictas medidas de control de calidad. El objetivo era disminuir el costo en la preparación de los mismos y estandarizarlos para el mantenimiento de cepas, para su uso posterior como apoyo para la evaluación de técnicas de biología molecular para el diagnóstico rápido. De esta manera se obtuvieron resultados óptimos en el crecimiento de la cepa de *M. pneumoniae* en cada uno de los medios evaluados.

PALABRAS CLAVE: *Mycoplasma pneumoniae*, medios de cultivo, control de calidad.

EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR MYCOPLASMA PNEUMONIAE

SUMMARY

Culture of *Mycoplasma pneumoniae* represents an important challenge for the bacteriological laboratory, due to growth characteristics and the variety of nutritional requirements of mycoplasmas. Quality control must be continuous and extends from the raw materials to the final product. In this work, several homemade culture media for *M. pneumoniae* were evaluated, using strict quality control measures. The objective was to test for a reliable and economic way to standardize different culture media for its later use in the evaluation of molecular biology techniques for rapid diagnosis. In summary, we obtained optimal results in growing the strain of *M. pneumoniae* in each one of the media evaluated.

KEY WORDS: *Mycoplasma pneumoniae*, culture media, quality control.

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*.

INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas son las bacterias de vida libre más pequeñas capaces de crecer en medios de cultivo libres de células. Pertenecen a la Clase *Mollicutes*, Orden *Mycoplasmatales*, Familia *Mycoplasmataceae* y Género *Mycoplasma*. Este último incluye más de 100 especies, las cuales se caracterizan por carecer de pared celular y ser pleomórficas. Poseen una membrana de tres capas que contiene esteroides que les confiere soporte estructural. La mayoría de los micoplasmas son anaerobios facultativos y su energía la obtienen principalmente a través del metabolismo de carbohidratos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). En el ser humano se han aislado 13 especies de micoplasmas, entre las cuales se destaca *Mycoplasma pneumoniae*. Este microorganismo se caracteriza por tener forma de bastón, mide aproximadamente 10 x 20 nm, y presenta en un extremo una organela responsable de su unión a las membranas celulares. Clínicamente produce infecciones del tracto respiratorio, generalmente en forma de neumonía de la comunidad o infecciones del tracto respiratorio alto. Se le atribuye la causa de aproximadamente el 20% de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) en la población general y el 50% de las neumonías en personas en condiciones de hacinamiento. Las infecciones extrapulmonares ocurren con menor frecuencia pero pueden ser más graves: producen infección localizada en sistema nervioso central, piel, articulaciones y otros. Estas últimas, generalmente se acompañan de un cuadro respiratorio, pero pueden aparecer en ausencia absoluta de síntomas en estas localizaciones (3, 6, 7, 9). Debido a la importancia de *M. pneumoniae* como agente causal de las NAC, se hace necesario disponer de un método diagnóstico que sea sensible y específico para aplicar el tratamiento apropiado a los pacientes y disminuir la morbilidad. El cultivo y aislamiento de micoplasmas y más específicamente de *M. pneumoniae* representa un importante reto para el laboratorio, ya que este microorganismo posee características muy particulares, siendo exigentes desde el punto de vista nutricional y sensible a variaciones de pH, temperatura y presión osmótica. Por lo tanto se deben garantizar condiciones óptimas para su desarrollo en medios de cultivo para mantener o aislar cepas (7, 8, 9). El cultivo de micoplasmas patógenos para humanos requiere de un medio de cultivo base enriquecido con peptona, extracto de

levadura y suero, todo esto suplementado con un sustrato metabólico (generalmente glucosa). Adicionalmente, se utilizan indicadores de pH como el rojo de fenol para poder detectar el crecimiento del microorganismo, ya que usualmente no producen turbidez en medio de cultivos líquidos debido a su pequeño tamaño. Para recuperar *M. pneumoniae* a partir de muestras clínicas, especialmente en muestras tomadas de sitios no estériles, además de los componentes del cultivo antes mencionados, se requiere de antibióticos como Penicilina G o una penicilina semi-sintética de amplio espectro a fin de minimizar el sobrecrecimiento bacteriano. En ocasiones también se emplea el acetato de talio para inhibir el crecimiento de otras bacterias ya que los micoplasmas son resistentes a su acción a concentración de 1:10.000 partes en el medio de cultivo, y azul de metileno que inhibe el crecimiento de otros micoplasmas, de modo que el medio resulta selectivo para *M. pneumoniae* (3, 7, 10). Entre los medios de cultivo más utilizados se destaca el Caldo y el agar SP4 (pH 7,5) el cual fue formulado originalmente para el cultivo de espiroplasma y es considerado el mejor medio de uso general. Otros medios incluyen el Medio de New York City modificado, el Sistema Trifásico (Mycotrim RS, Irvine Scientific, Irvine, Calif.), y el agar y caldo PPLO (*pleuroneumonia like organism*) con extracto de levadura y suero de caballo (2, 7). También se recomienda el uso de medios bifásicos, en donde los tubos contienen una fase sólida de agar y una fase líquida o caldo con una composición similar al agar, ya que se ha observado que estos medios aumentan la recuperación de los micoplasmas en comparación con los medios de cultivos sólidos (3, 7, 11). En general, los medios de cultivo para *M. pneumoniae* deben incubarse a 37°C, durante un período de tiempo máximo de 4 semanas, el tiempo para observar crecimiento va a depender de la cantidad de bacterias presentes en el inóculo inicial. En el caso de los medios en caldo se considera que una turbidez macroscópica y un cambio ácido o alcalino del indicador en 1-5 días se deben a contaminación bacteriana, por el contrario, un cambio gradual y leve del indicador del pH en 8-15 días, sin turbidez macroscópica sugiere un cultivo verdaderamente positivo. Cuando los cambios de color son evidentes, el caldo debe subcultivarse rápidamente en un medio apropiado con agar, ya que a medida que se acumula más ácido los micoplasmas rápidamente se tornan no viables. Si no hay cambio de color obvio después de 1 y 3 semanas de incubación en el medio bifásico, debe realizarse un subcultivo a ciegas en medios de agar (3, 7). Debido al pequeño tamaño del *M. pneumoniae*, sus colonias no pueden ser visualizadas en los medios de agar a simple vista, solo mediante el uso de un microscopio estereoscópico (objetivo de 20X o 60X) observándose redondas con superficie granulosa y sumergidas en el agar. Es importante resaltar que el *M. pneumoniae* puede mostrar o no esta apariencia característica y además se debe ser cuidadoso en diferenciar esta morfología de artefactos tales como burbujas de aire, agua o gotas lípidos los cuales pueden causar confusión (3, 7). Con todo lo anteriormente mencionado, se destaca la complejidad que implica el uso de medios de cultivo para el aislamiento o crecimiento de *M. pneumoniae*, más aún si su preparación se realiza de manera casera, debido a la variedad de suplementos e inhibidores. Esto se contrapone con el costo, el cual se incrementa si dichos suplementos son adquiridos de manera comercial. Adicional a esto, el tiempo de crecimiento del microorganismo también es una desventaja, que impide realizar un diagnóstico rápido o en la fase aguda de la enfermedad. Se debe disponer además de un personal con experiencia para la observación de las colonias microscópicas, por tanto, su implementación en los laboratorios de rutina no es sencilla. Es por ello que en el entorno clínico se emplea para el diagnóstico de *M. pneumoniae* como agente causal de NAC, de manera muy frecuente la serología. Esta técnica requiere la toma de dos muestras de suero en períodos de tiempo distintos, por lo que tampoco se obtiene un diagnóstico rápido, y en consecuencia el tratamiento se realiza de manera

empírica, y a lo largo del tiempo puede en consecuencia seleccionar cepas resistentes. Es importante destacar que en la actualidad en Venezuela no se está realizando cultivo para *M. pneumoniae* y es de nuestro interés en la Sección de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical (IMT), conocer las ventajas y desventajas que ofrecen los medios de cultivo con la finalidad de utilizarlos como apoyo en el mantenimiento de cepas para que en posteriores estudios nos permita estandarizar y desarrollar técnicas de diagnóstico rápido como la PCR para la detección de *M. pneumoniae* como agente causal de infecciones respiratorias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa: Se utilizó solo una cepa de *M. pneumoniae* en Caldo PPLO cuya concentración de UFC/ml se desconocía, que fue proporcionada gentilmente por el Dr. Arend Kolk del Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda.

Medios de cultivo para *M. pneumoniae* (7, 9, 12, 13): Para la elaboración de los medios a evaluar se utilizó el caldo para micoplasma (Mycoplasma broth) de la casa comercial OXOID y los suplementos para este se prepararon de manera casera y posteriormente agregados al medio base. Adicionalmente fue donado por el Dr. Kolk, el medio comercial Bacto PPLO Broth (2,1 gr en 70 ml de agua destilada estéril) y dializado de levadura (10 ml) elaborado de manera casera en el Royal Tropical Institute, Ámsterdam, Holanda. A este último se le agregó suero de caballo (20 ml) y agar (1,5 gr) en nuestro laboratorio. Este medio se utilizó a manera control para el crecimiento de la cepa de *M. pneumoniae* ya que es el mismo medio base donde fue transportada la cepa. A continuación se presenta una tabla que muestra las variantes de composición de los medios que fueron evaluados en este trabajo (ver TABLA 1).

TABLA 1. Composición de medios de cultivo evaluados.

Caldo para micoplasma (CM)	Agar para micoplasma (AM)	Agar para micoplasmas con inhibidores (AMI)	Medio bifásico para micoplasmas (MBM)
70 ml Caldo base + 20 ml suero de caballo + 10ml levadura comercial al 25%			
0,5ml Rojo de fenol 0,4% 2ml glucosa 50%	1,5 gr Agar	0,25ml de Acetato de talio 10% 3ml soluc. Penicilina 100.000 U/ml	Agar: 100ml AMI 1ml azul de metileno 1% 0,5ml Rojo de fenol 0,4% 2,0ml glucosa 50% Caldo: 100ml CBM 0,2ml Azul de metileno 1% 1,0ml Rojo de Fenol 0,4% 4,0ml de glucosa 50% 0,5ml Acetato de talio 10% 6,0ml Penicilina 100.000 U/ml

A cada uno de los medios se le realizó control de calidad para verificar su esterilidad, incubándolos a 37°C durante 24 horas y observado posteriormente de manera macroscópica la presencia o no de turbidez en los caldos, o colonias en los medios de agar.

Siembra de medios de cultivo.

Inicialmente, se inocularon 100µl de la cepa de *M. pneumoniae* en caldo para micoplasmas (CM) y en el medio bifásico para micoplasma (MBM). Cada siete días los líquidos o caldos fueron repicados en agar PPLO, agar para micoplasma (AM) y agar para micoplasmas con inhibidores (AMI). Los medios en caldo fueron incubados en atmósfera de aire a 37°C y las placas selladas se incubaron en atmósfera de CO₂ a 37°C. El período de incubación fue de tres (3) semanas, durante las cuales se realizó observación diaria a los mismos para obtener evidencia de crecimiento bacteriano mediante viraje del indicador de pH producto del metabolismo de la glucosa en el caldo y la observación microscópica (objetivo 10X) para evidenciar la presencia de colonias en el agar.

Identificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para confirmar o verificar la especie bacteriana a partir del crecimiento obtenido en los medios de cultivo, se empleó la técnica de PCR según la metodología de Waring y col (2001), empleando como blanco de amplificación el gen de *adhesina P1* de *M. pneumoniae* (número de acceso del GENE BANK AE000002). Bajo estas condiciones de reacción se generan productos de amplificación en el rango de 309 a 339 pb, debido a que los iniciadores empleados en esta reacción, tienen como blanco designado regiones conservadas del gen de *adhesina P1* que se encuentran repetidas hasta diez (10) veces dentro del genoma de *M. pneumoniae*, lo cual incrementa la sensibilidad del ensayo de PCR sobre aquellos métodos típicos que utilizan un blanco no repetido. Este estudio realizado por Waring y col (2001) demostró que la técnica tiene un 100 % de especificidad para amplificar el gen de *adhesina P1* de *M. pneumoniae*. A continuación se describe la metodología aplicada:

1.- Extracción de ADN de *Mycoplasma pneumoniae*.

Se tomaron 500µl de un caldo de cultivo con viraje de color y luego de centrifugar a 13.000 xg durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 30µl de agua estéril. Se incubó a 95°C por 15min en baño de agua (14).

2.-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) para *M.pneumoniae*.

Para la identificación se empleó la amplificación de fragmentos específicos del gen de *adhesina P1* de *M. pneumoniae* con los iniciadores:

MP-F (5'-CCCTCGACCAAGCCAACCTC-3')

MP-R (5'-TGCGCGTTGTTCTTGTGTTGGTG-3').

La mezcla de reacción con un volumen final de 100µl, contiene 1µM de cada *primer*, 200µM de cada dinucleótido, 10mM de Tris-HCl (8,3), 50mM de KCl, 6mM de MgCl₂ y 2,5U de *taq* polimerasa (15).

Las muestras fueron sometidas al siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 9 min, la amplificación consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 94°C, hibridización a 62°C y extensión 72°C por 30 seg cada una, finalmente un paso de extensión a 72°C por 7 min (15).

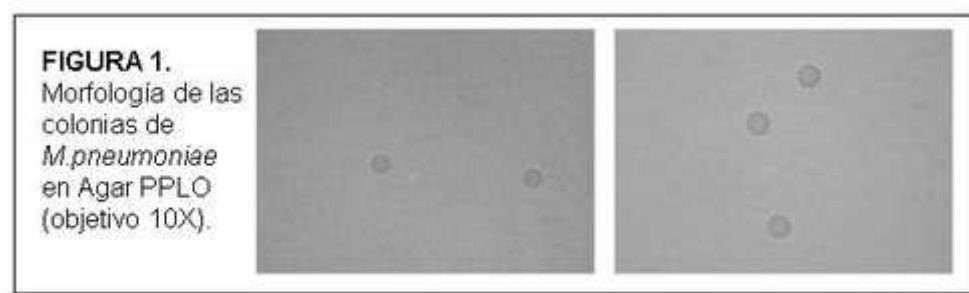
3.- Separación electroforética en Geles de Agarosa.

Los productos obtenidos luego de la amplificación fueron visualizados mediante separación electroforética en gel de Agarosa al 2%, en buffer TAE (40 mM Tris-acetato pH 8.3, 1 mM EDTA), conteniendo bromuro de etidio (0,5µg/ml). Las muestras se mezclaron con buffer de carga (0.005% azul de bromofenol, 50% glicerol) en una proporción de 2µl de buffer para 8µl de muestra, y se colocaron en cada uno de los bolsillos del gel. Para cada corrida electroforética se incluyó un patrón de peso molecular de 100bp (10µl de una solución de 2,1µg/ml). Los geles de un tamaño de 15,5cm x 10,2cm y un grosor de aproximadamente 0,8cm, se corrieron en una cámara electroforética, sumergidos en buffer TAE, a 100V y 200mA durante una hora. Los fragmentos producto de la amplificación fueron visualizados bajo luz ultravioleta y registrados mediante fotografía digital (15). El registro de los resultados se realizó con una cámara digital Kodak DC290 que permite la captura digital de quimioluminiscencia. Las imágenes obtenidas se transfirieron a una computadora para su almacenamiento, impresión y análisis.

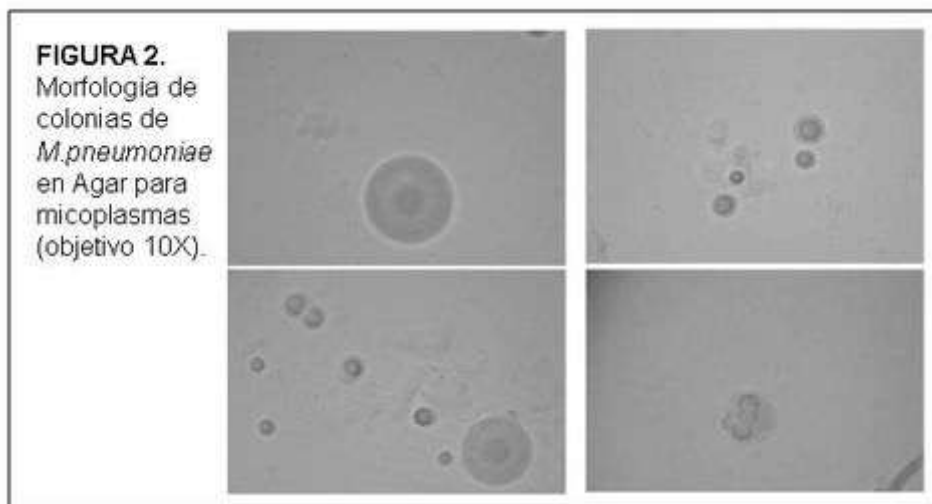
RESULTADOS

Nuestros resultados indican que luego de realizar el control de calidad para los medios de cultivo, no se evidenció ningún tipo de crecimiento macroscópico en los medios de cultivo probados, lo que muestra que la esterilidad de los mismos era satisfactoria. Durante la primera y segunda semana de incubación de los medios CM y MBM inoculados con la cepa *M.pneumoniae*, no se evidenció variación en el pH de los medios. Esto pudo ser corroborado posteriormente, ya que en los repiques o subcultivos realizados a los siete (7) y a los catorce (14) días de incubación de los caldos en las placas de agar (AM, AMI y agar PPLO) no se observó crecimiento. A partir de la tercera semana de incubación de los medios líquidos, se observó un leve viraje o cambio del indicador de pH. Exactamente el día diecisiete (17) se realizó el tercer repique en placas de agar (AM, AMI y agar PPLO), en los cuales al séptimo días de incubación se observó crecimiento bacteriano, con colonias de morfología variable para cada uno de los medios (ver TABLA 2).

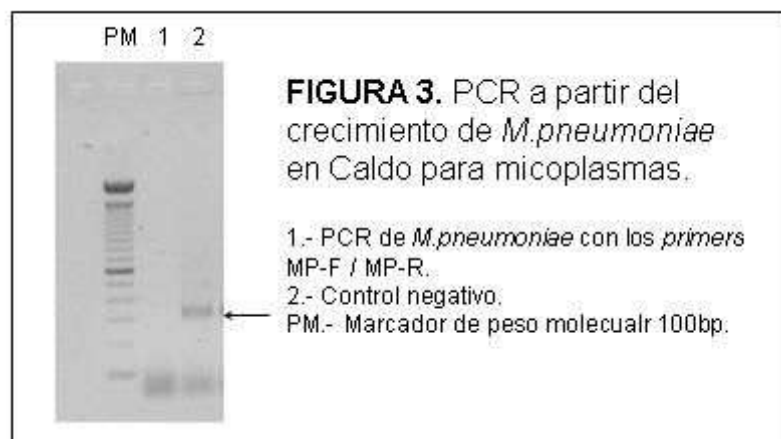
En ese primer aislamiento, en el medio PPLO se observaron colonias de superficie granuladas, de tamaño uniforme y pequeñas (ver FIGURA 1),



en comparación con las colonias observadas en el medio AM, donde se presentaba gran diversidad de tamaño como en forma, en la cual predominaba la colonia granulosa con centro denso (ver FIGURA 2).



Esta diferencia en la morfología de las colonias entre el agar PPLO y el AM, pudiera atribuirse a la distinta composición de cada uno de los medios. Por ejemplo, el agar PPLO emplea como uno de sus componentes extracto de levadura dializado (no comercial), mientras que en el AM se emplea un extracto de levadura comercial. Aun cuando en la literatura no se hace referencia al efecto de estos componentes en la morfología, es posible que estas modificaciones pudieran explicar los cambios en la morfología de la colonia, aunque ciertamente no se puede afirmar. Luego de observar detalladamente las placas de agar (PPLO, AM y AMI) en su totalidad con microscopio óptico (objetivo 10X), el número de colonias en el agar PPLO y el AM fue similar en un rango de 20 – 30 colonias por placa, no así en el AMI, ya que en este el número de colonias fue marcadamente menor al encontrado en los medios sin inhibidores en un rango de 8 – 10 colonias por placas (ver TABLA 2). Una vez evidenciado el crecimiento bacteriano en los caldos de cultivo y la observación microscópica de colonias en las placas de agar, se empleó la técnica de PCR a partir de los medios en caldos para determinar el género y la especie del microorganismo, para ello se procedió a realizar la amplificación de regiones conservadas del gen de *adhesina P1* del *M. pneumoniae* con los iniciadores MP-F/MP-R. Los productos de amplificación fueron evidenciados mediante la observación con luz UV de una banda correspondiente al producto de amplificación que se ubica aproximadamente en 325 pb correspondiente al fragmento del gen de *adhesina P1*, confirmándose así que el crecimiento correspondía a *M. pneumoniae* (ver FIGURA 3).



DISCUSIÓN

Se puede concluir de este trabajo, que en la preparación de los medios de cultivo para micoplasma es importante tomar en cuenta un número de variables que se deben manejar, la mayoría de ellas relacionadas con la variedad necesaria de suplementos, debido a que esto complica su preparación e incrementa el riesgo de errores que como resultado final pudiera afectar el mismo, no favoreciendo el crecimiento del microorganismo en estudio o haciéndolo con muy poca efectividad. También la continua manipulación del medio durante la preparación, se incrementa la probabilidad de contaminación. A pesar de esto, en nuestro estudio ninguno de los medios preparados presentó contaminación alguna. Esto sugiere que, tomando las medidas necesarias, se puede reducir al mínimo la posibilidad de contaminación. Todos los medios de cultivo preparados en el laboratorio para el *M. pneumoniae* funcionaron de manera óptima, y permitieron el crecimiento de la cepa en un tiempo aproximado de 17 días, lo cual esta dentro del rango descrito en la literatura. Además, el tiempo de crecimiento fue comparable con lo observado en el agar PPLO, el cual como se mencionó anteriormente fue empleado como control para conocer la viabilidad de la cepa. La menor cantidad de colonias observadas en el AMI a partir de un inóculo similar al de los otros medios de cultivo, no se puede atribuir de manera específica, solo podemos mencionar que este medio tiene otros componentes adicionales que sirven como inhibidor de otras bacterias (acetato de talio) e inhibidores de otras especies de micoplasmas (azul de metileno). Sin embargo, se observó el mismo fenómeno con cada siembra en ese medio, esto sería determinante al momento a realizar un aislamiento de *M. pneumoniae* a partir de una muestra con un bajo inóculo bacteriano. Con todo lo descrito anteriormente podemos concluir que la metodología empleada para la elaboración de los medios de cultivo para *M. pneumoniae* en el laboratorio cumple con los parámetros estándar, y que los mismos permiten el crecimiento del microorganismo de una manera óptima y en el tiempo esperado, por lo tanto pueden ser empleados para el mantenimiento de la cepa de *M. pneumoniae* y en consecuencia como apoyo para la estandarización de otras técnicas en futuros estudios.

REFERENCIAS

- 1 Pariasca JC. Fisiopatología de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. Paediatrica 2003; 5 2: 101-108.
- 2 Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. BAILEY & SCOTT'S, Diagnóstico Microbiology. 10ª Ed. Houston, Texas: Editorial Mosby; 1998.
- 3 Waites KB, Rikihisa Y, Taylor-Robinson D. En: Mycoplasma y Ureaplasma. Murray PR, Baron EJ, Faller MAP, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 8a Ed. Washington, DC: Editorial American Society for Microbiology. 2004. pp. 972-990.
- 4 Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16ª Ed. México: Editorial el Manual Moderno; 1998.

- 5 Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Vega-Benítez M. Micoplasmas y su importancia médica. Rev Biomed 2001; 12: 262-271.
- 6 Baseman JB, Tully JG. Synopses: Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by Their Notoriety. Emerg Infect Dis 1997; 3:21-32.
- 7 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas color. 5a Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2003. p.p.119-167.
- 8 Velleca WM, Bird BR, Forrester FT. Laboratory diagnosis of mycoplasma infections. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services; 1980.
- 9 Matas Andreu L, Molinos Abós S, Fernández Rivas G, González Soler V, Auxina Ruiz. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24: 19-23.
- 10 Lind K, Lindhardt B, Shutten HJ, Blom J, Christiance C. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 1984; 20: 1036-1043.
- 11 Kenny GE, Kaiser GG, Cooney MK, Foy HM. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia: Sensitivities and specificities of serology with lipid antigen and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections. J Clin Microbiol 1990; 28: 2087-2093.
- 12 www.oxid.com. Número de catálogo: CM0401 - Mycoplasma Agar Base.
- 13 www.bd.com. Número de catálogo: 211456 – PPLO Agar Base.
- 14 Waring AL, Halse TA, Csika CK, Carlyn CJ, Musser KA, Limberger RJ. Development of a Genomics-Based PCR Assay for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* en a Large Outbreak in New York State. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39: 1385-1390.
- 15 Correa M.F, González S, Hernández C. Manual de trabajo práctico. Curso: Prospectivas actuales y futuras en el estudio de la tuberculosis. Editado por la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto de Medicina Tropical, Sección de Biología Molecular de Agentes Infecciosos. 2000; Caracas-Venezuela.