

ARTIGO ORIGINAL

# Valor potencial de pesquisa de micobactinas para identificação de micobactérias na prática clínica

SUZANA BOSNI-DAVID(1), E FERNAND PAPA(2)

## RESUMO

A produção de micobactinas foi feita utilizando o método em duas etapas do ácido ctilenadiamino-di-o-hidroxiifenilacético (EDDHA). Novas propostas de sistemas de solventes foram utilizadas para analisar 17 espécies micobacterianas em cromatografia por camada fina. Todas as espécies do complexo MAIS (incluindo um exemplo de cada serotipo do complexo *M. avium*) formaram micobactinas idênticas. De acordo com resultados prévios, cada uma das espécies dos grupos *M. kansasii*, *M. marinum*, e *M. terrae*, *M. gastri*, *M. triviale* formaram micobactinas distintas. *M. szulgai* e *M. flavescens* formaram um mesmo padrão de micobactinas, diferente daqueles encontrados noutras espécies micobacterianas incluindo *M. gordonae* e *M. asiaticum*. Em contradição com observações precedentes sobre o complexo *M. tuberculosis*, as nossas investigações mostraram diferenças nos padrões de micobactinas entre *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*. O método proposto para a produção de micobactinas é compatível com um esquema de identificação micobacteriana.

**Palavras-chave:** Micobactinas, espécies *Mycobacterium*

(1) Centro da Malária e outras Doenças Tropicais/IHMT/Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira 96, 1300 Lisboa, Portugal.

(2) Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur, 75724, Paris Cedex 15, França.

Recebido para publicação em 96.11.22

## SUMMARY

The ethylenediamine-di-o-hydroxyphenyl-acetic acid (EDDHA) two-step method was used for mycobactin production. New solvent systems were proposed for their analysis by TLC and were used to examine 17 mycobacterial species. All the species tested within the MAIS complex (including one example from each serotype of the *M. avium* complex) formed identical mycobactins. Results concerning *M. kansasii* and *M. marinum*, as well as *M. terrae*, *M. gastri* and *M. triviale* were in agreement with the previous findings, i.e. each species formed a distinct mycobactin. *M. szulgai* and *M. flavescens* formed identical mycobactin patterns, differing from those of other mycobacterial species tested including *M. gordonae* and *M. asiaticum*. Contrary to previous observations concerning the *M. tuberculosis* complex, our investigations showed differences between the *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* mycobactin profiles. The method proposed for mycobactin production and detection is directly applicable in classical identification schemes for mycobacteria.

**Key words:** Mycobactins, *Mycobacterium* species

## INTRODUÇÃO

A utilização das micobactinas na identificação de espécies micobacterianas foi proposta por vários autores (1-7). Mostrámos que as espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum* podiam ser claramente identificadas pelas suas micobactinas (8) e que as espécies relacionadas *M. avium*, *M. intracellulare*, e *M. scrofulaceum*, *M. paratuberculosis* (MAIS) assim que *M. simiae* todas produzem a mesma micobactina, distinta das micobactinas doutras espécies analisadas incluindo *M. terrae*, *M. gastri*, *M. triviale*, *M. kansasii* e *M. marinum* cada uma das quais produziu a sua micobactina característica (9). Estes estudos indicaram que as micobactinas micobacterianas podiam ser úteis para o diagnóstico diferencial. Por esta razão, achámos desejável estender o exame das micobactinas a outras espécies micobacterianas. Isto foi possível usando um melhor método para a produção e a extracção das micobactinas (9) e, como descrito neste trabalho, usando vários sistemas de solventes para a cromatografia em camada fina.

## MATERIAL E MÉTODOS

## Estirpes bacterianas

As estirpes usadas neste estudo (por grande parte estirpes de referência) apresentam-se na Tabela I.

## Agentes Químicos

A micobactina-J (Rhône-Mérieux, Lyon, França) foi utilizada como referência para *M. paratuberculosis*.

## Crescimento e produção de micobactinas no meio EDDHANB-7H9-glicerol

O crescimento bacteriano e a produção de micobactinas usando o método em duas etapas do EDDHA foi efectuado como previamente descrito (9). Resumindo, as micobactérias foram cultivadas em 10ml de meio líquido (NB-7H9-glicerol) contendo 5g dehydrated Bacto Nutrient Broth (Difco, Detroit, Michigan,



VALOR POTENCIAL DE PESQUISA DE MICOBACTINAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS NA PRÁTICA CLÍNICA

TABELA I

Caracterização por cromatografia em camada fina das micobactinas férricas

Espécies	Origem <sup>a</sup>		Eluentes <sup>c</sup> (resultados em Rf)			
			A	B	C	D
<i>M. asiaticum</i>	14108001	ATTC 2527	0.51; 0.47; 0.38; 0.35	0.51; 0.38 0.25; 0.22	0.47; 0.40 0.29; 0.26	NE
<i>M. aurum</i> <sup>b</sup>			0.38	0.22	0.24	0.21
<i>M. avium</i> <sup>c</sup>			0.59	0.66	0.59	NE
<i>M. bovis HCG</i>	140040001	Inst. Pasteur Paris <sup>d</sup>	0.46; 0.41	0.43; 0.37; 0.28; 0.22	0.44; 0.40; 0.34; 0.29	NE
<i>M. flavescens</i>	140230001	ATTC 14474	0.44	0.44	0.44	NE
<i>M. gastri</i>	14034001	ATTC 15754	0.24	0.49	0.31	NE
<i>M. goodii</i>	140210001	ATTC 14470	0.40; 0.38	0.25; 0.21; 0.16	0.31; 0.26; 0.22	NE
<i>M. intracellulare</i>	140310001	ATTC 13950	0.58	0.65	0.57	NE
<i>M. kansasii</i>	140110001	ATTC 12478	0.49	0.5	0.46	0.37
<i>M. marinum</i>	140120001	ATTC 927	0.40	0.62	0.46	0.25
<i>M. paratuberculosis</i> <sup>e</sup>			0.59	0.65	0.59	NE
<i>M. scrofulaceum</i>	140220001	ATTC 19981	0.59	0.66	0.59	NE
<i>M. simiae</i>	141020001	ATTC 25275	0.59	0.65	0.57	NE
<i>M. szulgai</i>	140240001	NCTC 10831	0.46; 0.34	0.44	0.43	NE
<i>M. terrae</i>	140320001	ATTC 15755	0.53	0.59	0.53	NE
<i>M. trivialis</i>	140330002	T-254-3	0.40	0.62	0.43	NE
<i>M. tuberculosis</i>	140010001	ATTC 27294 (H37Rv)	0.50; 0.46; 0.40	0.43; 0.37; 0.28; 0.22	0.44; 0.40; 0.34; 0.29; 0.25	NE

<sup>a</sup> CIPT, Collection de l'Institut Pasteur Tuberculose (France); ATCC, American Type Culture Collection (United States); NCTC, National Culture Type Collection (United Kingdom); e T, Tuberculosis Laboratory, Center for Disease Control (United States).

<sup>b</sup> Para o complexo *M. avium* uma estirpe de cada serotipo foi examinada.

<sup>c</sup> *M. aurum* estirpe A<sup>1</sup> utilizada no nosso estudo anterior (9).

<sup>d</sup> Micobactina J (Rhône-Mérieux, Lyon, França) foi utilizada como referência para *M. paratuberculosis*.

<sup>e</sup> Eluentes: A) propano-2-ol, B) acetonitrilo/cloroformio (9:11, v/v), C) acetona/tetraidrofuran/ciclohexano (4:3:3, v/v/v), e D) etanol/éter de petróleo/acetato de etilo (1:4:6, v/v/v). Nem todas as estirpes foram analisadas com o eluente D: NE = não efectuado.

U.S.A.), 5.2g Middlebrook 7H9 broth (Difco) e 10ml glicerol, por 1000ml. Após uma etapa inicial de crescimento, as bactérias foram separadas por centrifugação e transferidas para o mesmo meio complementado com 1mg/ml do agente quelante EDDHA desferrado. A remoção do ferro pelo EDDHA não permitiu o crescimento bacteriano mas induziu uma produção ótima de micobactinas entre 10 e 20 dias de incubação durante a primeira etapa de produção.

#### Preparação do EDDHA

O ácido etilenodiamino-di-o-hidroxifenilacético (EDDHA) (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, U.S.A.), foi libertado do ferro contaminante usando o método sugerido por ROGERS (10): Uma solução de 10g de EDDHA em 190ml de HCl 1N foi fervida com agitação durante 1h. Depois de arrefecida e filtrada, a solução foi diluída com 1500ml de acetona pura, o seu pH foi ajustado até 6,0 com NaOH 1N, e por final foi mantida a 4°C. No dia seguinte, o precipitado foi filtrado e rediluído em acetona duas vezes. Em seguida o precipitado foi desidratado a 40°C durante uma noite e conservado num recipiente plástico.

O EDDHA assim preparado foi adicionado ao meio de cultura usando o método de ONG et al. (11): Para a preparação de uma solução mãe, 1g de EDDHA foi dissolvido em 15ml de NaOH 1N. O pH foi ajustado a 9,0 com HCl concentrado, e o volume total da solução foi aumentado para 20 ml/g de EDDHA com água destilada.

#### Extração das micobactinas

As bactérias foram separadas por centrifugação e ressuspensas em etanol durante 24 horas. Após uma nova centrifugação, o extracto alcoólico foi recuperado e as micobactinas solúveis em álcool foram detectadas com uma solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 0.1M. A solução incolor inicial de micobactinas não férricas torna-se cor tijolo após a fixação do ferro. O extracto foi então seco por evaporação em evaporador rotativo sob vácuo, e em seguida redissolvido em cloroformio

para ser lavado três vezes por partição bifásica com água destilada eliminando assim o excesso de FeCl<sub>3</sub>.

#### Purificação das micobactinas

Depois de extraídas da massa bacteriana as micobactinas de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* foram separadas dos lipídios contaminantes por cromatografia em colunas de sílica gel 60 (0.0063- 0.200 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A purificação final foi feita usando uma segunda coluna de sílica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os eluentes utilizados foram: 1) cloroformio (4 vezes o volume da coluna), para eliminar os carotenoides e outros lipídios não polares; 2) cloroformio/metanol (98:2, v/v) para recuperar a micobactina. O EDDHA e outros lipídios mantiveram-se retidos na coluna. A purificação final foi determinada por cromatografia em camada fina de sílica gel 60 (F254, 0.2 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

#### Cromatografia por camada fina

Para as outras micobactinas extractos brutos de micobactina (fracção solúvel em cloroformio) foram directamente observados em placas de sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha) com os seguintes sistemas de eluentes: A) propano-2-ol, B) acetone/nitrocloroformio (9:11, v/v), C) acetona/tetrahydrofurano/ciclohexano (4:3:3, v/v/v), e D) etanol/petróleo de eter/etilo acetate (1:4:6, v/v/v).

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de cromatografia por camada fina da análise de 17 espécies de micobactérias estão resumidos na Tabela I e Figuras 1 a 3.

Os novos sistemas de eluentes propostos neste estudo foram usados para confirmar estudos anteriores sobre a possibilidade de diferenciar espécies micobacterianas usando a cromatografia em camada fina para analisar as suas micobactinas. Todas as espécies do



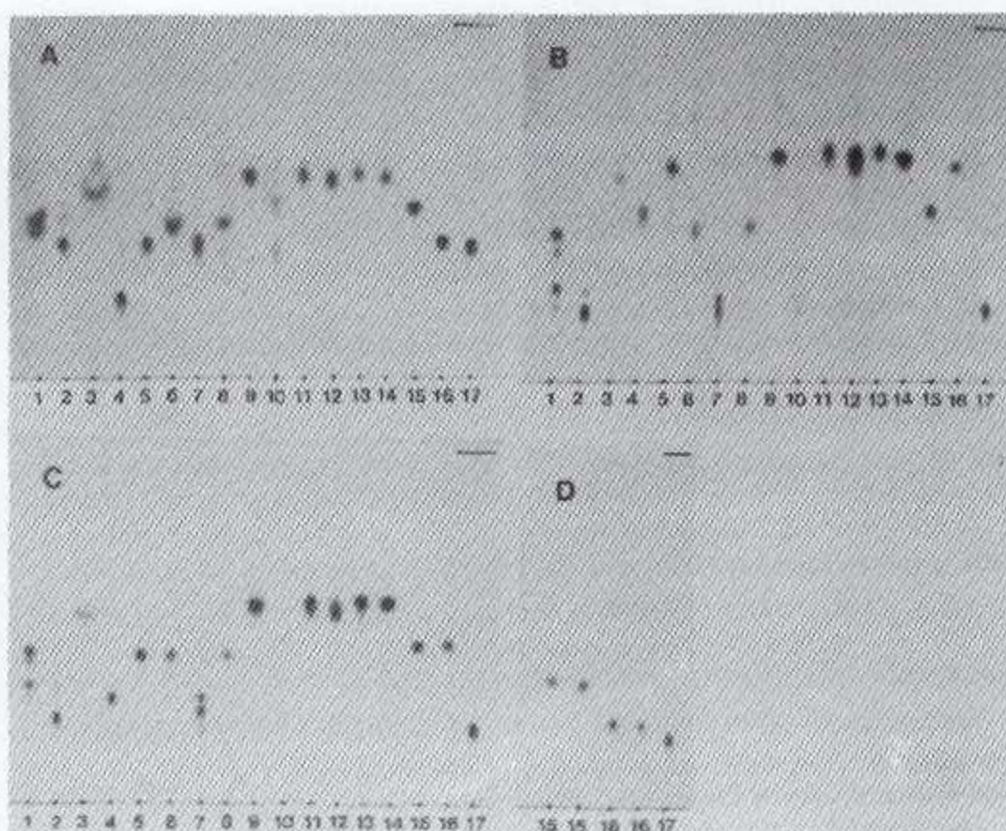


Fig. 1 - Caracterização por cromatografia em camada fina das micobactinas das espécies micobacterianas seleccionadas. Os diferentes sistemas de solventes utilizados foram: A) propano-2-ol, B) acetonitrilo/cloroformio (9:11, v/v), C) acetona/tetraidrofurano/ciclo-hexano (4:3:3, v/v/v), e D) etanol/éter de petróleo/etilo acetato (1:4:6, v/v/v). Filas 1 e 2 mostram respectivamente as micobactinas purificadas de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*; fila 3, *M. terrae*; fila 4, *M. gastri*; fila 5, *M. triviale*; fila 6, *M. flavescens*; fila 7, *M. gordonae*; fila 8, *M. szulgai*; fila 9, *M. simiae*; fila 10, *M. asiaticum*; fila 11, *M. avium*; fila 12, *M. intracellulare*; fila 13, *M. scrofulaceum*; fila 14, *M. paratuberculosis*; fila 15, *M. kansasii*; fila 16, *M. marinum*; fila 17, *M. aurum*.

complexo MAIS (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, e também *M. paratuberculosis* e *M. simiae*) produziram micobactinas idênticas. Estas micobactinas são consideravelmente menos polares que as micobactinas de outras espécies e foram facilmente distinguidas destas pelos seus elevados valores de Rf (Tabela 1). Estes resultados foram consolidados com a análise de um exemplar de cada serotipo do complexo *M. avium*. Os resultados obtidos com *M. kansasii* e *M. marinum*, e também com *M. terrae*, *M. gastri* e *M. triviale* estão de acordo com os resultados anteriores (9), i.e. cada espécie formou micobactinas diferentes.

Novas espécies examinadas foram *M. szulgai*, *M. flavescens* e *M. gordonae*. As duas primeiras formaram padrões de micobactinas idênticos e diferentes dos de *M. gordonae*. *M. asiaticum* mostrou um padrão de micobactinas diferente dos padrões das espécies neste estudo.

Esta investigação apresenta novas observações quanto à diferenciação entre *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*. Os trabalhos anteriores sobre o complexo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, e *M. africanum*) apresentaram estas espécies como tendo micobactinas idênticas que se podiam resolver em quatro produtos por cromatografia em camada fina (2).



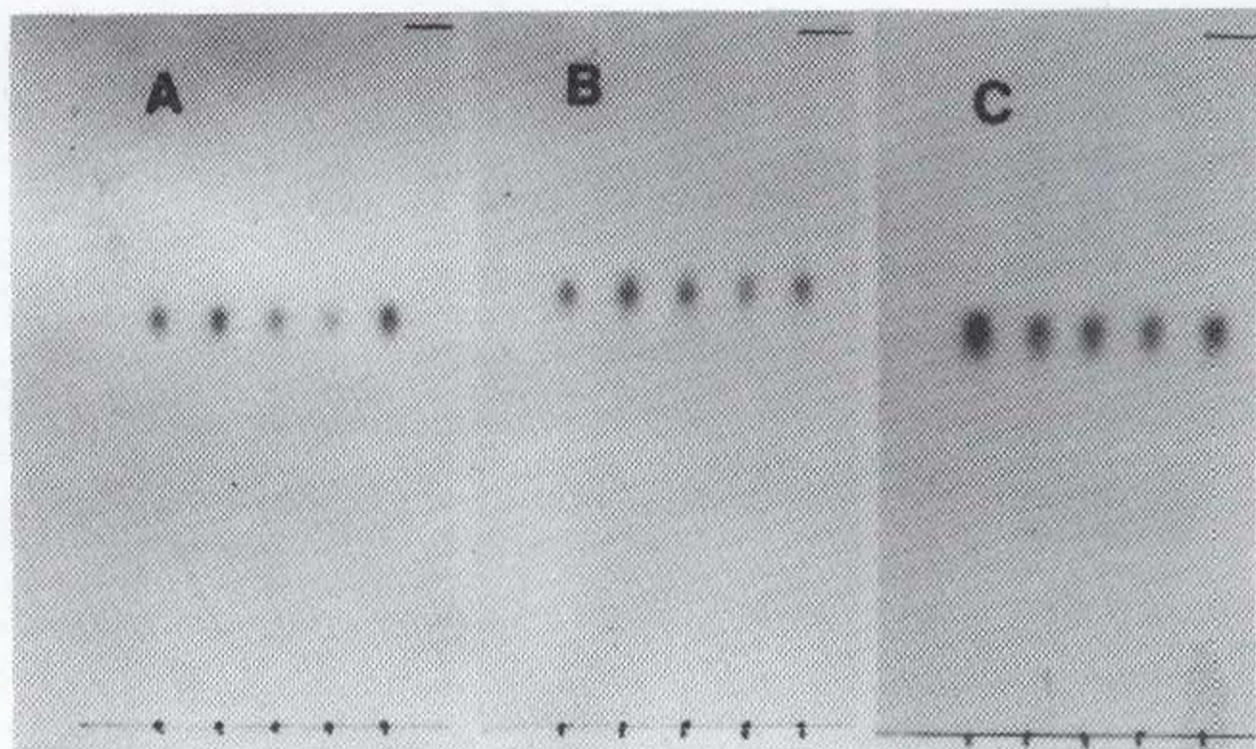


Fig. 2 - Cromatografia por camada fina de vários serotipos do complexo MAIS mostrando a uniformidade das suas micobactinas. Os diferentes sistemas de solventes utilizados foram: A) propano-2-ol, B) acetoneitrilo/cloroformio (9:11, v/v), C) acetona/tetraidrofirano/ciclo-hexano (4:3:3, v/v/v).

As Figuras 1 e 3 e a Tabela 1 mostram que os padrões de micobactinas de *M. bovis* BCG e de *M. tuberculosis* diferem não só na acumulação do produto principal (do polar ao menos polar, segunda e quarta mancha para *M. bovis* BCG e primeira mancha para *M. tuberculosis*) mas também na diferenciação de uma micobactina adicional para *M. tuberculosis*, mancha mais polar, usando o eluente C.

O método proposto para a produção das micobactinas (método em duas etapas) (9) e para a sua detecção (análise por cromatografia em camada fina) deu resultados reprodutíveis que confirmam a elevada importância taxonômica das micobactinas. Por outro lado este método é particularmente interessante porque é directamente aplicável, em larga escala, dentro de um esquema clássico de identificação de micobactérias (8,12). A partir do isolamento inicial até a análise por cromatografia em camada fina a quantidade de

meio e o tempo necessários para a análise são: 2x (10 ml) de meio de cultura (etapa de crescimento), 2x10 a 2x20 dias de cultura segundo que as micobactérias sejam a crescimento rápido ou lento (etapa de crescimento e etapa de produção) e, 24h para a extração e análise por cromatografia em camada fina.

Uma investigação baseada num número mais elevado de estirpes, especialmente no caso do complexo *M. tuberculosis*, seria necessária para poder apreciar a extensão da especificidade indicada pelas nossas observações.

É um dado primordial que no diagnóstico de doenças causadas por micobactérias sejam desenvolvidas técnicas específicas e fiáveis, facilmente incorporadas nos esquemas clássicos de identificação de isolados clínicos. Da nossa investigação parece provável que a análise das micobactinas possa ser utilizada dentro de uma rotina permitindo a diferenciação de micobactérias clinicamente significativas.



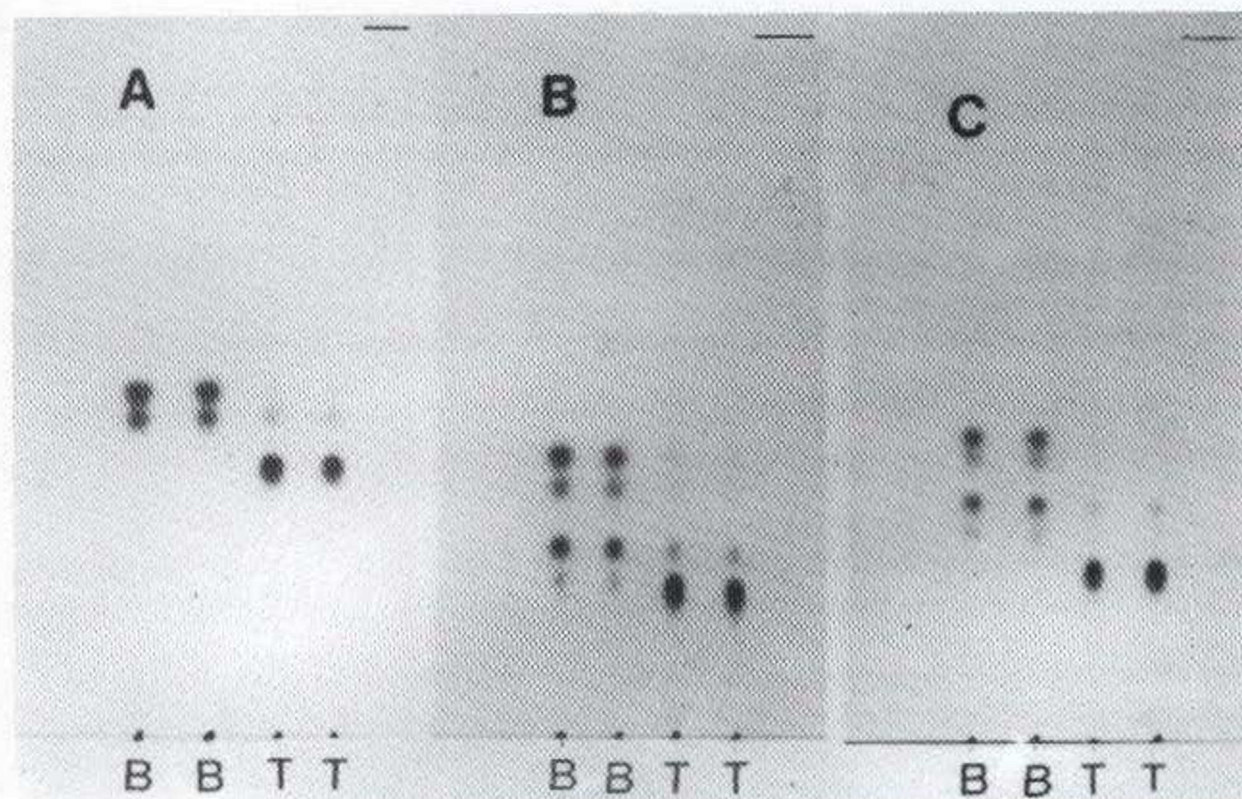


Fig. 3 - Cromatografia por camada fina das micobactinas de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv. Os diferentes sistemas de solventes utilizados foram: A) propano-2-ol, B) acetone nitrilo/cloroformio (9:11, v/v), C) acetona/tetraidrofurano/ciclohexano (4:3:3, v/v/v). Símbolos: B = *M. bovis* BCG, T = *M. tuberculosis* H37Rv.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Hugo L. David pelo seu interesse e conselhos durante este trabalho. S.B.D. era recebente de uma bolsa para

doutoramento da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT), Portugal. Esta investigação fez parte dos trabalhos de tese de doutoramento do Institut National Agronomique, Paris-Grignon apresentado por S.B.D.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BARCLAY R, EWING DF, RATLEDGE C. - Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intercellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.* 164: 896-903; 1985.
2. BARCLAY R, RATLEDGE C. - Mycobactins and exochelins of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. ycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* and other related species. *J. Gen. Microbiol.* 134:771-6; 1988.
3. HALL RM, RATLEDGE C. - Equivalence of mycobactins from *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium farcinogenes*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1691-6; 1985.
4. HALL RM, RATLEDGE C. - Mycobactins as chemotaxonomic characters for some rapidly growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130:1883-92; 1984.
5. HALL RM, RATLEDGE C. - Mycobactins in the classification and identification of armadillo-derived mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 28:243-7; 1985.
6. SNOW GA, AJ WHITE - Chemical and biological properties

- of mycobactins isolated from various mycobacteria. *Biochem. J.* 115:1031-45;1969.
7. WHITE AJ, SNOW GA, - Methods for the separation and identification of mycobactins from various species of mycobacteria. *Biochem. J.* 108:593-7; 1968.
  8. BOSNE S, VINCENT LÉVY-FRÉBAULT V, - Mycobactin analysis as an aid for the identification of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* subspecies. *J. Clin. Microbiol.* 30:1225- 31; 1992.
  9. BOSNE S, PAPA F, CLAVEL-SÉRÈS S, RASTOGI N, - A simple and reliable EDDA method for mycobactin production in mycobacteria : Optimal conditions and use in mycobacterial speciation. *Curr. Microbiol.* 26:353-8, 1993.
  10. ROGERS HJ, - Iron-binding catechols and virulence in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 7:445-56; 1973.
  11. ONG SA, PETERSON T, NEILANDS JB, - Agrobactin, a siderophore from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem.* 254:1860- 5;1979.
  12. DAVID H. LÉVY-FRÉBAULT V, THOREL MF, - Méthodes de laboratoire pour Mycobactériologie clinique. Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur Paris. 1989.