



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA EL  
AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS NO  
TUBERCULOSAS (MNT) A PARTIR DE  
MUESTRAS DE AGUA DE VENEZUELA**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Jesús Abrahams Torres Coy como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(es): Dr. Jacobus de Waard  
Dra. Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA  
FEBRERO 2011

**Dedico este trabajo especial de grado a la mujer que me dio su apoyo incondicional en todos los aspectos posibles. Por ser una persona que siempre tuvo una sonrisa y una disposición hacia mí brindándome su amor y cariño. Gracias a ti hoy cumplimos la primera de muchas metas trazadas. A ti que donde quieras que estés te agradezco infinitamente el ser mi guía y mi luz. Estoy y estaré por siempre orgulloso de ser tu nieto y amigo. Te recuerdo siempre mi bella y adorada abuelita Olga Coy Urdaneta a ti mil gracias.**

**Jesús Abrahams Torres Coy**

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre que me brindo su apoyo en todo momento para la realización de este trabajo especial de grado. A ti madre mis infinitas gracias.

A mis hermanos: Luis Argenis, Arlennys y Armando.

Al Dr. Jacobus de Waard por ser un insigne profesional investigador y amigo, que me brindo su apoyo y paciencia como tutor y me permitió realizar este trabajo especial de grado en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina.

A la Lic. Aileen Farreras por ser una excelente guía, amiga y compañera de labores que brindo infinita paciencia. A ti “madre” como cariñosamente te llamo mis infinitas y mil gracias.

A la profesora Guillermina Alonso por ser una excelente instructora y enseñarme a trabajar bajo presión. Muchas gracias.

Al personal del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, por su colaboración y apoyo brindado durante este tiempo de ejecución de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Biomedicina, por facilitarme el equipo de filtración para el procesamiento de las muestras de agua. A Uds. muchas gracias.

A mi profesora querida Roxana Gajardo por ser una gran amiga incondicional, comprensible y excelente profesional. Mil gracias.

A la señora Milagros del cuarto de esterilización de los laboratorios docentes de la escuela de Biología por brindarme momentos de alegría durante mi estadía como preparador de Genética y Microbiología.

A los profesores de la escuela de Biología de la UCV, por brindarme conocimientos a lo largo de mis estudios, muy especialmente a los(as) profesores Sheila Marqués Pauls, Laura Delgado, Jesús Romero y Blas Dorta, grandes amigos y colegas.

A mis compañeros de estudios muy especialmente a: Yeznaret Arzolay, Yarcely Rodríguez, Mariana Vásquez, Oscar Párraga, Olga Figuera, Carolina Pérez, Eliana Blanco, Michelle Alcalá.

A mis amigos de otras escuelas de la facultad de Ciencias.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela y Universidad del Zulia por ser mis casas de estudios.

**Jesús Abrahams Torres Coy**

## **ÍNDICE DE CONTENIDO**

<b>Índice de Tablas</b>	I
<b>Índice de Figuras</b>	III
<b>Lista de abreviaturas</b>	V
<b>Resumen</b>	VI
<b>Introducción</b>	1
1. Características Generales de las Micobacterias	2
2. Clasificación de las micobacterias	4
3. Las Micobacterias y el ambiente	9
4. Aislamiento de MNT a partir del ambiente	11
5. Identificación de MNT	15
<b>Antecedentes</b>	18
<b>Justificación</b>	27
<b>Objetivos</b>	30
1. Objetivos generales	30
2. Objetivos específicos	30
<b>Materiales y Métodos</b>	31
1. Material biológico	31
2. Protocolo para la optimización del método de concentración	31
2.1. Sedimentación	31
3. Protocolo para la optimización del método de descontaminación	33
3.1. Condición de filtración para el procesamiento de las muestras	33
3.1.1. Primera condición	33
3.1.2. Segunda condición	34
	V

3.2. Selección del agente químico descontaminante para el procesamiento de las muestras	34
4. Protocolo para evaluar el efecto del PANTA en la recuperación de MNT	36
5. Protocolo para el aislamiento de MNT a partir de muestras de agua de Venezuela	37
5.1. Recolección de las muestras de agua	
5.2. Procesamiento de las muestras de agua	
5.3. Coloración de Ziehl Nielsen	39
6. Protocolo para la identificación de MNT por PRA- <i>hsp65</i>	39
6.1. Aislamiento de ADN	39
6.2. Amplificación	39
6.3. Digestión de amplicones	40
7. Análisis estadístico	41
<b>Resultados</b>	<b>43</b>
1. Optimización del método de concentración	43
1.1. Sedimentación	43
2. Optimización del método de descontaminación	44
3.1. Condición de filtración para el procesamiento de las muestras	44
3.2. Selección del agente químico descontaminante para el procesamiento de las muestras	46
4. Evaluación del efecto del PANTA en la recuperación de MNT	48
5. Aislamiento de MNT a partir de muestras de agua de Venezuela	48
6. Identificación de MNT por PRA- <i>hsp65</i>	54
<b>Discusión</b>	<b>62</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>70</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>72</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>73</b>



<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>pág</b>
<b>Tabla 1.</b> Características generales de las micobacterias	2
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las micobacterias	6
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de las micobacterias desde el punto de vista clínico	8
<b>Tabla 4.</b> Hábitats donde se ha reportado el aislamiento de MNT	18
<b>Tabla 5.</b> Material biológico utilizado en los diferentes ensayos	31
<b>Tabla 6.</b> Ensayo de descontaminación de la suspensión de <i>M. abscessus</i> y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 con agentes químicos	34
<b>Tabla 7.</b> Ensayos para determinar el % de recuperación de micobacterias con los agentes químicos descontaminantes	35
<b>Tabla 8.</b> Ensayos de descontaminación para el aislamiento de MNT a partir de las muestras de agua recolectadas	38
<b>Tabla 9.</b> Componentes para la preparación de las reacciones de PRA- <i>hps65</i>	40
<b>Tabla 10.</b> Enzimas de restricción utilizadas en la técnica PRA- <i>hsp65</i>	41
<b>Tabla 11.</b> Preparación de las soluciones de enzimas de restricción empleadas en PRA- <i>hsp65</i>	41
<b>Tabla 12a.</b> Resultados de los ensayos de sedimentación de <i>M. abscessus</i> mediante la titulación con los ensayos sin Tween 80 1%	43
<b>Tabla 12b.</b> Resultados de los ensayos de sedimentación de <i>M. abscessus</i> mediante la titulación con los ensayos con Tween 80 1%	43
<b>Tabla 13.</b> Porcentaje de recuperación de las cepas de micobacterias utilizadas con los agentes químicos descontaminantes empelados	47
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje de recuperación con PANTA de las cepas de micobacterias utilizadas	48
<b>Tabla 15.</b> Desempeño de los métodos de aislamiento de MNT en el procesamiento de las muestras de agua recolectadas	49
<b>Tabla 16.</b> Prueba de Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar si existen diferencias significativas entre el número de muestras contaminadas por tratamiento	51
<b>Tabla 17.</b> Prueba de Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar si existen diferencias significativas en el número de muestras positivas por tratamiento	52
<b>Tabla 18.</b> Número de unidades formadoras de colonia (UFC) de micobacterias aisladas por cada método de descontaminación empleado	52
<b>Tabla 19.</b> Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 1 al 5	54

<b>Tabla 20.</b> Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 6 al 9	55
<b>Tabla 21.</b> Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 10 al 14	56
<b>Tabla 22.</b> Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 15 al 19	57
<b>Tabla 23.</b> Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 20 al 24	58
<b>Tabla 24.</b> Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 25 al 28	59
<b>Tabla 25.</b> Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 29 al 32	60
<b>Tabla 26.</b> Diversidad de especies aisladas por método de descontaminación	61
<b>Tabla 27.</b> Comparación en la diversidad de especies de MNT obtenidas por cada tratamiento de descontaminación empleado.	62

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>pág</b>
<b>Figura 1.</b> Pared celular de las micobacterias	4
<b>Figura 2.</b> Estructura química general de los QACs	12
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de los compuestos de amonio cuaternarios (QACs)	14
<b>Figura 4.</b> Medios a base de huevos utilizados para el cultivo de micobacterias	15
<b>Figura 5.</b> Tinciones de Ziehl-Nielsen	16
<b>Figura 6.</b> Tendencia en el número anual de pacientes con cultivos positivos de <i>M. tuberculosis</i> o MNT en Holanda.	28
<b>Figura 7.</b> Algunas infecciones humanas producidas por MNT	28
<b>Figura 8.</b> Porciones de volúmenes tomados cada uno por separado para el ensayo de sedimentación	32
<b>Figura 9.</b> Mapa de Venezuela indicando los estados donde fueron tomadas las muestras de agua para el aislamiento de MNT	37
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de <i>M. abscessus</i> y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 después del tratamiento con HPC al 0.005%.	44
<b>Figura 11.</b> Crecimiento de <i>M. abscessus</i> y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 después del tratamiento con HPC al 0.05%.	45
<b>Figura 12.</b> Crecimiento de <i>M. abscessus</i> y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 después del tratamiento con HPC al 0.75%.	45
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de <i>M. abscessus</i> y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 después del tratamiento con NaOH al 2%.	46
<b>Figura 14.</b> Tasas de postividad, negatividad y de contaminación obtenidas en los métodos de aislamiento de MNT	51
<b>Figura 15.</b> Producto de PCR-PRA <i>hsp65</i> sin digerir	53
<b>Figura 16.</b> Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA- <i>hsp65</i> de los aislados 1 al 5 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua	54
<b>Figura 17.</b> Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA- <i>hsp65</i> de los aislados 6 al 9 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua	55
<b>Figura 18.</b> Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA- <i>hsp65</i> de los aislados 10 al 14 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua	56
<b>Figura 19.</b> Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA- <i>hsp65</i> de los aislados 15 al 19 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua	57
<b>Figura 20.</b> Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA- <i>hsp65</i> de los aislados 20 al 24 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua	58

**Figura 21.** Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 25 al 28 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua 59

**Figura 22.** Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 29 al 32 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua 60

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

BCG: Bacilo de Calmette Guerin

COOH<sub>2</sub>: ácido oxálico

CPC: Cloruro de Cetil Piridinium

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

HPC: Cloruro de Hexadecil Piridinium

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión

*hsp65*: gen que codifica la proteína de choque térmico de 65 KDa en las micobacterias

LAM: Lipoarabinogalactano

MNT: Micobacterias No Tuberculosas

NaOH: Hidróxido de sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PANTA: Polimixina B+Anfotericina+ácido Nalidíxico+Trimetropina+Azlocilina

PBS: Buffer Fosfato Salino

PCR-RFLP: PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción).

PGL: Glicolípidos fenólicos

PRA: PCR-Restriction Enzyme Analysis (Análisis de polimorfismo con enzimas de restricción).

*rpoB*: gen que confiere resistencia a la rifampicina en las micobacterias.

SDS: Dodecil de sulfato sódico

TBE: Buffer Tris-ácido bórico-EDTA

TE: Buffer Tris-EDTA

$\chi^2$ : Análisis de Chi-Cuadrado.

## RESUMEN

Las micobacterias (del género *Mycobacterium*) son un grupo de organismos muy heterogéneos en términos de metabolismo, tiempo de crecimiento, nicho ambiental, epidemiología, patogenicidad y distribución geográfica. Son bacterias ácido resistentes que presentan una pared celular rica en lípidos y ácidos micólicos que les otorgan gran hidrofobicidad, adherencia superficial, capacidad de formar biopelículas, adherencia superficial, así como resistencia a ciertos desinfectantes y antibióticos. Desde el punto de vista clínico las micobacterias se dividen en patógenos estrictos, patógenos oportunistas y saprófitas. Actualmente se han descrito más de 140 especies de micobacterias de las cuales la mayoría pertenecen al grupo de las denominadas Micobacterias No Tuberculosas (MNT) o micobacterias atípicas, término que fue propuesto para hacer referencia a aquellas micobacterias que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis* o *M. leprae*.

Las MNT han sido reportadas en los últimos años como patógenos emergentes y causantes de cuadros clínicos diferentes en síntomas y tratamiento a la tuberculosis (TB) que en conjunto se denominan "micobacteriosis" y que en la gran mayoría se encuentran condicionadas al virus del SIDA y asociadas a pacientes inmunocomprometidos. Se ha aceptado que la fuente de transmisión es el ambiente (fundamentalmente el agua y el suelo) debido a que la transmisión persona persona es rara.

El aislamiento de MNT requiere del uso de métodos de descontaminación y de medios selectivos que por lo general derivan de los empleados en el diagnóstico de la TB. En este sentido comparamos un grupo de agentes químicos descontaminantes (Cloruro de Hexadecil Piridinium ó HPC al 0.05% y 0.75%, NaOH al 2% y 4%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico 6%) para evaluar el porcentaje de recuperación frente a aislados clínicos de especies representativas de MNT (*M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium* y *M. simiae*) y así determinar el mejor método de descontaminación que luego se empleó en el procesamiento de muestras de agua recolectadas en diversas regiones de Venezuela. Posteriormente los aislados fueron identificados con la técnica molecular PRA-*hsp65*.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que existe una variable sensibilidad de las MNT utilizadas ante los agentes químicos descontaminantes y que al parecer depende del tiempo de crecimiento (rápido o lento) de las especies. Sin embargo HPC al 0.05% demostró ser el que obtuvo un mayor porcentaje de recuperación para todas las especies evaluadas; mientras que NaOH al 2% y 4% y ácido sulfúrico al 6% demostraron ser los agentes con menores porcentajes de recuperación comprometiendo seriamente la viabilidad de las MNT ensayadas. En cuanto al procesamiento de las muestras de agua se obtuvo una mayor tasa de muestras positivas, menor tasa de contaminación y mayor diversidad de especies de MNT cuando se empleo el método de HPC al 0.05% que cuando se uso el método de ácido oxálico al 5% lo cual fue demostrado significativamente mediante un análisis de Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ). Sin embargo con el método de ácido oxálico al 5% se obtuvo en promedio un mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) que con HPC al 0.05%.

Con la técnica de PRA-*hsp65* se identificaron correctamente a nivel de especie todos los aislados obtenidos de las muestras de agua a excepción de uno que probablemente se trate de una nueva especie. De igual forma encontramos una gran diversidad de especies de MNT en nuestro estudio siendo *M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. abscessus* las más abundantes.

Nosotros concluimos que este trabajo aporta valiosa información de aspecto clínico que puede ser utilizada para determinar la fuente de infección de micobacteriosis cuyos casos han aumentado en la población de nuestro país.

## INTRODUCCIÓN

Las micobacterias son agentes que constituyen sin duda un capítulo importante de la patología infecciosa humana ya que muchas de ellas causan enfermedades con una gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial, como la tuberculosis (TB), la lepra y, en las últimas décadas, las denominadas “micobacteriosis” (Casal y col., 1999).

La TB es una enfermedad infecciosa, contagiosa, granulomatosa y de evolución crónica, que afecta fundamentalmente a los pulmones. La especie *Mycobacterium tuberculosis*, es el principal agente etiológico de esta enfermedad (Reyes, 2002). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la TB es una de las enfermedades más antiguas del que se tiene registro y para el año de 1983 fue declarada como una enfermedad de urgencia mundial (Schlossberg, 2000).

En los países desarrollados, se ha incrementado en los últimos años el aislamiento de numerosas especies de micobacterias, tanto conocidas como de nueva descripción. Actualmente, dentro del género *Mycobacterium*, se incluyen a más de 140 especies, muchas de ellas de gran importancia clínica, ya que son los agentes causales de infecciones humanas, sobre todo en pacientes con estado de inmunosupresión o inmunodepresión, condicionado en algunos casos al virus del SIDA, cáncer, quimioterapia, enfermedades autoinmunes, enfermedades con obstrucción pulmonar crónica, fibrosis quística u otras condiciones de predisposición (Fernández de Vega, 2005).

La mayoría de las especies de micobacterias pertenecen al grupo de las denominadas “Micobacterias No Tuberculosas” (MNT); término que fue propuesto por Wolinsky en 1979, para hacer referencia a aquellas micobacterias que no son miembros ni del complejo *M. tuberculosis* (conformado por las especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microtti* y *M. mungi*), ni del complejo *M. leprae* (*M. leprae* y *M. lepraemurium*), además que no son patógenos obligatorios de humanos y animales. Las MNT también se denominan como “Micobacterias Atípicas” (Runyon y Timpe, 1954); “Micobacterias diferentes a tuberculosis” (Casal y Casal, 2000), “Micobacterias oportunistas” (Casal y Casal, 2000) o más recientemente como “Micobacterias ambientales (MA)”, este último nombre debido a su distribución en el ambiente es amplia, encontrándose fundamentalmente en el agua y el suelo, los cuales representan sus principales reservorios naturales (Casal y Casal, 2000).

## 1. Características Generales de las Micobacterias

Las micobacterias son bacilos largos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (entre 20 y 60%). El contenido de bases de guanina más citosina en la molécula de ADN es de 62 al 70% (Ryan y Ray, 2004).

Según Falkinham (2008) las principales características distinguibles de las micobacterias son: la presencia de una pared celular altamente rica en lípidos, crecimiento lento (en comparación con otras bacterias) y su hidrofobicidad; los cuales son consecuencias de la distribución ubicua de estos organismos en el ambiente y por ende un determinante para que el hombre esté rodeado por éstas (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Características generales de las micobacterias** (Tomado y modificado de Primm y col., 2004).

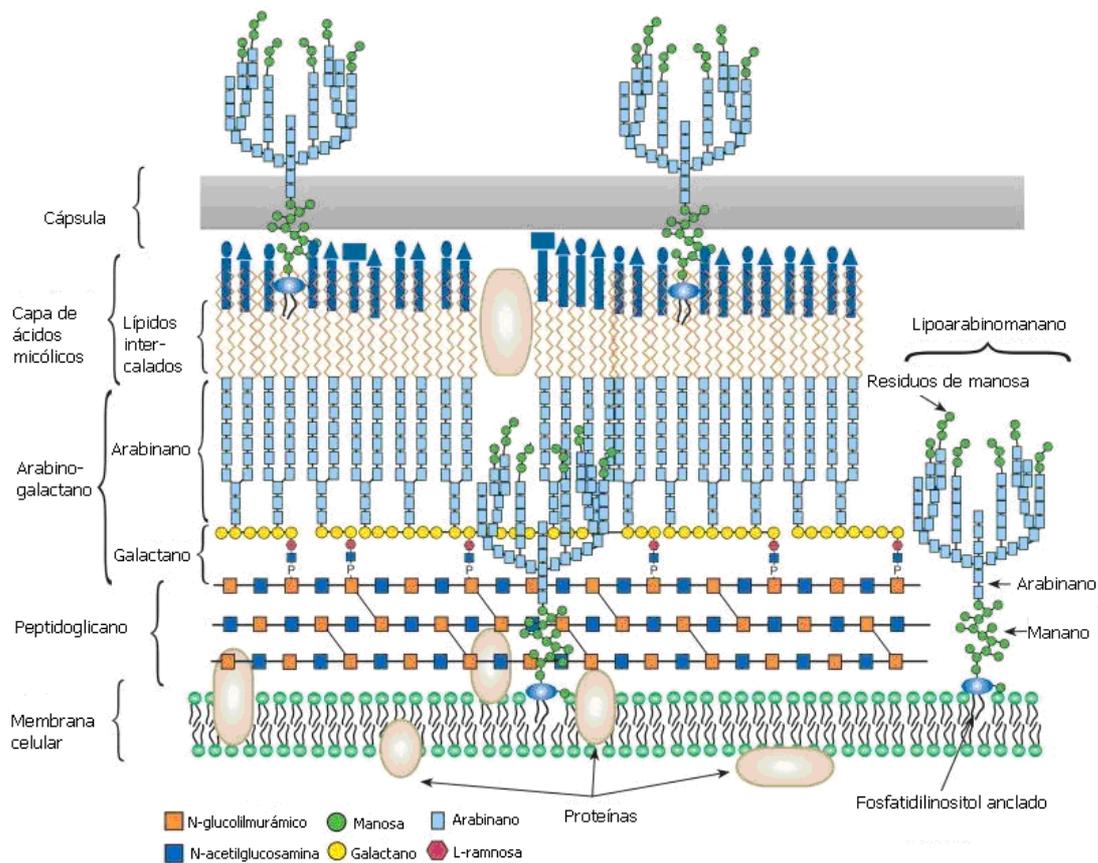
Característica	Debido a:	Ventaja
Crecimiento lento	Un solo cistrón de rARN	Resistencia a antibióticos. Adaptación
Impermeabilidad Transporte limitado Demanda energética para la síntesis de ácidos grasos	Pared celular altamente rica en lípidos.	Resistencia antimicrobiana Impermeabilidad por los hidrocarburos.
Impermeabilidad a nutrientes hidrofílicos	Superficie hidrofóbica	Tolerancia a condiciones de estrés celular y/o ambiental. Resistencia a antibióticos de tipo hidrofílico. Formación de biopelículas. Adherencia superficial Aerosoles Fagocitables Degradación de hidrocarburos.

Una de las características distintivas de las micobacterias es su pared celular, la cual consiste en una membrana externa hidrofóbica, cerosa y rica en lípidos, constituida por largas cadenas de ácidos micólicos. Esos lípidos, como glicolípidos, glicolípidos fenólicos (PGLs), fenolfitiocerol, dimicocerosato de fitiocerol y glicopeptidolípidos, son altamente hidrofóbicos y refractarios al ataque hidrolítico por parte de enzimas celulares. Los lípidos de la pared celular son los responsables del 60% del peso seco de las micobacterias; confiriéndoles a las mismas propiedades que les permite resistir a condiciones ambientales adversas (Liu y col., 1999).

Los ácidos micólicos o beta-hidroxiácidos se ubican en la capa más externa de la pared celular y representan el principal constituyente de la misma. Estos ácidos tienen entre 70 a 80 carbonos ramificados, que además se estructuran formando una capa lipídica similar a la membrana externa clásica de cualquier organismo Gram negativo (Steck y col., 1978). Los ácidos micólicos están esterificados con el arabinogalactán o arabinogalactano (componente medio), un polímero formado por residuos D-galactofuranosil y D-arabinofuranosil. El arabinogalactán se conecta con el péptidoglicano, a nivel del ácido murámico (en posición 6), vía un disacárido, que se conoce como "Factor cuerda". Este disacárido es abundante en todas las micobacterias patógenas (Wolinsky y col., 1990). La capa más interna de las micobacterias es el glicopéptido o péptidoglicano, junto a moléculas de N-acetilglucosamida y ácidos-N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina, esta capa es el esqueleto de las bacterias que le da forma y rigidez. La cápsula polisacarídica está conformada por glucanos, mananos y arabinogalactanos (Figura 1) (Casal y col., 2003).

En cuanto a la permeabilidad, los solutos pueden atravesar la pared celular de las micobacterias por múltiples rutas. Pequeños solutos hidrofílicos pueden difundir a través de canales formados por porinas (Falkinham, 2008) mientras que solutos lipofílicos pueden no estar favorecidos para pasar a través de canales de agua formados por porinas, difundiendo por lo tanto a través de la bicapa lipídica. Mientras que agentes tales como rifamicinas, tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas, todas relativamente moléculas lipofílicas, utilizan su dominio lipídico para atravesar la pared celular de las micobacterias (Liu y col., 1999).

Según Brennan y Nikaido (1995), la pared de las micobacterias les confiere gran hidrofobicidad, impermeabilidad, adherencia superficial, capacidad de formación de biopelículas y resistencia a ciertos desinfectantes y antibióticos. Por lo tanto, la presencia de esa pared celular constituye el mayor determinante ecológico y epidemiológico de las micobacterias (Falkinham, 2008).



**Figura 1. Pared celular de las micobacterias** (Tomado y modificado de Brennan y Crick, 2007).

Otra característica de las micobacterias es que su crecimiento, en comparación con otras bacterias, es lento, necesitando entre 4 a 48 horas para duplicarse (dependiendo de la especie). Esto se debe fundamentalmente a dos factores que están asociados con la membrana externa. Uno es la síntesis costosa que implica la formación de largas cadenas de los constituyentes de la pared celular (en especial de los ácidos micólicos) y la impermeabilidad a los nutrientes hidrofílicos que eso implica (Falkinham, 2008). Sin embargo, estos costos son compensados por la presencia de una barrera hidrofóbica que promueve la adherencia de las micobacterias a superficies, permitiendo su persistencia en hábitats donde pudieron haber sido eliminadas (Berding y col., 1993).

Otro factor que determina el crecimiento lento de las micobacterias es el bajo número (uno o dos copias) de operones de rARN que limita la tasa de síntesis proteica y por ende es un gran determinante del crecimiento celular (Falkinham, 2008).

Falkinham (2010) refiere que el bajo número de copias de operones de rARN restringe la capacidad de las micobacterias de absorber nutrientes y sintetizar proteínas, por lo que el crecimiento se hace lento. Sin embargo, a pesar de esto, la tasa de metabolismo de las micobacterias (medido en términos de consumo de oxígeno) es igual al de otras

bacterias. Esta característica le proporciona a las micobacterias la capacidad de responder a cambios ambientales y por consiguiente adaptarse a ellos.

La hidrofobicidad de las micobacterias es una propiedad conferida por la pared celular que les permite a estos microorganismos estar protegidos y ser resistentes a un amplio rango de agentes antimicrobianos y desinfectantes, lo cual constituye un mecanismo de resistencia intrínseca. Además, en las micobacterias existen otros mecanismos como las bombas de eflujo y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos que también les confiere resistencia (Webb y Davies, 1998).

Adicionalmente, la hidrofobicidad les confiere la capacidad de concentrarse en las interfases aire-agua y agua-superficie, donde los nutrientes y compuestos orgánicos metabolizables están en alta concentración y concentrarse dentro de burbujas en una columna de agua (Falkinham, 2009 y 2010).

## 2. Clasificación de las micobacterias

Desde el punto de vista taxonómico se clasifican en:

**Dominio:** Bacteria

**Phylum:** Actinobacteria

**Orden:** Actinomycetales

**Suborden:** Corynebacterineae

**Familia:** Mycobacteriaceae

**Género:** *Mycobacterium*

En 1954 Runyon y Timpe, establecieron una clasificación en base a la velocidad de crecimiento y producción de pigmentos sobre medio sólido Lowenstein Jensen, el cual es un medio elaborado a base de huevo que contiene verde malaquita como inhibidor para el crecimiento de hongos y que es ampliamente utilizado para el cultivo de micobacterias. En esta clasificación las micobacterias se agrupaban en dos grandes grupos: micobacterias de crecimiento rápido, que son aquellas que necesitan menos de 7 días para producir colonias visibles sobre medio de cultivo sólido y las micobacterias de crecimiento lento, las cuales necesitan hasta inclusive 8 semanas de incubación.

En cuanto a la producción de pigmentación Korman y colaboradores (1997), menciona que se consideran como micobacterias fotocromógenas aquellas que son capaces de producir pigmentos en presencia de luz; mientras que las micobacterias escotocromógenas, son aquellas micobacterias caracterizadas por la producción de pigmentos en la ausencia de luz, y las micobacterias no cromógenas son las que no

producen pigmento. También menciona que algunas especies suelen producir pigmentación variable o irregular sobre medio Lowenstein Jensen (tabla 2).

**Tabla 2. Clasificación de las micobacterias.** Según Runyon y Timpe, 1954 (Tomado y modificado de Casal y Casal, 2000).

Clasificación de las micobacterias. Grupos de crecimiento lento	
<p><b>Grupo I Fotocromógenas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. kansasii</i></li> <li>- <i>M. asiaticum</i></li> <li>- <i>M. intermedium</i></li> <li>- <i>M. buckleyi</i></li> </ul> <p><b>Grupo II Escotocromógenas</b></p> <p>a) Pigmento rosa-rojo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. lycopinogenes</i></li> <li>- <i>M. lactis</i></li> <li>- <i>M. hiberniae</i></li> </ul> <p>b) Pigmento amarillo-naranja:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. gordonae</i></li> <li>- <i>M. marinum</i></li> <li>- <i>M. flavescens</i></li> <li>- <i>M. szulgai</i></li> <li>- <i>M. interjectum</i></li> <li>- <i>M. bohemicum</i></li> <li>- <i>M. lentiflavum</i></li> <li>- <i>M. tusciae</i></li> </ul> <p>c) Pigmento irregular:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. xenopi</i></li> <li>- <i>M. simiae</i></li> <li>- <i>M. ulcerans</i></li> </ul>	<p><b>Grupo III No cromógenas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. tuberculosis</i></li> <li>- <i>M. bovis</i> (<i>M.bovis</i> variante BCG)</li> <li>- <i>M. africanum</i></li> <li>- <i>M. avium</i></li> <li>- <i>M. intracellulare</i></li> <li>- <i>M. gastri</i></li> <li>- <i>M. terrae</i></li> <li>- <i>M. triviale</i></li> <li>- <i>M. nonchromogenicum</i></li> <li>- <i>M. malmoense</i></li> <li>- <i>M. haemophilum</i></li> <li>- <i>M. shimoidei</i></li> <li>- <i>M. genavense</i></li> <li>- <i>M. conspicuum</i></li> <li>- <i>M. celatum</i></li> <li>- <i>M. triplex</i></li> <li>- <i>M. branderii</i></li> <li>- <i>M. paratuberculosis</i></li> <li>- <i>M. heidelbergense</i></li> <li>- <i>M. sherrisii</i></li> </ul>
Clasificación de las micobacterias. Grupos de crecimiento rápido	
<p><b>Grupo IV: Fotocromógenas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. novocastrense</i></li> </ul>	
<p><b>Grupo V: Escotocromógenas</b></p> <p>a) Pigmento rosa-rojo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. engbaeckii</i></li> <li>- <i>M. thamnophaeos</i></li> <li>- <i>M. rhodochroux</i></li> </ul> <p>b) Pigmento amarillo-naranja:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. acapulcense</i></li> <li>- <i>M. aurum</i></li> <li>- <i>M. duvali</i></li> <li>- <i>M. gadium</i></li> <li>- <i>M. neoaurum</i></li> <li>- <i>M. gilvum</i></li> </ul> <p>c) Pigmento irregular:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. phlei</i></li> <li>- <i>M. vaccae</i></li> <li>- <i>M. thermoresistibile</i></li> <li>- <i>M. parafortuitum</i></li> </ul>	

---

- <i>M. obuense</i>	- <i>M. diernhoferi</i>
- <i>M. rhodesiae</i>	- <i>M. smegmatis</i>
- <i>M. aichiense</i>	- <i>M. goodii</i>
- <i>M. chubuense</i>	- <i>M. wolynski</i>
- <i>M. tokaiense</i>	- <i>M. austroafricanum</i>
- <i>M. hassiacum</i>	- <i>M. confluentis</i>
	- <i>M. cosmeticum</i>

**Grupo VI: No cromógenas**

- <i>M. fallax</i>	
- <i>M. fortuitum (M. ranae)</i>	
- <i>M. abscessus</i>	- <i>M. mucogenicum</i>
- <i>M. chelonae</i>	- <i>M. peregrinum</i>
- <i>M. agri</i>	- <i>M. salmoniphilum</i>
- <i>M. chitae</i>	- <i>M. mageritense</i>
- <i>M. moriokaiense</i>	- <i>M. septicum</i>
	- <i>M. immunogenum</i>

---

Casal y Casal (2000) clasifican clínicamente a las micobacterias en tres grupos: patógenos estrictos, patógenos oportunistas y saprófitas. Las patógenas estrictas, con un alto riesgo de transmisión por el aire. La enfermedad suele ser grave para el individuo y a veces fatal y de riesgo variable para la comunidad. A este grupo pertenecen los miembros del complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Otro grupo de micobacterias se consideran como patógenos oportunistas, ya que son patógenos potenciales con riesgo individual moderado y de variable gravedad para la comunidad. Por último el tercer gran grupo encuadra micobacterias que nunca o excepcionalmente han sido descritas como causantes de patología en el hombre. Estas especies se denominan como saprófitas (tabla 3).

**Tabla 3. Clasificación de las micobacterias desde el punto de vista clínico.** Según la capacidad de producir patología humana (Tomado de Casal y Casal, 2000).

Grupos	Patógenas	Oportunistas Mayores	Oportunistas Menores	Saprophytas
I		<i>M. kansasii</i>	<i>M. intermedium</i> <i>M. buckleii</i> <i>M. asiaticum</i>	
II		<i>M. scrofulaceum.</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. simiae</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. gordonae</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. bohemicum</i> <i>M. tusciae</i>	<i>M. flavescens</i>
III	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> <i>M. canetti</i>	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. schimodei</i>	<i>M. bovis</i> BCG <i>M. celatum</i> <i>M. genavense</i> <i>M. branderi</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. heidelbergense</i>	<i>M. gastri</i> <i>M. terrae</i> <i>M. trivale</i> <i>M. nonchromogenicum</i>
IV		<i>M. marinum</i>	<i>M. novocastrense</i>	
V			<i>M. godoi</i> <i>M. wolinsky</i> <i>M. smegmatis</i>	<i>M. acapulcense</i> <i>M. aurum</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. gadium</i> <i>M. hasiaticum</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. vaccae</i>
VI			<i>M. abscessus</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. septicum</i> <i>M. immunogenum</i>	

Caminero (2001), menciona que las micobacterias deberían agruparse y/o clasificarse de acuerdo a las enfermedades que producen, las cuales son: pulmonar (como por ejemplo *M. avium*, *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, entre otras); linfadenitis (entre las que destacan *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. haemophilum*, entre otras); infecciones cutáneas (donde las más importantes son: *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. ulcerans* y *M. marinum*) y enfermedades diseminadas (*M. avium*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. simiae*, entre otras).

### 3. Las micobacterias y el ambiente

Las MNT son habitantes naturales de una gran variedad de ambientes tanto naturales como modificados por el hombre. Estos microorganismos están ampliamente distribuidas en cuerpos de aguas naturales (lagos, ríos, lagunas, bahías de agua salada, entre otros) en sistemas de distribución de agua potable y en suelos. Más de 20 especies de MNT han sido descritas en sistemas de distribución de agua potable ya sea formando biopelículas, formando agregados celulares, interactuando como simbioses con protozoarios de vida libre, comensales o bien como saprófitas (Covert y col., 1999; Falkinham 1996 y 2002; Falkinham y col., 2008).

La distribución de las MNT en el ambiente se ve influenciada por diversos factores o determinantes entre los que se incluyen los fisicoquímicos y factores ocasionados por el ser humano. Entre los factores fisicoquímicos la composición del agua o del suelo ejerce un fuerte efecto en la presencia y distribución de especies de MNT en el ambiente. Según van Ingen y colaboradores (2009), la presencia de MNT está asociada positivamente con la acidez del agua o del suelo, contenido de ácido húmico y fúlvico (dos importantes constituyentes de materia orgánica), concentración de oxígeno disuelto, bajos niveles de pH y la presencia de otras bacterias heterotróficas. En el caso del pH se ha demostrado que bajos niveles de éste ocasiona una elevada concentración de iones metálicos en el agua por lo que la prevalencia de MNT en el ambiente se correlaciona positivamente con la presencia de iones como:  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{3+}$  y  $\text{Cr}^{2+}$  (Ivanainen y col., 1993).

Se ha demostrado que existen asociaciones negativas entre la presencia de MNT y la toxicidad química del agua, especialmente por el contenido de cloro libre de la misma. Las MNT son microorganismos oligotróficos, es decir, que son capaces de crecer a bajos niveles de carbono (> 50  $\mu\text{g/L}$  de carbono orgánico asimilable), lo que les permite crecer en ambientes con pocos nutrientes o desinfectados, como el agua potable (Falkinham, 2008).

El efecto de la temperatura sobre la prevalencia de MNT en el ambiente es controversial, ya que la presencia de estos microorganismos en el agua se ha asociado con altas y bajas temperaturas. Sin embargo, la susceptibilidad de las MNT a la temperatura del agua difiere de acuerdo a la especie (van Ingen y col., 2009).

En cuanto a los factores ocasionados por el hombre y que fomentan la distribución de MNT en el ambiente, se encuentran el uso de desinfectantes y antibióticos en sistemas de distribución de agua potable. La desinfección del agua potable reduce el número de microorganismos y virus causantes de enfermedades gastrointestinales, pero tiene poco

efectos sobre el número de micobacterias. De hecho, la desinfección permite la selección de MNT en sistemas de distribución de agua potable, debido a que no hay otros microorganismos que compitan por el carbono disponible en tales sistemas (Falkinham, 2010).

Falkinham (2010), reporta que en Estados Unidos algunos ríos y arroyos contienen cantidades de antibióticos lo que representa un factor para la selección de MNT, en vista de la resistencia intrínseca que presentan a algunas drogas. En ese mismo orden de ideas, a pesar de que las concentraciones de antibióticos en sistemas de distribución de agua potable se encuentran al nivel de las concentraciones mínimas inhibitorias para algunos microorganismos, tales concentraciones, no afectan a las MNT.

Las MNT poseen diversos mecanismos que les permiten sobrevivir en el ambiente; entre ellos se encuentran la formación de biopelículas, los aerosoles y las interacciones con algunos protozoarios (van Ingen y col., 2009).

Una biopelícula es una comunidad microbiana que se adhiere a una interfase aire-superficie o agua-superficie produciendo una matriz extracelular de sustancias poliméricas para su mantenimiento en un determinado ambiente (van Ingen y col., 2009). Según Yamazaki y colaboradores (2006) la formación de biopelículas se ha relacionado con la síntesis de glicopeptidolipidos y la expresión de varios genes.

Donlan y Costerton (2002), mencionan que dentro de las biopelículas, las micobacterias pueden cambiar de fenotipo, es decir, con respecto al tipo de morfología de la colonia (lisa, rugosa, mucosa, entre otras), cambiar la tasa de crecimiento e inclusive cambiar hasta el perfil de transcripción génica. La formación de biopelículas es una importante estrategia desarrollada por las micobacterias, que les ha permitido no sólo sobrevivir en sistemas de distribución de agua potable sino estar presentes permanentemente en aguas corrientes como la de los ríos y arroyos. De hecho en diversos estudios han reportado que *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. avium*, son las especies mayormente involucradas en la formación de biopelículas en aguas potables (van Ingen y col., 2009).

Otro mecanismo es la formación de aerosoles por parte de las MNT en masas de agua. Las micobacterias tienen la capacidad de ser transferidas desde el agua al aire debido a la hidrofobicidad de las mismas, en donde las células hidrofóbicas de las micobacterias se adhieren a las burbujas de aire, las cuales al ascender por una columna

de agua y alcanzar la superficie se rompen y liberan a las micobacterias presentes en ellas. De hecho, según Falkinham (2009) este mecanismo representa una ruta para la adquisición de enfermedades de tipo pulmonar en humanos por MNT.

Las MNT interaccionan con ciertos protozoarios de vida libre como amebas y otros presentes en el agua. Dentro de las amebas, las MNT son capaces de sobrevivir e inclusive crecer como si se tratase de una endosimbiosis. Esta interacción les permite estar protegidas de cambios hostiles en el ambiente (Cirillo y col., 1997). La asociación con amebas hace que las MNT tengan la capacidad de infectar humanos, ya que el mecanismo necesario para sobrevivir dentro de las amebas puede ser similar a aquellos necesarios para infectar células fagocíticas humanas tales como macrófagos, lo que posiblemente permite el establecimiento y/o desarrollo de enfermedades causadas por las micobacterias en general (van Ingen y col., 2009).

#### **4. Aislamiento de MNT a partir del ambiente**

El aislamiento de MNT a partir de muestras ambientales requiere el uso de métodos de descontaminación y de medios selectivos debido al riesgo que representa un crecimiento excesivo de otras bacterias y hongos que están presentes también en el ambiente, y que comparados con las micobacterias presentan una mayor velocidad de crecimiento pudiendo, por lo tanto inhibir el desarrollo de las mismas en los medios de cultivo (du Moulin y Stottmeier, 1978; Hirsch y Christensen, 1983; Ivanainen y col., 1993).

Los procedimientos para la descontaminación de muestras ambientales para el aislamiento de MNT derivan de los procedimientos usados en el diagnóstico de la tuberculosis a partir de muestras clínicas, como esputo y biopsias (du Moulin y Stottmeier, 1978; Songer, 1980). Los métodos más empleados son aquellos que usan como agentes químicos a los ácidos, bases fuertes y compuestos de amonio cuaternario (QACs por sus siglas en inglés) (Cortesia, 2006).

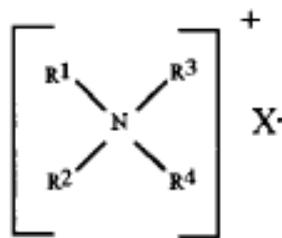
Uno de esos procedimientos es utilizando el hidróxido de sodio (NaOH), el cual es una base fuerte cuya actividad es proporcional al grado de disociación y a la concentración de iones hidroxilo resultantes. Es un agente que posee una acción bactericida frente a bacterias Gram negativas y virus con envoltura, mientras que *M. tuberculosis* ha demostrado ser estable ante la presencia del mismo (Iañez, 1998).

El mecanismo de acción del NaOH es la actuación a través de los iones OH<sup>-</sup>, saponificando los lípidos de la envoltura externa (tanto en bacterias como en virus con

envoltura), y originando la destrucción de la membrana celular. A niveles de pH superiores a 10, se desorganiza la estructura del peptidoglicano y la hidrólisis de los nucleótidos en virus envueltos ocasionando un desequilibrio osmótico (Iañez, 1998).

Otros métodos empleados en la descontaminación de muestras de esputo son los métodos del ácido oxálico ( $C_2H_2O_4$ ) y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). El mecanismo de acción de estos agentes se fundamenta en la desnaturalización, o al menos, inhibición de la actividad de enzimas y moléculas ácido-lábiles como el ATP, presentes en las membranas de las bacterias. Esto se debe a que las concentraciones de hidrógenos afectan el estado iónico de las enzimas ligadas a la membrana que regulan el tamaño y la variación del flujo de protones (Brown y Mayes, 1980).

Los compuestos de amonio cuaternarios (QACs por sus siglas en inglés de Quaternary Ammonium Compounds), son aquellos compuestos que poseen un átomo de nitrógeno unido a cuatro sustituyentes alquílicos o arílicos (Figura 2). El nitrógeno en esta situación posee una carga positiva que se mantiene independientemente del pH del medio (McDonnel y Russel, 1999).

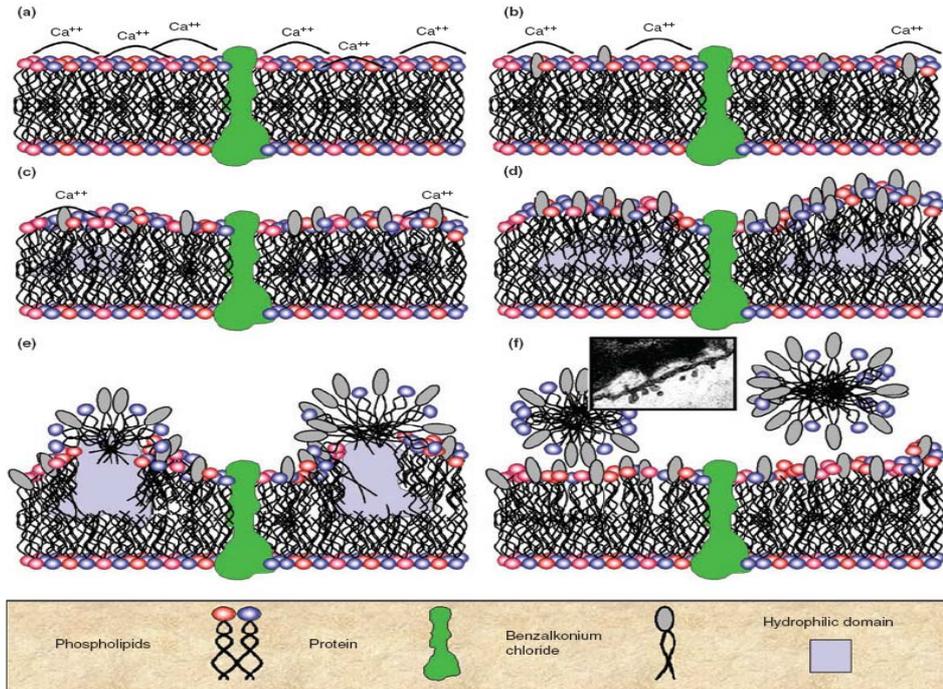


**Figura 2. Estructura química general de los QACs.** El átomo de nitrógeno está cargado positivamente y se une a cuatro sustituyentes alquílicos o arílicos (R). La X<sup>-</sup> representa los aniones que forman parte del compuesto (Tomado de Gilbert y Moore, 2005).

Los QACs se caracterizan por ser agentes activos sobre superficies, es decir, son surfactantes catiónicos. Este término es referido a los compuestos que contienen largas cadenas de 8 a 25 átomos de carbono (que se derivan de un ácido graso o de un derivado petroquímico), un átomo de nitrógeno cargado positivamente y algún anión como: Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup> o un grupo SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Como ejemplos de QACs se encuentran: Cloruro de Alquil Dimetil Bencil Amonio, Cloruro de Cetil Trietil Amonio, Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio, Cloruro de Cetil Piridinium (CPC), Cloruro de Hexadecil Piridinium (HPC), entre otros (Salton, 1968; McDonnel y Russel, 1999).

El mecanismo de acción de los QACs se basa en que ellos actúan uniéndose irreversiblemente a los fosfolípidos y proteínas de la membrana citoplasmática interna de las bacterias o la membrana plasmática de las levaduras alterando su permeabilidad (McDonnel y Russel, 1999). Salton en 1968, propuso el flujo en la secuencia de eventos

que ocurren cuando los microorganismos son expuestos a estos agentes catiónicos. En primer lugar ocurre la adsorción y penetración del agente dentro de la pared celular. Específicamente la porción hidrofóbica penetra en la membrana mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos provocando alteraciones. Luego ocurre una salida de metabolitos de fósforo y nitrógeno desde el citoplasma, lo cual permite que el desinfectante penetre al interior celular causando un efecto secundario que es la degradación de proteínas, ácidos nucleicos e inactivación de enzimas productoras de energía (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismo de acción de los compuestos de amonio cuaternarios (QACs).** Los segmentos a-f muestran la adsorción progresiva de la cabeza de estos compuestos dentro de los fosfolípidos de la membrana a medida que incrementa su concentración y tiempo de exposición. Esto conlleva a una disminución de la fluidez de la bicapa y crea vacíos hidrofílicos en la membrana (d y e). La función de las proteínas es perturbada con una eventual lisis de la célula y solubilización de los fosfolípidos y proteínas dentro de las micelas QAC/fosfolípidos (f). La micrografía muestra la formación de vesículas a partir de la membrana externa causada por el tratamiento de QAC (Tomado y modificado de Gilbert y Moore, 2005).

Los medios más utilizados para el cultivo de MNT, son medios ricos elaborados a base de huevo como los de Lowenstein Jensen (LJ), Ogawa Kudoh (OK) y Stonebrik, los cuales están constituidos generalmente por una fuente carbono (glicerol para los medios LJ y OK y piruvato de sodio para el medio Stonebrik), asparagina (como fuente de nitrógeno), sales minerales (como citrato de sodio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio) y una solución de verde malaquita que permite la inhibición de bacterias y hongos (Figura 4). Este tipo de medio requiere de procesos de coagulación y tienen como ventaja que pueden resistir largos períodos de desecación así como neutralizar sustancias empleadas como agentes descontaminantes como NaOH y QACs. Los mismos tienen como desventaja que

no pueden ser suplementados con antibióticos debido a que la concentración de éstos sufre modificaciones durante la coagulación de los medios (Kleeberg y Nel, 1980).



**Figura 4.** Medios a base de huevos utilizados para el cultivo de micobacterias. Tomado de <http://www.cosmosbiomedical.com/education/bacteriology/1-M.tuberculosis.shtml> (Consulta 15 de Agosto de 2010).

Debido a que la mayoría de las MNT pueden crecer a bajos niveles de sales minerales, se han desarrollado otros tipos de medios cuya base es el agar. Entre estos medios se encuentran los de Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 suplementados con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) así como el medio Tripticasa de Soya. La ventaja de estos medios es la fácil elaboración y que pueden suplementarse con antibióticos y fungicidas, pero a la vez son susceptibles a la desecación (Falkinham, 2010). Tan solo algunas especies de MNT como *M. genavense* o *M. haemophilum* precisan de algunos suplementos como micobactinas, heminas u otros componentes férricos para su crecimiento. Mientras que un caso aparte lo representa *M. leprae* que es incapaz de crecer en medios sólidos y líquidos, logrando sólo su cultivo por medio del uso de animales ([www.higiene1.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap24.pdf](http://www.higiene1.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap24.pdf). Consulta: 23 de Agosto de 2010).

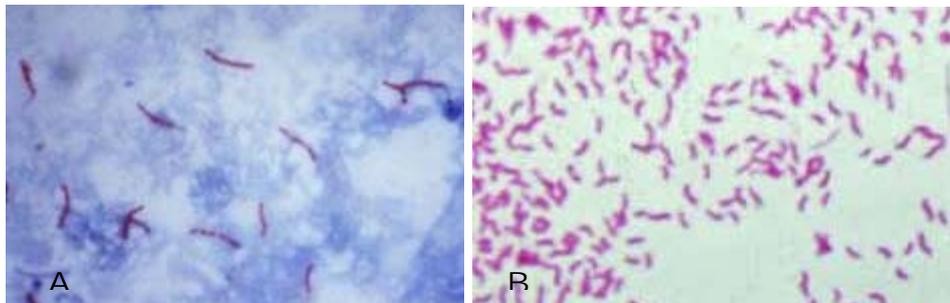
## 5. Identificación de MNT

Para la identificación del género *Mycobacterium* existen diversos tipos de metodologías: bioquímicas o convencionales, cromatográficas y los nuevos métodos, como el molecular (Alcaide y col., 2005).

En primer lugar se realiza una identificación preliminar mediante el tiempo de crecimiento (lento o rápido), los aspectos morfológicos (colonias lisas, rugosas, mucosas) y la producción de pigmento de las colonias (fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas) (Fernández de Vega, 2005).

Una de las pruebas de primera instancia es la coloración de Ziehl-Nielsen (ZN) o también llamada reacción ácido graso-rápido. La presencia de abundantes ácidos grasos

en la pared de las micobacterias les confiere la propiedad de ser ácido resistente y de retener ciertos colorantes de amilina, a pesar de ser tratados por una mezcla de alcohol y ácido. En este hecho, se basa la técnica de ZN, en la que se emplea como colorante fucsina fenilada calentada para que penetre en la pared celular y una posterior decoloración con alcohol-ácido para luego contrateñir con azul de metileno. El resultado es positivo cuando los bacilos de las micobacterias se colorean de fucsia y negativo cuando aparecen de color azul (Figura 5) (Liu y col., 1999).



**Figura 5. Tinciones de Ziehl-Nielsen.** Los bacilos ácido resistentes (BAAR) se muestran de color fucsia sobre un fondo azul. (A) BAAR observados en una muestra clínica, (B) BAAR observados en cultivos puros. Tomado de <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/1152892> (Consulta 15 de Agosto de 2010).

Otros géneros de actinomicetos como *Nocardia* y *Rhodococcus*, suelen también ser positivos para la coloración de ZN (Liu y col., 1999), por lo cual se recurre a diferentes pruebas bioquímicas como la de la niacina, que permite distinguir por ejemplo a las MNT (niacina negativa) de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (niacina positiva). Sin embargo, como menciona Fernández de Vega (2005), estas pruebas son laboriosas y en conjunto con el crecimiento lento de las micobacterias hace que la identificación a nivel de especie demore varias semanas y en muchos casos la interpretación de resultados sea errónea.

La identificación con técnicas cromatográficas se basan en el análisis cualitativo de la composición lipídica de la pared celular de las micobacterias. De todas las técnicas cromatográficas, el estudio de los ácidos micólicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser rápida, reproducible, bastante específica a nivel de especie y de aplicación universal en la identificación micobacteriana. No obstante, las técnicas cromatográficas, no dejan de ser complejas y costosas (Fernández de Vega, 2005).

En la actualidad, la identificación de MNT por métodos moleculares, representa la mejor alternativa para una identificación precisa y rápida a nivel de especie. Sus principales ventajas son una aplicación universal en todos los aislamientos, la detección rápida, la identificación de microorganismos de difícil cultivo, el reconocimiento preliminar de nuevos

taxones micobacterianos, así como la reducción del riesgo biológico derivado de la manipulación de los cultivos (Fernández de Vega, 2005).

Entre los métodos moleculares que se emplean con más frecuencia se encuentran: la de PRA-*hsp65*, el uso de sondas de ácidos nucleicos, la amplificación de secuencias de ADN específicas, la secuenciación de las subunidades ribosomales 16S y 23S y de la región espaciadora entre ambas; secuenciación del gen *rpoB* (el cual confiere resistencia a la rifampicina), las hibridaciones en fase sólida, la amplificación y detección en tiempo real y la electroforesis de campo pulsado, entre otras (Fernández de Vega, 2005).

## ANTECEDENTES

Desde que Koch describió por primera vez el bacilo que causa la TB humana, *M. tuberculosis*, en 1882, muchas otras especies de micobacterias han sido aisladas y caracterizadas (Songer, 1980). El primer reporte de aislamiento de MNT data de 1884, a partir de secreciones humanas de exudados de chancros sifilíticos y posteriormente en 1885, a partir de secreciones genitales. En ambos casos la especie implicada fue *M. smegmatis* (Bloom, 1885 citado en Cooksey y col., 2004).

Debido que las MNT se consideran microorganismos ubicuos, muchas han sido las fuentes ambientales en las cuales se ha reportado el aislamiento de éstas. Algunos de estos hábitats son cuerpos de agua naturales como ríos, lagos, lagunas, arroyos, entre otros, y los sistemas de ingeniería humana como los de distribución de agua potable, tal y como se describe en la tabla 4 (Falkinham, 2008).

**Tabla 4.** Hábitats donde se ha reportado el aislamiento de MNT (Tomado y modificado de Falkinham, 2008).

Hábitat	Referencia(s)
Aguas Naturales	Falkinham y col., 1980; von Reyn y col., 1993
Sistemas de distribución de agua potable	Covert y col., 1999; Falkinham y col., 2001
Biopelículas en sistemas de distribución de agua potable	Falkinham y col., 2001; Torvinen y col., 2004
Tuberías de edificios, hospitales, y del hogar	du Moulin y col., 1988; Wallace y col., 1998; Nishiuchi y col., 2007; Falkinham y col., 2008
Bañeras de agua caliente y centros de estética (spas).	Embil y col., 1997; Kahana y col., 1997; Mangione y col., 2001; Marras y col., 2005.
Aerosoles naturales, del hogar y edificios	Falkinham y col., 2008
Suelos de bosques boreales y tundras	Iivanainen y col., 1997, 1999
Pantanos de aguas marrones	Kirschner y col., 1992
Suelos de jardinería, para macetas	De Groot y col., 2006
Sistemas de fluidos de remoción de metal	Bernstein y col., 1995; Shelton y col., 1999; Moore y col., 2000
Suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos y alifáticos	Aislabie y col., 1997; Churchill y col., 1999.

La importancia del ambiente como una fuente de enfermedades producidas por MNT en humanos y animales ha generado un gran interés por establecer métodos de aislamiento para estos microorganismos a partir de muestras ambientales en especial del agua ya que es un potencial vehículo de transmisión de MNT (Goslee y Wolinsky, 1976; Falkinham y col., 1980; du Moulin y Stottmeir, 1978, Falkinham, 2010).

Brooks y colaboradores (1984) y Jaramillo y McCarthy (1986) mencionan que el uso de métodos de descontaminación de muestras ambientales permite el aislamiento de MNT a partir de las mismas. No obstante, también mencionan que el método seleccionado debe cumplir con dos principios fundamentales que son: eliminar efectivamente a las otras bacterias y hongos presentes también en las muestras ambientales y a la vez no afectar la viabilidad de las micobacterias presentes en las muestras. Sin embargo, esto va a depender también de factores como la concentración y el tiempo de exposición del tratamiento seleccionado.

Petroff en 1915, utilizó NaOH como agente químico descontaminante de muestras de esputo para el cultivo de bacilos tuberculosos a partir de muestras contaminadas, representando así el primer método utilizado en el aislamiento de micobacterias. La concentración de NaOH empleada en dicho método fue del 4%. Songer y colaboradores (1980) mencionan que el método de NaOH es uno de los más empleados para el aislamiento de MNT debido al gran poder alcalino y descontaminante que posee el mismo. El método de NaOH ha sido empleado también a concentraciones entre 2 y 4% (Rhines, 1935; Bullin y col., 1970; McSwiggan y Collins, 1974) e inclusive en combinación con otros compuestos como cloruros y alcoholes ácidos, obteniendo en casi todos los casos bajo rendimiento en la recuperación de MNT (Songer, 1980).

El verde malaquita también ha sido usado como agente químico descontaminante por Hedgecock y Faucher en 1961 a una concentración de 0.2%; obteniendo que tal método fue cuatro veces más eficiente que el uso de los métodos de NaOH o fosfato trisódico, en cuanto a términos de recuperación de MNT se refiere.

El ácido oxálico fue empleado como agente químico descontaminante por Beerwerth en 1967, a una concentración final del 5%. Los resultados obtenidos demostraron que tal método, a pesar de ser muy efectivo debido a que pocos cultivos se contaminaban, también se evidenció un bajo porcentaje en el número de micobacterias aisladas (Songer, 1980).

El ácido sulfúrico, el cual es un ácido fuerte ha sido usado a concentraciones entre 3 y 5 M en la descontaminación de muestras de agua para el aislamiento de MNT por Goslee y Wolinsky (1976) y por Caroli y colaboradores (1985), obteniendo una buena efectividad en

la eliminación de la flora contaminante asociada a las muestras, pero a la vez poca recuperación de MNT.

Los compuestos de amonio cuaternarios (QACs) han sido usados desde 1950 para una gran variedad de propósitos clínicos, como la desinfección de salas preoperatorias, en heridas tisulares, en aplicaciones sobre mucosas y en la desinfección de superficies no críticas debido a su excelente propiedad antimicrobiana (Russell, 2002).

El cloruro de cetil piridinium (CPC) se ha utilizado como agente químico descontaminante de organismos no ácido resistentes presentes en muestras de esputo (Smithwick y col., 1975; Phillips y Kaplan, 1976; du Moulin y Stottmeier, 1978). Esta sal de amonio cuaternario también se ha utilizado en la descontaminación de muestras de agua a concentraciones que oscilan entre 0.02 y 1% (Smithwick y col., 1975); 0.04% (du Moulin y Stottmeier, 1978) y en combinación con NaOH a una concentración final de 0.6% (Smithwick y col., 1975; Phillips y Kaplan, 1976). Marcus y colaboradores en 1976 (citado en Songer 1980) reportaron el uso de CPC al 0.05% para el aislamiento de *M. ulcerans* a partir de heces de lagartos infectados con esta especie.

Schultz-Robbecke y colaboradores en 1991 compararon el uso de CPC, NaOH y formaldehído (HCHO) por su eficacia como sustancias descontaminantes para el aislamiento de micobacterias a partir de agua potable. Estos investigadores observaron altos niveles de recuperación de micobacterias y menores tasas de contaminación con CPC al 0.005%. Glover y colaboradores en 1994, encontraron que la descontaminación de agua de grifo con 0.04% de CPC resultó en una menor contaminación que cuando emplearon el método de NaOH al 1% y 3% o usando ácido oxálico al 5% pero también obtuvieron que en un alto número de muestras no crecieron MNT. Kamala y colaboradores también en 1994, compararon diferentes métodos para el aislamiento de MNT en aguas del sureste de India. En ese estudio, los autores concluyeron que la descontaminación con 1% de NaOH más 3% de lauril sulfato de sodio fue significativamente superior que el uso de NaOH a concentraciones mayores del 3%.

Iivanainen y colaboradores (1997) realizaron un estudio a partir de muestras de agua en arroyos de Finlandia, en la cual compararon los métodos de NaOH al 1% más ácido oxálico al 5% con el método de ácido sulfúrico 5 M más ciclohexamida (un inhibidor de la síntesis proteica en eucariotas), obteniendo una baja contaminación y altas tasas de aislamiento de MNT con el primer método. Así mismo, estos investigadores concluyeron que los medios más adecuados para el cultivo de MNT aisladas de muestras ambientales son aquellos cuyo rango de pH oscilan entre 5.5 y 6.5.

Neumann y colaboradores (1997) encontraron que utilizando el método de CPC al 0.05% por 30 minutos y con una temperatura de incubación de 30° C, hay un mayor aislamiento y diversidad de especies de MNT a partir de muestras de aguas superficiales. De igual forma obtuvieron que en el caso de aguas tratadas es favorable la descontaminación con CPC a 0.005%, por 30 minutos de exposición e incubación a 30° C sobre medio Lowenstein-Jensen.

Falkinham y colaboradores (2001 y 2004) sugirieron que la descontaminación de aguas potables podría no ser requerida. Sin embargo, en un estudio realizado por estos autores en 2001, bajo este supuesto, obtuvieron que los medios de cultivo presentaron sobrecrecimiento por otros organismos.

El uso de Cloruro de Hexadecil Piridinium (HPC) para el aislamiento de MNT fue reportado por primera vez en el año 2002 por Dundee y colaboradores. Estos investigadores compararon el uso de cuatro protocolos de descontaminación para el aislamiento de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* a partir de leche de ganado. Los métodos empleados fueron HPC al 0.75%, el método de Cornell (que emplea caldo de infusión cerebro corazón con HPC al 0.75% y 0.9%) y por último el método de C<sub>18</sub>-carboxipropilbetaína (CB-18<sup>TM</sup>). Los resultados que obtuvieron fue que el tratamiento de HPC al 0.75% por 5 horas mostró ser superior al de los otros métodos, ya que se recuperó un 28.7% de *M. avium* subespecie *paratuberculosis*.

El método descrito por Le Dantec y colaboradores (2002) en el que se emplea dodecil de sulfato sódico (SDS) y NaOH, ajustando el pH a valores neutros (6.5 a 7.0), con 40% de ácido fosfórico para procesar muestras de agua de grifo demostró ser inefectivo, ya que se obtiene un reducido número de MNT aisladas.

Buijtels y Petit (2005) compararon el método de descontaminación de N-acetil-L-cisteína-NaOH (NACI-NAOH) al 2% con el método de ácido sulfúrico al 6% para la detección de micobacterias a partir 219 muestras de esputo de 142 pacientes en Zambia. Ellos obtuvieron que con el método de ácido sulfúrico se recuperaron 84 MNT, 28 aislados de *M. tuberculosis* y 34 bacterias ácido resistentes que no pudieron ser identificadas a nivel de especie, mientras que con el método de NACI-NaOH se recuperaron 55 MNT, 34 de *M. tuberculosis* y 26 de bacterias ácido resistentes no identificadas a nivel de especie. Por lo que concluyeron que el método de ácido sulfúrico es más eficaz para la recuperación de MNT que el método NACI-NaOH mientras que en cuanto a la recuperación de *M. tuberculosis* no hubo diferencias significativas entre ambos métodos.

Sisco y colaboradores (2006), evaluaron la recuperación de aislados clínicos de *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. marinum*, utilizando HPC al 0.75%, ácido oxálico al 5% y NaOH al 2% y 4%. Sus resultados mostraron un mayor porcentaje de recuperación empleando HPC como agente químico descontaminante en relación a los demás agentes estudiados, siendo el ácido oxálico y el NaOH los agentes que más comprometieron la recuperación de dichas micobacterias, por lo cual su uso y tiempo de incubación deben ser estrictamente controlados.

Varias técnicas se han utilizado para concentrar MNT a partir de muestras de agua. Beerwerth en 1967, empleó la centrifugación como una de ellas; mientras que la filtración fue utilizada por Bailey y col., (1970 citados en Songer, 1980). du Moulin y Stottmeier (1974) filtraban las muestras de agua después de haber sido previamente descontaminadas por 24 horas con CPC al 0.05%. Luego lavaban el filtro con agua destilada estéril y lo trasladaban asépticamente a placas de medio selectivo. Iivanainen y colaboradores (1997) cortaban asépticamente la membrana (0,2 µm de poro y 47 mm de diámetro) después de filtrar las muestras y luego la centrifugaban a máxima velocidad en agua destilada estéril para luego sembrar alícuotas del sobrenadante sobre medios selectivos. Thomson y colaboradores (2008) realizaron una técnica parecida a la descrita anteriormente con la salvedad que utilizaron membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de tamaño de poro. Estos autores realizaron un estudio en el cual comparaban la centrifugación contra la filtración para la recuperación de *M. avium* y *M. intracellulare* a partir de muestras de agua. Ellos obtuvieron que la filtración como técnica de concentración es más eficiente, provee altos rendimientos y es más simple que la centrifugación para el aislamiento de MNT a partir de muestras de agua.

En el aislamiento de MNT a partir de muestras ambientales no solo se han empleado técnicas de descontaminación sino también diversos medios selectivos. Estos medios selectivos restringen el crecimiento de hongos y bacterias no ácido resistentes, mediante adiciones de varios compuestos al medio (Songer, 1980).

La penicilina ha sido ampliamente estudiada y usada en cantidades que oscilan entre 75 a 200 U/mL de medio (Songer, 1980). Sin embargo, estudios han demostrado que la penicilina en combinación con otros componentes puede tener efecto sinérgico para las micobacterias y aparentemente se inactiva rápidamente a 37° C (Songer, 1980).

El ácido nalídixico también ha sido componente de diversos medios selectivos para micobacterias (Songer, 1980). La concentración de esta droga es usualmente 35 µg/mL y ha demostrado ser efectiva al inhibir bacterias Gram-negativas asociadas con el ambiente

(Mitchison y col., 1972). La ciclohexamida que inhibe muchos hongos saprófitos ha sido usada efectivamente en medios selectivos para micobacterias (Songer, 1980). Otros dos agentes antifúngicos, como la nistatina y anfotericina B también han sido incorporados en medios con base de agar (Songer, 1980). La anfotericina B a concentraciones entre 1 a 1000 µg/mL permite el aislamiento de especies micobacterianas como *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. paratuberculosis*, *M. bovis* y *M. phlei*. Sin embargo a concentraciones de 500 µg/mL inhibe el crecimiento de *M. fortuitum* (Mitchison y col., 1972).

Mitchison y colaboradores (1972) analizaron los agentes: polimixina B, carbenicilina, ácido nalídixico, bacitracina, cloxacilina, trimetropina, nistatina y anfotericina B para el cultivo de micobacterias. Los resultados mostraron que la polimixina B y el ácido nalídixico, son efectivos en inhibir bacterias Gram-negativas cuando se agregan juntos en medios selectivos esto debido al amplio espectro de acción de ambos componentes. El uso de trimetropina (2-20 µg/mL) como una alternativa a la bacitracina, causó una reducción de la contaminación en aproximadamente 2% de todos los cultivos. Investigaciones de inhibidores del crecimiento de hongos mostraron que la anfotericina B es mucho mejor que la nistatina debido a su gran estabilidad a altas temperaturas (Mitchison y col., 1972).

Engel y colaboradores (1978) incluyeron 300 µg de verde malaquita/mL de medio a base de huevo suplementado con ácido pirúvico, encontrando poca contaminación en medios de cultivo para micobacterias. Los medios Lowenstein Jensen contienen aproximadamente 670 µg de verde malaquita y el medio Middlebrooks 7H10 contiene aproximadamente 280 µg/mL (Songer, 1980).

Actualmente para el aislamiento de MNT se utilizan medios selectivos suplementados con mezclas de antibióticos y fungicidas como es el caso del MGIT (medio indicador de crecimiento de micobacterias, por sus siglas en inglés) suplementado con Polimixina B, Azlocilina, Ácido nalídixico, Trimetropina y Anfotericina B (PANTA), los cuales tienen como resultado mayores rendimientos en términos de recuperación, cantidad y diversidad de micobacterias aisladas del ambiente. De igual forma el uso de PANTA reduce también la tasa de contaminación en los medios de cultivo (Thomson y col., 2008).

Radomski y colaboradores (2010) realizaron un estudio en el cual compararon métodos de cultivo para el aislamiento de MNT a partir de muestras de agua en Francia. Los métodos de descontaminación empleados fueron: ácido sulfúrico al 6%, NaOH al 4%, SDS al 3% con NaOH al 1%, ácido oxálico al 5% y CPC al 0.1%; como medios de cultivo usaron Middlebrook 7H11, Middlebrook 7H11 con PANTA (40 U/mL de polimixina B, 4

µg/mL de anfotericina B, 16 µg/mL de ácido nalidixico, 4 µg/mL de trimetropina y 4 µg/mL de azlocilina) y medio Middlebrook 7H11 con PANTA y vancomicina (10 µg/mL). Ellos obtuvieron que el método de CPC al 0.1%, en combinación con el PANTA, fue más eficiente que los otros métodos ya que redujo el número de microorganismos no ácido resistentes en los medios de cultivo, mientras que con los otros métodos observaron un pequeño descenso en el número de MNT aisladas. Por otra parte, evidenciaron que la adición de vancomicina inhibió el crecimiento de las cepas de referencia *M. chelonae* ATCC 35752 y *M. avium* ATCC 25921.

La identificación de micobacterias mediante métodos convencionales (pruebas bioquímicas) ha sido el estándar en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Sin embargo, esta identificación tiene notables limitaciones, ya que numerosas especies no pueden diferenciarse y el crecimiento lento de estos microorganismos hace que el resultado se demore de 2 a 4 semanas tras el aislamiento primario (Fernández de Vega, 2005).

Telenti y colaboradores (1993) desarrollaron una técnica basada en la amplificación por PCR de un fragmento de 439 pb del gen *hsp65* (entre las posiciones 398 y 836), que codifica para una proteína de choque térmico de 65 kDa que contiene epítopes que son únicos y también comunes en varias especies de micobacterias (Schinnick, 1987). Una vez que se obtiene el amplicón, se realiza un análisis posterior del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) mediante el uso de dos enzimas de restricción (*BstEII* y *Hae III*), consiguiéndose una identificación rápida (en tan sólo un día), precisa y económica de múltiples cepas de micobacterias. Esta técnica se conoce hoy en día como PRA-*hsp65* (del inglés PCR-Restriction Enzyme Analysis).

Fernández de Vega (2005) reporta que, aunque existen otras técnicas similares (por ejemplo., PCR-RFLP del gen que codifica las subunidades ribosomales 16S y 23S), la técnica de PRA-*hsp65* es actualmente la más desarrollada con una aplicación práctica de indudable valor. Además, la experiencia acumulada en numerosos centros con una amplia relación de los polimorfismos encontrados en las distintas cepas analizadas se expone en la página web: <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>, en la cual se pueden consultar los diferentes patrones obtenidos y las identificaciones de las especies correspondientes a los mismos.

En un estudio realizado en Sao Paulo, Brasil por Chimara y colaboradores (2008) se analizaron 433 aislados clínicos de MNT obtenidos entre enero del 2000 y enero del 2001 para ser identificados a nivel de especie. Los resultados arrojaron que el 90,3% de

los aislados fue identificado correctamente por la técnica molecular PRA-*hsp65* mientras que con técnicas convencionales fenotípicas fue identificado el 77.9%. De igual forma, PRA-*hsp65* arrojó resultados incorrectos en tan sólo 1.2% de los casos. En conclusión estos autores mencionan que la técnica descrita por Telenti y colaboradores (1993) es un método rápido y altamente fiable para la identificación de especies de MNT.

Actualmente la secuenciación automática con iniciadores marcados con fluoresceína representa un avance sustancial que permite la identificación de micobacterias y otros microorganismos que por métodos convencionales es imposible. Fernández de Vega (2005) menciona que la técnica de secuenciación representa el patrón de referencia de las identificaciones genotípicas y cuenta con diversas bases de datos de fácil y de libre acceso como: GenBank/Entrez y Ridom 16S rDNA.

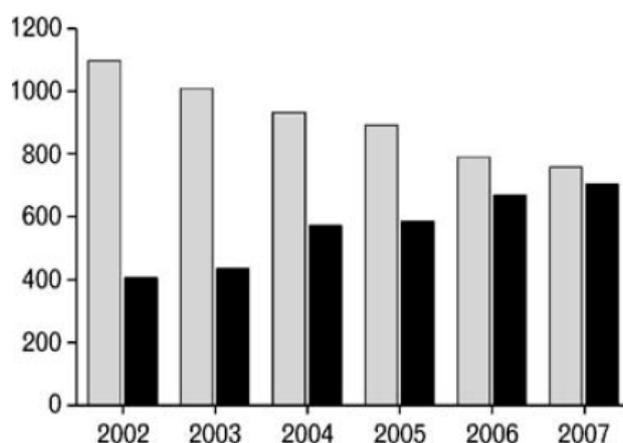
Aunque existen diversos trabajos que fomentan su aplicación en la práctica diaria, la secuenciación continúa siendo un método costoso y laborioso que queda limitado a los laboratorios de referencia con el equipamiento y la experiencia necesarios. No obstante, los avances tecnológicos son constantes y la mayor automatización con los nuevos secuenciadores capilares o la aparición de microchips de secuenciación del ADN podrían suponer una alternativa potencial en el futuro próximo (Fernández de Vega, 2005).

## JUSTIFICACIÓN

Hasta la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) las MNT tuvieron relativamente poca importancia en patologías humanas como causantes de cuadros clínicos de enfermedades que en conjunto se denominan “Micobacteriosis” y que desde el punto de vista clínico y del tratamiento son muy distintas a la TB. No obstante, constituyen actualmente un nuevo capítulo en infecciones humanas como patógenos emergentes (Casal y Casal, 2000).

Los primeros cuadros de micobacteriosis fueron descritos en la década de los años sesenta como hechos ocasionales y poco frecuentes. En los últimos 15 años se ha incrementado el número de personas afectadas por MNT sin que se haya conocido aún la razón de este suceso. Sin embargo se conoce que en la mayoría de los casos se debe sobre todo a la aparición de la epidemia del virus del SIDA y a condiciones de inmunosupresión (como: artritis, psoriasis, lupus, fibrosis quística, entre otros), existencia de alguna patología pulmonar subyacente (tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, silicosis, TB residual y bronquiectasis) o por factores genéticos (por ejemplo mutaciones en el gen que codifica la  $\alpha$ -1-antitripsina). Esto ha conllevado a un incremento en la investigación y conocimiento de las MNT (Caminero, 2001; Falkinham, 2010).

Marras y colaboradores (2007) realizaron un estudio en Ontario, Canadá entre 1997-2003, en donde reportaron que las enfermedades respiratorias producidas por MNT, se incrementaron significativamente cada año en relación con los aislados por *M. tuberculosis*. En ese estudio las especies de MNT con mayor implicación en los casos fueron: *M. kansasii* (23.1%), *M. xenopi* (11.3%), *M. avium* (7.7%) y con un 9.6% otras especies de MNT. En otro estudio realizado en Holanda por Arend y colaboradores (2009, se reportó que el número de cultivos positivos de MNT se incrementó de tal manera que para el año 2007 casi igualan el número de aislados de *M. tuberculosis* en pacientes con afecciones respiratorias, tal y como se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Tendencia en el número anual de pacientes con cultivos positivos de *M. tuberculosis* o MNT en Holanda.** El eje X representa los años de estudio y el eje Y representa el número de cepas aisladas. Las barras de color gris son de *M. tuberculosis* mientras que las de color negro son las MNT. (Tomado de Arend y col., 2009)

En Venezuela durante el período 2004-2007 se reportaron 288 aislados de MNT a partir de muestras clínicas (122 provenientes de secreciones, 24 de esputos, 12 de biopsias, 5 de otras muestras y 125 cultivos de otros laboratorios) en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de la UCV. El 81,59% de los pacientes afectados fueron mujeres cuyos principales antecedentes fueron mesoterapia, tratamientos estéticos y/o cosméticos, lipoescultura e implantes mamarios. También se reportó que las infecciones más frecuentes fueron de piel y tejidos blandos, seguido de infecciones pulmonares (Laboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina, UCV. Datos no publicados). En la figura 7 se muestran algunos ejemplos de infecciones humanas producidas por MNT.



**Figura 7. Algunas infecciones humanas producidas por MNT.** (a) Linfadenitis; (b) infección cutánea; (c) úlceras; (d) infecciones post-mesoterapia (Tomado de <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n42/mesoterapia.html> (Consulta 16 de Enero del 2010).

Aunque todavía quedan datos por aclarar sobre la patogénesis de la infección y enfermedades producidas por MNT diversos estudios sugieren que, debido a que la transmisión persona-persona es rara, la fuente para la adquisición de estas patologías es el ambiente ya que los principales reservorios de estos microorganismos son el agua y el suelo (Caminero, 2001; Marras y Daley, 2002).

El mecanismo de transmisión de MNT más aceptado según lo menciona Caminero (2001) es el de la aerosolización en la afección respiratoria y su ingestión por vía digestiva en el caso de la linfadenitis en niños y en las formas diseminadas en pacientes con SIDA. En pacientes con infecciones de tejidos blandos se ha descrito la inoculación directa de MNT a partir del agua y otros materiales contaminados con micobacterias del ambiente. En un estudio realizado por Chan y colaboradores (2007), se demostró que pacientes con anomalías en la producción de alfa-1-antitripsina adquirieron enfermedades respiratorias por MNT de crecimiento rápido, las cuales también se encontraban en el agua de las duchas de estos pacientes.

Nishiuchi y colaboradores (2009), reportaron que los aislados de MNT diagnosticados en dos pacientes con afección respiratoria en Japón correspondían genotípicamente a los mismos aislados que fueron recuperados del agua de las duchas de estos pacientes, en esa ocasión la especie implicada fue *M. avium*.

El aumento en los cuadros de micobacteriosis ha conllevado a la investigación y desarrollo de métodos para el aislamiento de MNT a partir del ambiente. Sin embargo, a pesar de muchos protocolos han sido descritos, no se ha establecido aún una estandarización de los mismos debido a que estos protocolos afectan en la gran mayoría de los casos la viabilidad de las MNT, ó tienen como resultado altas tasas de contaminación por otros microorganismos asociados a las muestras ambientales, como hongos y otras bacterias. Es por ello que esta investigación (que es la primera que se realiza en Venezuela en su área) busca establecer un método idóneo que garantice la mayor recuperación de MNT a partir de muestras de agua de Venezuela, y a la vez conocer la diversidad de especies de estos microorganismos en nuestro país en virtud que no existen reportes previos. De igual forma los resultados que se obtengan en este estudio proporcionarán valiosa información clínica para el aislamiento de estos microorganismos a partir de muestras clínicas.

# OBJETIVOS

## OBJETIVOS GENERALES

1. Comparar diversos métodos de aislamiento de Micobacterias No Tuberculosas (MNT) a partir de muestras de agua de Venezuela.
2. Determinar la diversidad de especies de Micobacterias No Tuberculosas (MNT) en muestras de agua de Venezuela.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Optimizar los métodos de concentración y descontaminación para el aislamiento de Micobacterias No Tuberculosas (MNT) a partir de muestras de agua estableciendo el porcentaje de recuperación luego de utilizar distintos agentes químicos descontaminantes.
2. Utilizar los métodos optimizados para aislar Micobacterias No Tuberculosas (MNT) a partir de muestras de agua de diversas regiones de Venezuela.
3. Identificar a nivel de especie las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) aisladas de las muestras de agua mediante la técnica molecular PRA-*hsp65*.

# MATERIALES y MÉTODOS

## Material biológico

En este trabajo se utilizaron cepas de MNT procedentes de aislados clínicos o de muestras ambientales, las cuales pertenecen al Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de la UCV en Caracas. Estas cepas se encontraban almacenadas en tripticasa de soya con glicerol a  $-70^{\circ}$  C. También se utilizó una cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 perteneciente también al laboratorio antes mencionado (tabla 5).

**Tabla 5. Material biológico utilizado en los diferentes ensayos.** Se muestran las especies de MNT utilizadas y la cepa de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853, la procedencia y la descripción de cada una.

Microorganismo	Código	Procedencia	Descripción
<i>M. abscessus</i>	LTF 3461	Secreción de piel	Crecimiento rápido de aspecto mucoso y no pigmentada.
<i>M. avium</i>	LTG 2557	Espuito	Crecimiento lento y de aspecto mucoso no pigmentada.
<i>M. fortuitum</i>	LTE 3675	Espuito	Crecimiento rápido de aspecto rugoso y no pigmentada.
<i>M. kansasii</i>	LTH 901	Biopsia de médula ósea	Crecimiento lento de aspecto mucoso y pigmentada (naranja).
<i>M. marinum</i>	LTH 1857	Secreción de piel	Crecimiento lento de aspecto mucoso y pigmentada (amarillo).
<i>M. mucogenicum</i>	MNT 004	Agua de ducha	Crecimiento rápido de aspecto mucoso no pigmentada.
<i>M. simiae</i>	MNT 005	Agua de ducha	Crecimiento lento de aspecto mucoso y pigmentada irregular.
<i>P. aeruginosa</i>	-	Cepa de referencia ATCC 27853	Bacteria Gram negativa.

## Protocolo para la optimización del método de concentración

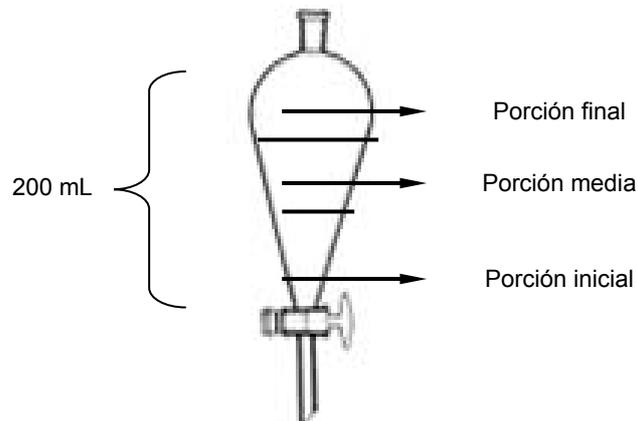
### Sedimentación

Se evaluó la recuperación de MNT mediante sedimentación a partir de muestras de agua mediante el siguiente ensayo:

A partir de un cultivo puro en medio sólido de *M. abscessus* (verificado mediante la coloración de ZN) se preparó una suspensión ajustada a un patrón de turbidez Mc Farland 1 (aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/mL) que representó el inóculo inicial para realizar el ensayo. Luego se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  del inóculo inicial (control) en solución salina estéril al 0.85% y se sembró por extensión con rastrillo, alícuotas de 0.1 mL en placas de agar tripticasa de soya e incubadas en cámara húmeda (para evitar la desecación de las placas) a  $37^{\circ}$  C por 5 días.

Una vez obtenida la titulación del control se procedió a agregar 1 mL del patrón Mc Farland 1 a un embudo de decantación y se completo con solución salina estéril hasta un

volumen final de 200 mL. Luego se dejó sedimentar por 24 horas a 4° C de manera similar a cuando se realizan estudios para determinar infecciones urinarias de origen bacteriano (Tomado del Manual de Trabajo del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina. UCV, 2006). Transcurrido el tiempo se tomaron en un tubo de centrifuga los primeros 20 mL de la porción inicial del volumen contenido en el embudo. Luego se centrifugó a 3500 g por 20 minutos a 25° C. De igual forma se realizó para las porciones media y final (figura 8).



**Figura 8. Porciones de volúmenes tomados cada uno por separado para el ensayo de sedimentación.** Se muestran las porciones final, media e inicial del volumen contenido en el embudo de decantación.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 5 mL de solución salina estéril 0.85% para luego realizar diluciones seriadas y así determinar la titulación en cada una de las porciones de donde se tomó el volumen. Se evaluó también agua destilada estéril, solución salina estéril 0.85% con Tween 80 1%, y agua destilada estéril con Tween 80 1%, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

## **Protocolo para la optimización del método de descontaminación**

### **Condición de filtración para el procesamiento de las muestras**

Se evaluaron dos condiciones experimentales utilizando esta técnica. La primera, incubando una suspensión de micobacterias con agentes químicos descontaminantes para luego filtrarla, y la segunda filtrando una suspensión de micobacterias a través de una membrana de celulosa con superficie plana, poro de 0.45 µm y con un diámetro de 47 mm que posteriormente fue descontaminada.

#### Primera condición

A partir de un cultivo puro en medio sólido de *M. abscessus* se preparó una suspensión ajustada a un patrón Mc Farland 1 y se le realizó una titulación tal y como se

describió anteriormente. Luego se tomaron 0.1 mL de la dilución  $10^{-4}$  (que contendría  $10^4$  UFC/mL) y se agregó en una fiola hasta alcanzar un volumen final de 100 mL de agua destilada estéril (concentración final de inóculo  $10^3$  UFC/mL). Por otro lado, se cultivó en caldo nutritivo una cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (la cual permitió simular condiciones naturales de contaminación en muestras de agua) hasta una  $D.O_{600nm} = 0.2$  ( $2 \times 10^8$  UFC/mL). De ese cultivo se tomó 0.1 mL y se incubó junto con 0.1 mL de la suspensión de *M. abscessus* para realizar los ensayos de descontaminación a una proporción 1:1, tal y como se describe en la tabla 6.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación de las suspensiones (exceptuando el control), se procedió a realizar la filtración al vacío con una membrana de celulosa con superficie plana, poro de  $0.45 \mu m$  y con un diámetro de 47 mm. Seguidamente la membrana se lavó dos veces con buffer fosfato salino (PBS pH 7.4) para así eliminar los restos de los descontaminantes y se transfirió asépticamente a placas de agar tripticasa de soya. Luego se incubaron a  $37^\circ C$  en cámara húmeda, a los dos días de incubación, la membrana fue retirada de las placas asépticamente e incubadas nuevamente por otros dos días.

**Tabla 6. Ensayo de descontaminación de la suspensión de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 con agentes químicos.**

Ensayo	Solución stock (%p/v)	Volumen del stock (mL) a añadir	Volumen de solución salina (mL)	Volumen del inóculo (mL)		Volumen final (mL)	Tiempo (min.)
				<i>M. abs</i>	<i>P. aer</i>		
Control			99.9	0.1		100	0
HPC 0.005%	5	0.1	99.7	0.1	0.1	100	20
HPC 0.05%	5	1	98.8	0.1	0.1	100	20
HPC 0.75%	5	15	84.8	0.1	0.1	100	20
NaOH 2%	10	20	79.8	0.1	0.1	100	20

#### Segunda condición

Se tomaron 0,1 mL de la dilución  $10^{-4}$  de la suspensión de *M. abscessus* ajustada a Mc Farland 1 y 0.1 mL del cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y se agregó solución salina estéril hasta completar un volumen final de 100 mL. Luego se procedió a filtrar dicho volumen utilizando una membrana con las características descritas anteriormente. Posterior a esto, se descontaminó la membrana con los agentes químicos descontaminantes (mencionados en la tabla 6) de manera que éstos estuvieran en contacto con la membrana por 20 minutos. Transcurrido el tiempo la membrana se lavó

con PBS (Buffer Fosfato Salino), se realizó la siembra y retiro de la membrana justo como en la condición de filtración anteriormente descrita.

### Selección del agente químico descontaminante para el procesamiento de las muestras

Evaluamos el porcentaje de recuperación de los agentes químicos descontaminantes: Cloruro de Hexadecil Piridinium (HPC) al 0.05% y 0.75%; ácido oxálico ( $C_2H_2O_4$ ) al 5%; ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 6% e hidróxido de sodio (NaOH) al 2% y 4% sobre aislados clínicos (procedentes del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, UCV) de especies de micobacterias de crecimiento rápido (*M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. mucogenicum*) y de crecimiento lento (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. simiae*) utilizando el método *in vitro* de dilución-neutralización, en el cual, a medida que se realizan diluciones seriadas de una mezcla que contiene la suspensión bacteriana con un agente químico descontaminante, éste último va disminuyendo en concentración y por ende en su acción descontaminante (Bello y col., 2006).

Este ensayo consistió en la preparación de suspensiones (a partir de cultivos puros) de las especies anteriormente mencionadas ajustadas a un patrón Mc Farland 1. Luego se realizaron diluciones seriadas (tal y como se describió anteriormente) por especie para conocer el título de las mismas antes de la acción de los descontaminantes (control del ensayo). Posteriormente se realizó la descontaminación en tubos Eppendorf de acuerdo a la tabla 7 y por triplicado.

**Tabla 7. Ensayos para determinar el % de recuperación de micobacterias con los agentes químicos descontaminantes.**

Agente descontaminante	Volumen del stock a añadir (µL)	Volumen de la suspensión de micobacterias (µL)	Volumen total de la mezcla (µL)	Tiempo de incubación (min)	Concentración final del agente descontaminante
HPC 0.1%	200	200	400	20	0.05%
HPC 1.5%	200	200	400	20	0.75%
$H_2SO_4$ 12%	200	200	400	20	6%
$C_2H_2O_4$ 10%	200	200	400	20	5%
NaOH 4%	200	200	400	20	2%
NaOH 8%	200	200	400	20	4%

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una dilución seriada de la mezcla y se sembraron alícuotas de 0.1 mL en placas de agar tripticasa de soya, e incubadas en cámara húmeda a 37° C, para conocer el título de las cepas después del tratamiento

descontaminante y así calcular el porcentaje de recuperación, que viene expresado por la fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Recuento de colonias después de la descontaminación}}{\text{Recuento de colonias antes de la descontaminación}} \times 100 \%$$

### **Protocolo para evaluar el efecto del PANTA en la recuperación de MNT**

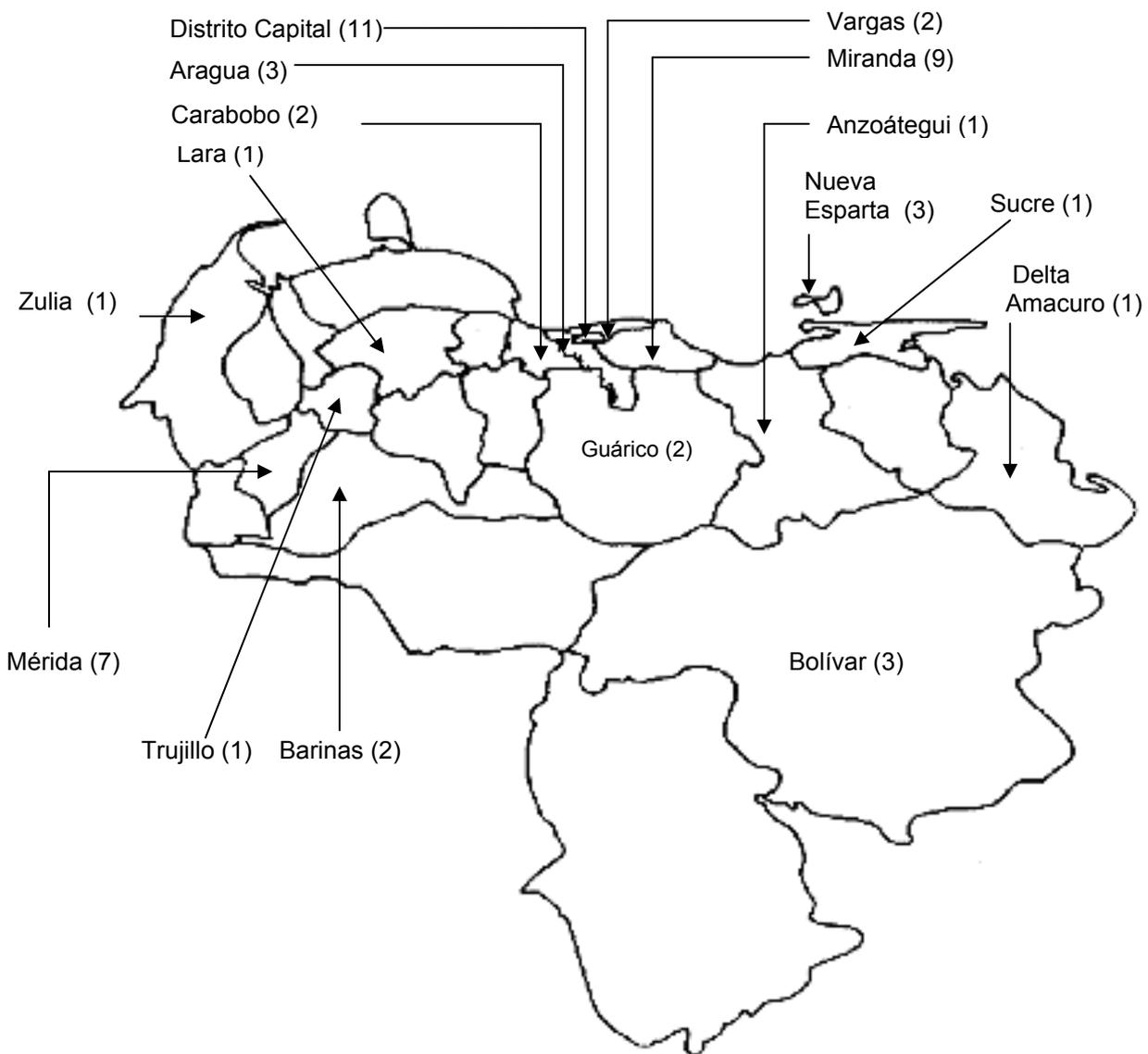
El ensayo consistió en preparar suspensiones ajustadas a un patrón Mc Farland 1 de las siguientes especies de crecimiento rápido (*M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. mucogenicum*) y de crecimiento lento (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. simiae*). Luego se realizaron diluciones seriadas en caldo tripticasa de soya y se sembraron, por extensión con rastrillo, alícuotas de 0.1 mL por triplicado en placas de agar tripticasa de soya sin PANTA (ensayo control) y con PANTA e incubándolas en cámara húmeda por 4 a 5 días (en el caso de las especies de crecimiento rápido) y por 2 a 3 semanas (para las de crecimiento lento). Posteriormente, se calculó el porcentaje de recuperación mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Recuento de colonias con PANTA}}{\text{Recuento de colonias sin PANTA}} \times 100 \%$$

# Protocolo para el aislamiento de MNT a partir de muestras de agua de Venezuela

## Recolección de las muestras de agua

Un total de 50 muestras de agua al azar y sin ningún orden específico de diversas regiones de Venezuela (ver figura 9) fueron recolectadas entre noviembre de 2009 y septiembre de 2010. Las muestras (1 litro) fueron tomadas *in situ* tanto de sistemas de distribución de agua potable, como tuberías y grifos, así como de sistemas naturales como lagunas, ríos y arroyos.



**Figura 9. Mapa de Venezuela indicando los estados donde fueron tomadas las muestras de agua para el aislamiento de MNT. El número entre paréntesis indica la(s) cantidad(es) de muestra(s) procedente(s) por estado y se detallan las localidades de muestreo en la sección de resultados.**

Las muestras de agua de tuberías o grifos se recolectaron luego de dejar abierta la toma de agua por 2 minutos para así eliminar restos de materia orgánica que pudiese estar depositada en el sistema (Thomson y col., 2008). Las muestras de sistemas naturales

fueron tomadas directamente de la superficie de los mismos. Se recolectó 1 litro de muestra de agua en recipientes de plástico y se almacenaron en cava fría a 4° C hasta el momento de ser procesadas.

### Procesamiento

Las muestras recolectadas fueron procesadas en forma paralela con tres agentes químicos descontaminantes tal y como se describe en la tabla 8.

**Tabla 8. Ensayos de descontaminación para el aislamiento de MNT a partir de las muestras de agua recolectadas.**

Agente químico descontaminante	Volumen agente (mL)	Volumen de la muestra (mL)	Volumen final de la mezcla (mL)	Tiempo de incubación (min.)	Concentración final del agente
HPC 5%	2.52	250	252.2	20	0.05%
NaOH 10%	62.5	250	312.5	20	2%
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 20%	84	250	334	20	5%

Transcurrido el tiempo de incubación de las mezclas se procedió a realizar la filtración al vacío con una membrana de celulosa ya descrita. La membrana luego se lavó dos veces con PBS (pH 7.4) para así eliminar los restos de los descontaminantes empleados. Las membranas una vez lavadas se transfirieron asépticamente a placas de agar tripticasa de soya con PANTA (polimixina B (40 U/mL), anfotericina B (4 µg/mL), ácido nalidixico (16 µg/mL), trimetropina (4 µg/mL) y azlocilina (4 µg/mL)) (Radomski y col., 2010).

Para evitar la desecación se envolvieron los bordes de las placas con papel parafilm y luego fueron incubadas en cámara húmeda a 30° C (Neumann y col., 1997). A los dos días de incubación, la membrana fue retirada de la placa con pinza estéril y colocada nuevamente en cámara húmeda a la temperatura descrita anteriormente por 8 semanas. Las placas fueron revisadas semanalmente. Los aislados que se obtuvieron fueron sometidos a una coloración de Ziehl Nielsen para comprobar si se trata de bacilos ácido resistentes.

### Coloración de Ziehl Nielsen

La coloración de Ziehl Nielsen se realizó de la siguiente manera:

Se tomó una pequeña porción de la colonia y se realizó un frotis sobre una lámina portaobjetos hasta dejar secar a temperatura ambiente. Luego se fijó la muestra al calor.

Posteriormente, la muestra se coloreó por 10 minutos con fucsina fenicada y flameada cada 3 minutos uniformemente hasta observar liberación de fenol en forma de vapor. Transcurrido el tiempo se lavó la lámina con agua de chorro y se decoloró por 5 minutos con alcohol ácido. Luego se lavó con agua de chorro y se realizó la coloración de contraste por 1 minuto con azul de metileno. Seguidamente se dejó secar la lámina y se observó al microscopio con el objetivo de 100X. Las colonias ZN positivas (color fucsia) se aislaron del cultivo primario a tubos con medio Lowenstein Jensen e incubadas a 30° C para su posterior identificación por PRA-*hsp65*.

Cabe destacar que aquellas colonias morfológicamente distintas entre sí que se obtuvieron en las placas de tripticasa de soya con PANTA, se sometieron también a la coloración ZN y se aislaron en medio Lowenstein Jensen en el caso de ser positivas para la coloración.

## **Protocolo para la identificación de MNT por PRA-*hsp65* (Telenti y col., 1993)**

### **Aislamiento de ADN**

Se tomaron 3 asadas de las colonias aisladas en medio Lowenstein Jensen y se resuspendieron en un tubo Eppendorf (de 1,5 mL de capacidad) con 100 µL de Buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Posteriormente, se hirvió por 10 minutos a 100° C; para luego centrifugar a 15.000 g por 5 minutos.

### **Amplificación**

Se tomaron 5 µL del sobrenadante (que contiene el ADN blanco) para ser añadido a la mezcla de PCR (50 µL) que contenía los componentes descritos en la Tabla 9.

**Tabla 9. Componentes para la preparación de las reacciones de PRA-*hps65*** (Tomado de Telenti y col., 1993)

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua destilada estéril	18
Glicerol	5
dNTPs 10 mM (2.5 mM cada uno)	2
Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 25 mM.	5
Buffer de PCR 10X (Tris-HCl 500 mM, KCl 100 mM, Tritón 1% pH 9,0)	5
Iniciador TB 11 (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' (Schinnick, 1987)	5
Iniciador TB 12 (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3' (Schinnick, 1987)	5
Taq Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25
ADN blanco	5
Total	50

Las condiciones del PCR-PRA $hsp65$  fueron:

1. Temperatura 94° C por 3 minutos
  2. Temperatura 94° C por 30 segundos
  3. Temperatura 55° C por 30 segundos
  4. Temperatura 72° C por 30 segundos
  5. Temperatura 72° C por 5 minutos.
- } Por 35 veces

El producto de PCR, sin purificación previa, se visualizó con bromuro de etidio (0.02 ng/mL) en una cámara de luz ultravioleta (UV) luego de realizada una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5X por 15 minutos a 80 voltios, con un marcador de peso molecular de 50-pb (Promega). Para ello cada pozo del gel se cargó con 5  $\mu\text{L}$  del producto y 2  $\mu\text{L}$  de Buffer de carga (glicerol/azul de metileno). El producto resultante debe ser de 439 pb.

### Digestión de amplicones

La preparación de la solución de enzimas de restricción se realizó como se describe a continuación:

**Tabla 10. Enzimas de restricción utilizadas en la técnica PRA-*hsp65***

(Tomado de [www.neb.com/nebecomm/products](http://www.neb.com/nebecomm/products)).

Enzima de restricción	Fuente	Sitio de reconocimiento
<i>Bst</i> EII	<i>Bacillus sterothermophilus</i> cepa E	5'... GCTNACC... 3' 3'... CCANCGG...5' ↓ ↑
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'... GGCC... 3' 3'... CCGG...5' ↓ ↑

**Tabla 11. Preparación de las soluciones de enzimas de restricción empleadas en PRA-*hsp65*.**

Enzima de restricción	H <sub>2</sub> O destilada estéril (μL)	BSA (10 mg/mL) (Promega)	Buffer 10 X (Promega)	Enzima (10U/μL) (Promega)
<i>Bst</i> EII	7	0.25	2.5	0.5
<i>Hae</i> III	7	0.25	2.5	0.5

Para la digestión de los amplicones se tomaron 15 μL del producto de PCR y se incubó con 10 μL de la solución de enzima *Bst*EII (tabla 11) a 60° C por 60 minutos. De manera similar 15 μL del producto de PCR se incubó a 37° C por 60 minutos con 10 μL de la solución de enzima *Hae*III (tabla 11). Transcurrido el tiempo se realizó una electroforesis por 120 minutos en un gel de agarosa al 3% con Buffer TBE 0.5X. En cada carril del gel se colocaron 25 μL del producto digerido (dos carriles por cada muestra de ADN) con 4 μL de Buffer de carga y en otro carril se colocaron 3 μL de un marcador de peso molecular de 50 pb (Promega). El gel luego se visualizó con bromuro de etidio (0.02 ng/mL) en una cámara UV. Los patrones obtenidos se compararon luego con los registrados en la siguiente página web: [http:// app.chuv.ch/prasite/index.html](http://app.chuv.ch/prasite/index.html), o con algoritmos descritos en la literatura (Telenti y col., 1993; Chimara y col., 2008).

## Análisis estadístico

Se evaluaron los siguientes parámetros:

1. La tasa de positividad se calculó de la siguiente manera:

$$\text{tasa de positividad} = \frac{\text{Número de muestras donde creció MNT}}{\text{Número total de muestras procesadas}} \times 100 \%$$

2. La tasa de negatividad se calculó de la siguiente manera:

$$\text{tasa de negatividad} = \frac{\text{Número de muestras donde no creció MNT ni contaminante}}{\text{Número total de muestras procesadas}} \times 100 \%$$

3. La tasa de contaminación se calculó de la siguiente manera:

$$\text{tasa de contaminación} = \frac{\text{Número de muestras donde creció contaminante}}{\text{Número total de muestras procesadas}} \times 100 \%$$

4. Las unidades formadoras de colonia (UFC) en las muestras positivas se calculó mediante el recuento de las mismas en las placas de cultivo.

Se realizó un análisis tipo Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para ver si existe diferencia significativa en el aislamiento de MNT de las muestras recolectadas con los diversos tratamientos descontaminantes. De igual forma se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar si hay diferencia significativa en el aislamiento de UFC entre los tratamientos descontaminantes. El programa que se empleó para estos cálculos fue SPSS para Windows versión 6.0.

## RESULTADOS

### Optimización del método de concentración

#### Sedimentación

A fin de establecer una técnica de concentración, alternativa a las que comúnmente han sido descritas por otros autores para el aislamiento de MNT a partir de muestras de agua, como la centrifugación y la filtración, se evaluó la eficiencia de la sedimentación como una técnica de concentración de MNT utilizando una cepa control de *M. abscessus*. Los resultados obtenidos para este ensayo evidenciaron que la recuperación de *M. abscessus* al agregar Tween 80 1% al agua destilada y a la solución salina mejoró considerablemente, comparado con los ensayos en los cuales no se agregó este surfactante aniónico. No obstante, cuando se comparan los títulos entre las diferentes porciones muestreadas, se observó que no hubo diferencia en la distribución de *M. abscesus* por lo que la sedimentación se descartó como técnica de concentración para el procesamiento de las muestras de agua (tablas 12a y 12b).

**Tabla 12a. Resultados de los ensayos de sedimentación de *M. abscessus* mediante la titulación con los ensayos sin Tween 80 1%. Se muestran los títulos obtenidos en las diferentes porciones evaluadas en el embudo de decantación.**

Ensayo	Titulación del inóculo (UFC/mL)	Titulación del inóculo en la porción evaluada en el embudo de decantación (UFC/mL)		
		Inicial	Media	Final
Agua destilada estéril	$3.14 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$
Solución salina estéril 0.85%	$3.14 \times 10^6$	$3.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

**Tabla 12b. Resultados de los ensayos de sedimentación de *M. abscessus* mediante la titulación con los ensayos con Tween 80 1%. Se muestran los títulos obtenidos en las diferentes porciones evaluadas en el embudo de decantación.**

Ensayo	Titulación del inóculo (UFC/mL)	Titulación del inóculo en la porción evaluada en el embudo de decantación (UFC/mL)		
		Inicial	Media	Final
Agua destilada estéril+ Tween 80 al 1%	$7.9 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$	$7 \times 10^6$	$6.3 \times 10^6$
Solución salina estéril 0.85% + Tween 80 al 1%	$7.9 \times 10^6$	$3.2 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

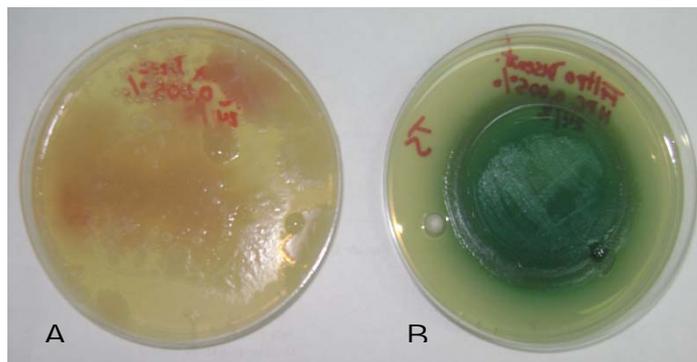
## Optimización del método de descontaminación

### Condición de filtración para el procesamiento de las muestras

Debido a la amplia distribución que presenta la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa* en ambientes naturales y su reconocida resistencia a ciertos agentes químicos, al igual que las micobacterias (Soberón, 2004), se utilizó este microorganismo como agente contaminante para simular una condición natural en una muestra de agua, con el propósito de determinar el efecto descontaminante del HPC y NaOH, que son comúnmente usados en el diagnóstico y procesamiento de muestras ambientales para el aislamiento de MNT.

Cuando se incubó una suspensión de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 con HPC y NaOH y luego se filtró dicha suspensión transcurrido un período de tiempo, se obtuvieron mejores resultados en términos de eliminación del contaminante y obtención de las micobacterias, que cuando se descontaminó la membrana luego de haber filtrado una suspensión de micobacterias y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (figuras 10, 11,12 y 13).

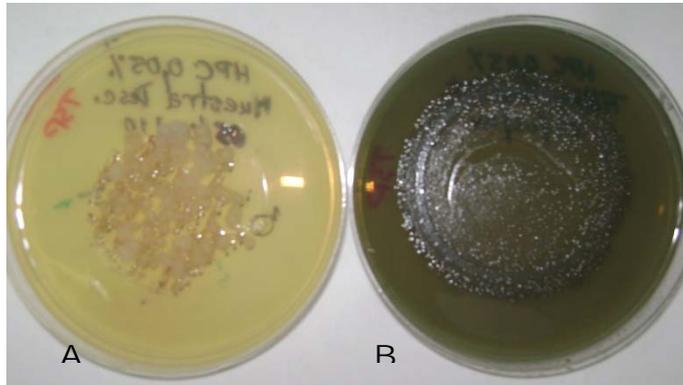
En la figura 10 se observa que la concentración de HPC al 0.005% resultó ser ineficiente en la eliminación del contaminante, independientemente si se descontamina la suspensión (A) o la membrana de filtración (B), afectando así la obtención de las micobacterias, esto debido a la falta de disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo como consecuencia del crecimiento excesivo de *P. aeruginosa* ATCC 27853, la cual se caracteriza por producir un pigmento verde llamado picocianina en los medios de cultivo (figura 10B).



**Figura 10. Crecimiento de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 después del tratamiento con HPC al 0.005%. (A) Descontaminación de la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853 y posterior filtración. (B) Descontaminación de la membrana después de filtrar la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853.**

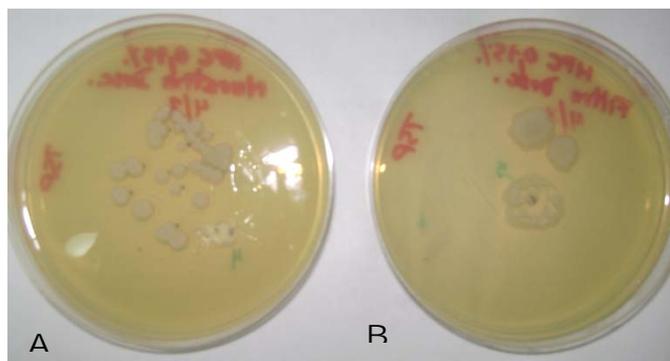
En la figura 11, se evidencia que cuando se utilizó HPC al 0.05% se obtuvieron mejores resultados descontaminando la suspensión de *M. abscessus* con *P. aeruginosa*

ATCC 27853 (figura 11A), que cuando se descontaminó la membrana luego de filtrar ya que se observó en este último procedimiento un crecimiento evidente de *P. aeruginosa* en el medio de cultivo debido a la producción del pigmento verde picocianina (figura 11B). Las colonias de *M. abscessus* son de aspecto mucoso y no cromógenas (figura 11A). Con esto se demostró que empleando HPC al 0.05%, se eliminó la bacteria contaminante y a la vez no se afectó la viabilidad de las micobacterias (al menos en estos ensayos).



**Figura 11. Crecimiento de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 después del tratamiento con HPC al 0.05%.** (A) Descontaminación de la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853 y posterior filtración. (B) Descontaminación de la membrana después de filtrar la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Con el uso de HPC al 0.75% se evidenció que *P. aeruginosa* ATCC 27853 no creció en los medios de cultivo, independientemente si se descontaminaba la suspensión (figura 12A) ó la membrana de filtración (figura 12B), ya que se obtuvo crecimiento de *M. abscessus* (colonias blanquecinas y mucosas) por ambos procedimientos en los medios de cultivo.



**Figura 12. Crecimiento de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 después del tratamiento con HPC al 0.75%.** (A) Descontaminación de la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853 y posterior filtración. (B) Descontaminación de la membrana después de filtrar la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853.

En el caso del NaOH al 2%, al igual que con los ensayos de HPC al 0.05% y 0.75% se observó mejores resultados cuando se descontaminó la suspensión de *M. abscessus* con *P. aeruginosa* ATCC 27853 (figura 13A), que cuando se descontaminaba la membrana, debido a que en este procedimiento se contaminaba el medio de cultivo con el agente contaminante (figura 13B).



**Figura 13. Crecimiento de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* ATCC 27853 después del tratamiento con NaOH al 2%. (A) Descontaminación de la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853 y posterior filtración. (B) Descontaminación de la membrana después de filtrar la suspensión de *M. abscessus* + *P. aeruginosa* ATCC 27853.**

Con estos resultados se demuestran dos consideraciones para el procesamiento de las muestras de agua. La primera es que resulta mejor incubar las muestras con los agentes químicos descontaminantes por un determinado tiempo y luego filtrarlas. Y la otra es que el uso de HPC al 0.005% se descartó debido a que se obtuvo contaminación en los medios de cultivo en el 100% de los casos.

### **Selección del agente químico descontaminante para el procesamiento de las muestras**

En la tabla 13 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de las especies de MNT empleadas, con los diversos agentes químicos descontaminantes ensayados. El porcentaje de recuperación con HPC al 0.05% para *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. mucogenicum* fue de 45.5%, 60.8% y 7.7%, respectivamente; mientras que cuando se evaluaron estas mismas especies usando HPC al 0.75%, los porcentajes de recuperación fueron 40.9%, 57.3% y 7.1%; lo cual demostró que independientemente de la concentración empleada de HPC por 20 minutos de incubación, el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo para *M. abscessus* y *M. fortuitum*; mientras, que *M. mucogenicum* mostró ser la más sensible frente a estas concentraciones de HPC.

Cuando se usó ácido oxálico al 5%, ácido sulfúrico al 6% e hidróxido de sodio al 2% y 4% se obtuvo menos del 1% de recuperación para *M. abscessus* y *M. mucogenicum*. En el caso de *M. fortuitum*, cuando se empleó ácido oxálico al 5% se obtuvo 31.5% de recuperación y 2.1% con ácido sulfúrico al 6%; mientras que con NaOH a ambas concentraciones evaluadas se obtuvo menos del 1% de recuperación (tabla 13). En cuanto a las MNT de crecimiento lento evaluadas, observamos mayor porcentaje de recuperación para *M. marinum* con ácido oxálico al 5% (60.5%), seguido por ácido

sulfúrico al 6% (52.8), HPC al 0.05% y 0.75% (34.6% y 19.2%) y menor recuperación con NaOH al 2% y 4% (15.3% y 12.7% respectivamente). Con *M. simiae* encontramos que el mayor porcentaje de recuperación obtenido fue con ácido sulfúrico al 6% (64.7%) y el menor con NaOH al 4% (20.8%), en todo caso esta especie demostró ser la más resistentes con todos los agentes químicos descontaminantes evaluados (tabla 13). Estos resultados nos permitieron establecer que los agentes químicos descontaminantes a ser usados para el procesamiento de las muestras de agua fueron: HPC al 0.05% (QACs), ácido oxálico al 5% (tratamiento ácido) y NaOH al 2% (tratamiento alcalino).

**Tabla 13. Porcentaje de recuperación de las cepas de micobacterias utilizadas con los agentes químicos descontaminantes empelados.**

Especie	% recuperación					
	HPC 0.05%	HPC 0.75%	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6%	NaOH 2%	NaOH 4%
<i>M. abscessus</i>	45.5	40.9	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>M. fortuitum</i>	60.8	57.3	31.5	2.1	< 1	< 1
<i>M. mucogenicum</i>	7.7	7.1	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>M. marinum</i>	34.6	19.2	60.5	52.8	15.3	12.7
<i>M. simiae</i>	41.2	38.1	63.4	64.7	21.4	20.8

**HPC:** Cloruro de Hexadecil Piridinium; **C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** ácido oxálico; **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** ácido sulfúrico; **NaOH:** Hidróxido de sodio.

*M. avium* y *M. kansasii* no crecieron en el medio de cultivo empleado para estos ensayos (tripticosa de soya). Lo cual implicaría que estas especies requieren de suplementos nutricionales adicionales que no están presentes en ese medio.

## Evaluación del PANTA en la recuperación de MNT.

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos para el ensayo donde se evaluó el posible efecto que tiene el uso de PANTA en la recuperación de MNT. Se registró que *M. simiae* fue la especie con mayor porcentaje de recuperación (87.6%), seguido por *M. fortuitum* (85%), *M. marinum* (81.3%) y *M. abscessus* (69,5%). En el caso de *M. mucogenicum* se encontró que no hubo crecimiento de esta en las placas de agar tripticosa de soya con PANTA.

**Tabla 14. Porcentaje de recuperación con PANTA de las cepas de micobacterias utilizadas.**

Especie	% de recuperación
<i>M. abscessus</i>	69.5
<i>M. fortuitum</i>	85
<i>M. mucogenicum</i>	0
<i>M. marinum</i>	81.3
<i>M. simiae</i>	87.6

## Aislamiento de MNT a partir de muestras de agua de Venezuela

En la tabla 15 se presentan las ciudades, localidades o poblaciones de los estados de Venezuela donde fueron tomadas las muestras de agua empleadas para este estudio. De igual manera, se especifica si el resultado fue positivo, negativo o con contaminación para el aislamiento de MNT por cada muestra tratada con HPC al 0.05% ó con ácido oxálico ( $C_2H_2O_4$ ) al 5%. Un total de 20 muestras fueron positivas, 19 negativas y 11 se contaminaron cuando se empleó HPC al 0.05%, mientras que con  $C_2H_2O_4$  al 5% se obtuvieron 9 muestras positivas, 9 muestras negativas y 32 muestras contaminadas.

**Tabla 15. Desempeño de los métodos de aislamiento de MNT en el procesamiento de las muestras de agua recolectadas.** La "X" marca el resultado obtenido por cada muestra.

Muestra N°	Ciudad/Localidad/Población	Estado	Método de aislamiento						
			HPC al 0.05%			$C_2H_2O_4$ al 5%			
			P	N	C	P	N	C	
001	Valera (*)	Trujillo	X				X		
002	Barlovento (*)	Miranda		X					X
003	Porlamar (*)	Nueva Esparta	X			X			
004	La Guaira (*)	Vargas			X		X		
005	Altos de Pipe (*)	Miranda	X						X
006	El Paraíso (*)	DC			X				X
007	Chacaito, Caracas (*)	DC			X	X			
008	Chacaito, Caracas (*)	DC		X			X		
009	Flor Amarillo (*)	Carabobo		X		X			
010	San Juan de los Morros (*)	Guárico		X					X
011	Mérida (centro) (*)	Mérida			X				X
012	Apartaderos (*)	Mérida		X					X
013	Laguna de Mucubají (**)	Mérida		X					X
014	23 de enero, Caracas (*)	DC			X				X
015	Tabay (*)	Mérida	X						X
016	Collado El Cóndor (**)	Mérida		X					X
017	San Diego (*)	Carabobo	X			X			
018	Agua Salud, Caracas (*)	DC			X				X
019	Conejeros (*)	Nueva Esparta	X			X			
020	Laguna anexa a playa Parguito (**)	Nueva Esparta		X					X
021	Barinas (centro) (*)	Barinas			X				X
022	Ciudad Bolívar (*)	Bolívar		X					X
023	Tucupita (*)	Delta Amacuro		X					X
024	Valle de la Pascua (*)	Guárico		X					X
025	Río Orinoco (**)	Bolívar	X						X

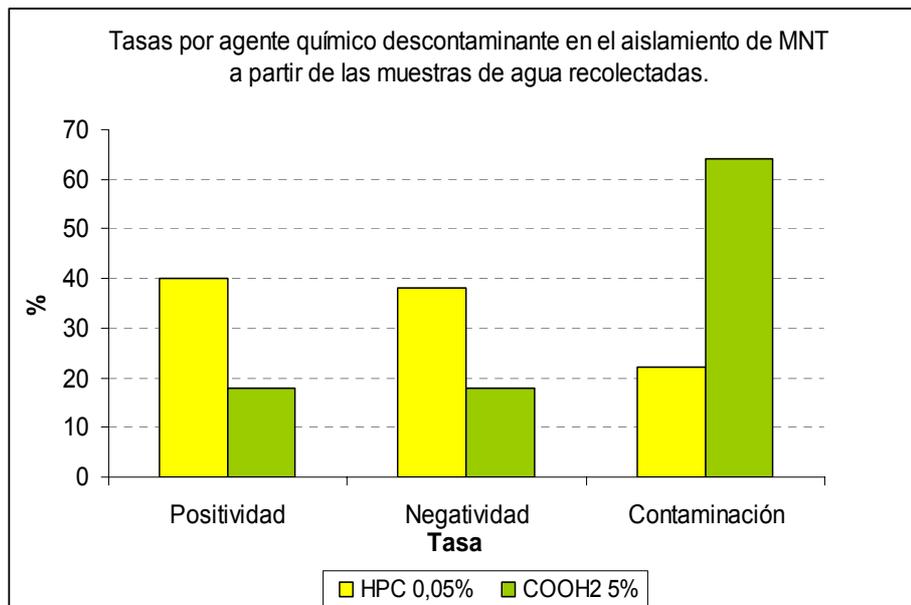
**HPC:** Cloruro de Hexadecil Piridinium;  **$C_2H_2O_4$ :** ácido oxálico; **P:** Positivo; **N:** Negativo; **C:** Contaminación. (\*) Muestras recolectadas de tuberías o grifos; (\*\*) muestras recolectadas de sistemas naturales.

**Tabla 15 (continuación). Desempeño de los métodos de aislamiento de MNT en el procesamiento de las muestras de agua recolectadas.** La "X" marca el resultado obtenido por cada muestra.

Muestra Nº	Ciudad/Localidad/Población	Estado	Método de aislamiento					
			HPC al 0.05%			C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> al 5%		
			P	N	C	P	N	C
026	Charallave (*)	Miranda		X				X
027	Barquisimeto (*)	Lara	X					X
028	Terminal de Mérida (*)	Mérida	X					X
029	Terminal de Barinas (*)	Barinas		X			X	
030	El Moralito (*)	Zulia	X					X
031	Paraparal (*)	Aragua	X			X		
032	Maracay (*)	Aragua	X			X		
033	Hosp. Univ. Cd. Bolívar (*)	Bolívar	X					X
034	Lab. Tuberculosis (Instituto de Biomedicina) (*)	DC			X			X
035	Burguillo (*)	Miranda	X					X
036	Guatire (*)	Miranda		X				X
037	Los Corales (*)	Vargas	X			X		
038	Puerto La Cruz (*)	Anzoátegui			X			X
039	El Vigía (*)	Mérida		X				X
040	Palo Negro (*)	Aragua	X			X		
041	Cumaná (*)	Sucre		X			X	
042	San Antonio de los Altos (*)	Miranda	X					X
043	San Antonio de los Altos (*)	Miranda	X					X
044	San Bernardino, Caracas (*)	DC			X		X	
045	Hospital Vargas, Caracas (*)	DC	X					X
046	Guarenas (*)	Miranda		X			X	
047	Catia, Caracas (*)	DC		X			X	
048	Los Teques (*)	Miranda	X					X
049	Los Chaguaramos, Caracas (*)	DC			X		X	
050	La Candelaria, Caracas (*)	DC		X				X
		<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>32</b>

**HPC:** Cloruro de Hexadecil Piridinium; **C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** ácido oxálico; **P:** Positivo; **N:** Negativo; **C:** Contaminación.  
 (\*) Muestras recolectadas de tuberías o grifos; (\*\*) muestras recolectadas de sistemas naturales.

Con el método de HPC al 0.05% se obtuvo que un 40% de las muestras fueron positivas (es decir se logró aislar bacilos ácido resistentes en los medios de cultivo), 38% resultaron negativas y el resto (22%) se contaminaron. En cuanto al uso de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> al 5% se obtuvieron 18% de muestras positivas, 18% de muestras negativas y un 64% de muestras contaminadas (figura 14). La contaminación observada en ambos métodos de aislamiento se debió principalmente al crecimiento excesivo de hongos u otras bacterias no ácido resistente en los medios de cultivo con PANTA.



**Figura 14. Tasas de positividad, negatividad y de contaminación expresada en porcentajes obtenidas en los métodos de aislamiento de MNT. Se expresa el porcentaje obtenido en cada una de ellas por tratamiento evaluado.**

Se realizó una prueba de significación Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) que permitió comparar posibles diferencias entre los tratamiento de descontaminación empleados en el procesamiento de las muestras de agua en lo que respecta a la tasa de contaminación, obteniendo que si hubo diferencias significativas ( $p < 0.001$  con un nivel de confianza del 95%,  $\alpha = 0.05$ ) entre los tratamientos (tabla 16). Esta prueba también permitió determinar que cuando se usa el tratamiento de ácido oxálico al 5%, los medios de cultivo tienen seis veces mayor probabilidad de contaminación que cuando se emplea el tratamiento de HPC al 0.05%.

**Tabla 16. Prueba de Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar si existen diferencias significativas entre el número de muestras contaminadas por tratamiento.**

Muestras	Tratamiento		Total
	HPC 0.05%	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	
Contaminadas	11	32	43
No contaminadas	39	18	57
<b>Total</b>	50	50	100

$p < 0.001$

Otro análisis de  $\chi^2$  demostró que hubo diferencias significativas en el número de muestras positivas por cada tratamiento utilizado ( $p = 0.015$ , con un nivel de confianza del 95%,  $\alpha = 0.05$ ) y por consiguiente en la recuperación de MNT, a favor del HPC al 0.05% (tabla 17).

**Tabla 17. Prueba de Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar si existen diferencias significativas en el número de muestras positivas por tratamiento.**

Muestras	Tratamiento		
	HPC 0.05%	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Total
Positivas	20	9	29
Negativas ó contaminadas	30	41	71
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

$p = 0.015$

Las unidades formadoras de colonias (UFC) ácido resistentes obtenidas por HPC al 0.05% fue de 228 (221 de crecimiento rápido y 7 de crecimiento lento) y con ácido oxálico al 5% se aislaron 193 de las cuales 125 fueron de crecimiento lento y 68 de crecimiento rápido (tabla 18).

**Tabla 18. Número de unidades formadoras de colonia (UFC) de micobacterias aisladas por cada método de descontaminación empleado.**

UFC/250 mL	Método	
	HPC 0.05%	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%
Crecimiento rápido	221	68
Crecimiento lento	7	125
<b>Total</b>	<b>228</b>	<b>193</b>

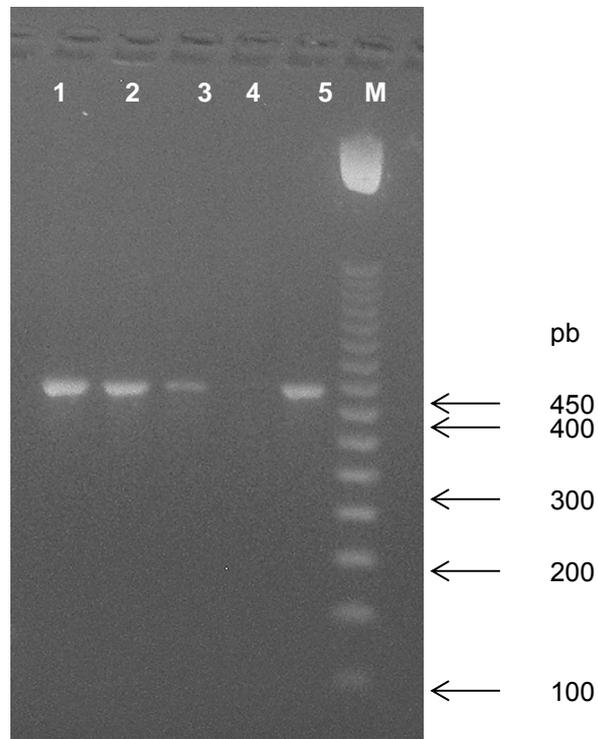
Una prueba de ANOVA de una vía demostró que si hay diferencias significativas ( $p = 0.014$ , con un nivel de confianza del 95%,  $\alpha = 0.05$ ) en el número de UFC aisladas por tratamiento de descontaminación empleado, ya que en promedio se obtuvieron 11.4 UFC/250 mL (de 20 muestras positivas) con HPC al 0.05%; mientras que con ácido oxálico al 5% se obtuvo un promedio de 21.4 UFC/250mL (de 9 muestras positivas).

Con el método de NaOH al 2% no se logró procesar las muestras de agua debido a que cuando se incubaban las mismas con este agente químico se formaba una precipitación de sales, lo cual impedía la filtración aún cuando se intentó neutralizar con bisulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) la cantidad de hipoclorito de sodio (NaOCl) que pudiera estar reaccionando con el NaOH presente en las muestras.

Las unidades formadoras de colonia (UFC) que se obtuvieron en las placas de cultivo de tripticasa de soya con PANTA fueron sometidos a la coloración de ZN y en el caso de ser positivos (coloración fucsia) fueron aisladas en medio Lowenstein Jensen para ser identificadas por PRA-*hsp65*. Se encontraron 32 aislados con características morfológicas y tiempo de crecimiento distintos en todas las muestras de agua procesadas.

## Identificación de MNT por PRA-*hsp65*.

Una vez obtenidos los bacilos ácido resistentes (ZN positivos) en los medios de cultivo, se procedió a realizar la identificación por PRA-*hsp65*. En la figura 15 se muestra el producto de PCR (amplicón) sin digerir de un fragmento de 439 pb correspondiente a la región polimórfica del gen *hsp65*, el cual codifica una proteína de choque térmico de 65 KDa que contiene epítopes únicos y comunes en las micobacterias (Schinnick, 1987).



**Figura 15. Producto de PCR-PRA $hsp65$  sin digerir.** M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); 1, 2,3 y 5 corresponden a aislados ZN positivos; 4: aislado ZN negativo (se evidencia que no hubo producto de amplificación con PRA-*hsp65*).

A continuación se muestran en tablas y figuras la identificación de los bacilos ZN positivos aislados en las muestras positivas por ambos métodos de descontaminación.

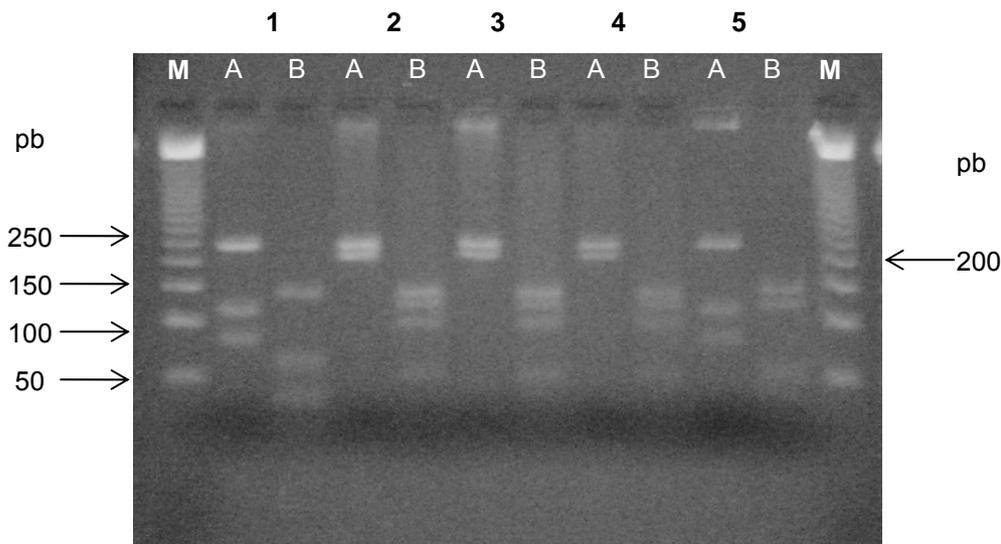
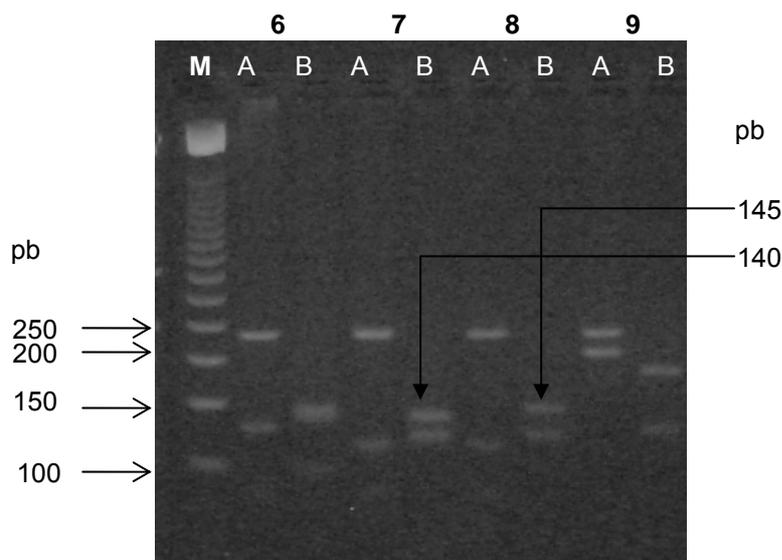


Figura 16. Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 1 al 5 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua. M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); A: Digestión con *BstEII*; B: Digestión con *HaellI*.

Tabla 19. Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 1 al 5. Se muestra las características morfológicas, procedencia e identificación a nivel de especie correspondiente de cada aislado.

Aislado Nº	Origen	Método	Morfología	Patrón de restricción		Especie
				<i>BstEII</i>	<i>HaellI</i>	
1	Valera, Edo. Trujillo	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas	235/130/80	150/70/45	<i>Mycobacterium</i> sp. (*)
2	Porlamar, Edo. Nueva Esparta	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y mucosas	235/210	145/140/100/50	<i>M. peregrinum</i> tipo 1
3	Porlamar, Edo. Nueva Esparta	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y mucosas.	235/210	145/140/100/50	<i>M. peregrinum</i> tipo 1
4	Altos de Pipe, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y mucosas.	235/210	145/140/100/50	<i>M. peregrinum</i> tipo 1
5	Flor Amarillo, Edo. Carabobo	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas.	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1

(\*) Patrón de restricción desconocido y no reportado en la base de datos <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>.

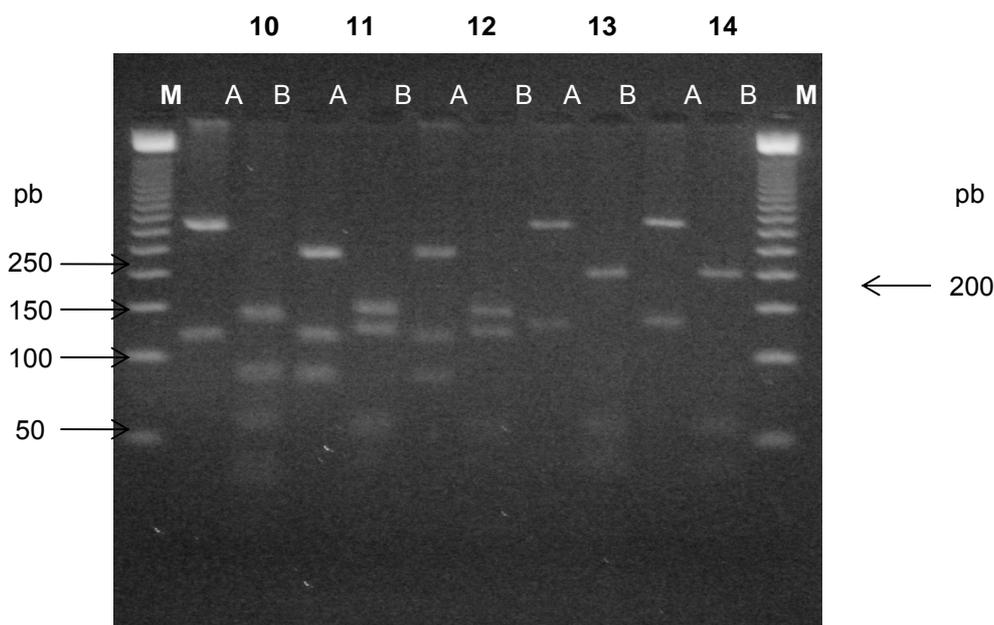


**Figura 17. Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 6 al 9 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua. M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); A: Digestión con *BstEII*; B: Digestión con *HaeIII*.**

**Tabla 20. Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 6 al 9.** Se muestra las características morfológicas, procedencia e identificación a nivel de especie correspondiente de cada aislado.

Aislado Nº	Origen	Método	Morfología	Patrón de restricción		Especie
				<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	
6	San Antonio de los Altos, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas aspecto seco	235/130/85	145/140/100/60	<i>M. peregrinum</i> tipo 3
7	Porlamar, Edo. Nueva Esparta	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y mucosas	235/120/85	140/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 2
8	Porlamar, Edo. Nueva Esparta	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento lento. Pigmentadas y mucosas	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1
9	Chacaito, Caracas. DC	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento lento. Pigmentadas y mucosas	235/210	185/130	<i>M. simiae</i> tipo 1

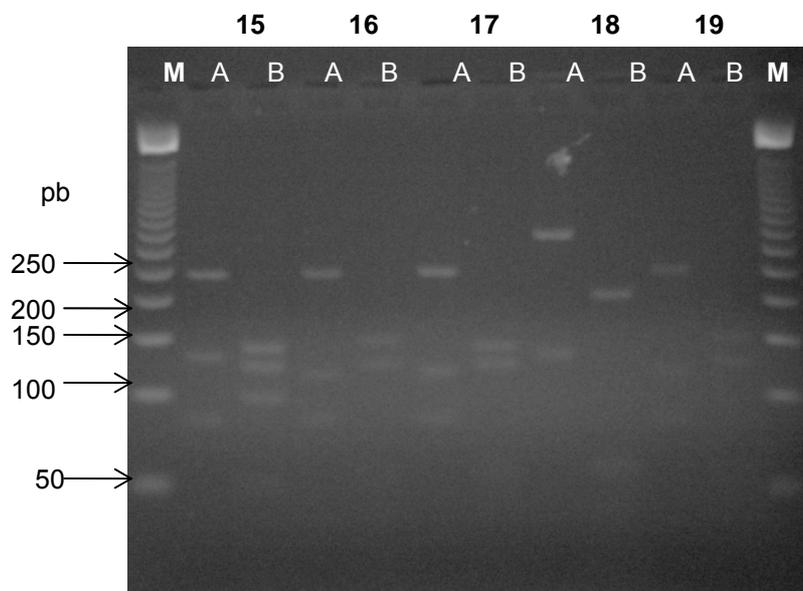
Según nuestros resultados se puede evidenciar que la diferencia entre los morfotipos de *M. fortuitum* 1 y *M. fortuitum* 2 es apenas de 5 pares de bases cuando se digiere el producto de PCR con la enzima *HaeIII*.



**Figura 18. Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 10 al 14 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua. M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); A: Digestión con *BstEII*; B: Digestión con *HaeIII*.**

**Tabla 21. Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 10 al 14. Se muestra las características morfológicas, procedencia e identificación a nivel de especie correspondiente de cada aislado.**

Aislado N°	Origen	Método	Morfología	Patrón de restricción		Especie
				<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	
10	Hospital Vargas, Caracas. DC	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas.	320/115	140/90/60	<i>M. chitae</i> tipo1
11	San Antonio de los Altos, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1
12	San Antonio de los Altos, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	235/120/85	140/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 2
13	San Antonio de los Altos, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y lisas	320/130	200/60/55/50	<i>M. chelonae</i> tipo 1
14	San Antonio de los Altos, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas.	320/130	200/60/55/50	<i>M. chelonae</i> tipo 1



**Figura 19. Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 15 al 19 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua. M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); A: Digestión con *BstEII*; B: Digestión con *HaeIII*.**

**Tabla 22. Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 15 al 19. Se muestra las características morfológicas, procedencia e identificación a nivel de especie correspondiente de cada aislado.**

Aislado Nº	Origen	Método	Morfología	Patrón de restricción		Especie
				<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	
15	San Diego, Edo. Carabobo	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas.	235/130/85	145/140/100/60	<i>M. peregrinum</i> tipo 3
16	San Diego, Edo. Carabobo	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1
17	Conejeros, Edo. Nueva Esparta	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	235/130/85	145/125/60	<i>M. goodii</i> tipo 1/ <i>M. smegmatis</i> tipo 1/ <i>M. mageritense</i> tipo 1 (*)
18	Los Teques, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	320/130	200/60/55/50	<i>M. chelonae</i> tipo 1
19	Los Teques, Edo. Miranda	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas.	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1

(\*) Estas especies tienen el mismo patrón de PRA-*hsp65* y las mismas características de crecimiento por lo que no se pueden diferenciar entre sí.

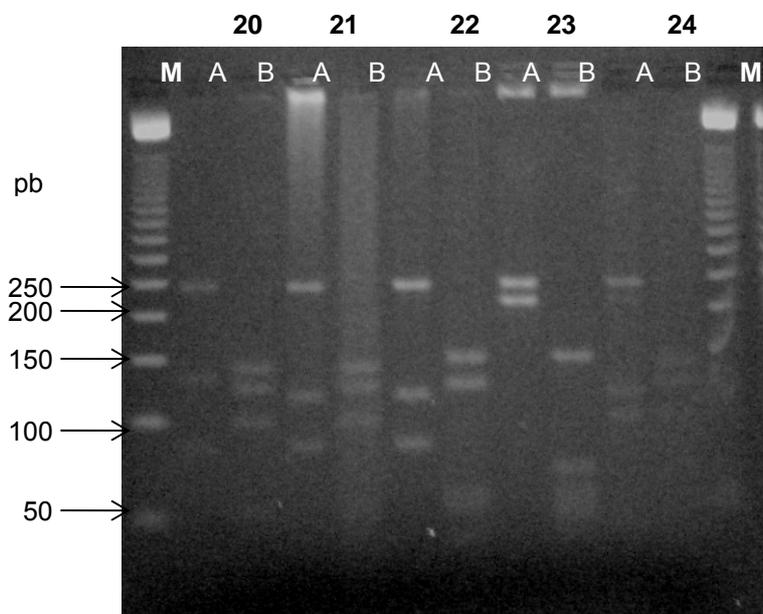


Figura 20. Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 20 al 24 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); A: Digestión con *BstEII*; B: Digestión con *HaeIII*.

Tabla 23. Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 20 al 24. Se muestra las características morfológicas, procedencia e identificación a nivel de especie correspondiente de cada aislado.

Aislado Nº	Origen	Método	Morfología	Patrón de restricción		Especie
				<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	
20	San Diego, Edo. Carabobo	HPC 0.05%	Crecimiento lento. Pigmento amarillo-naranja.	235/140/85	140/120/95	<i>M. gordonae</i> tipo 6
21	El Moralito, Edo. Zulia	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	235/130/85	145/140/100/60	<i>M. peregrinum</i> tipo 3
22	Parapara, Edo. Aragua	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	235/130/85	145/125/60	<i>M. goodi</i> tipo 1/ <i>M. smegmatis</i> tipo 1/ <i>M. mageritense</i> tipo 1 (*)
23	Maracay, Edo. Aragua	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y mucosas	235/210	145/70/60/55	<i>M. abscessus</i> tipo 1
24	Hosp. Univ. Cd. Bolívar. Edo. Bolívar	HPC 0.05%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y mucosas	235/120	140/125/100	<i>M. brisbanense</i> tipo 1

(\*) Estas especies tienen el mismo patrón de PRA-*hsp65* y las mismas características de crecimiento por lo que no se pueden diferenciar entre sí.

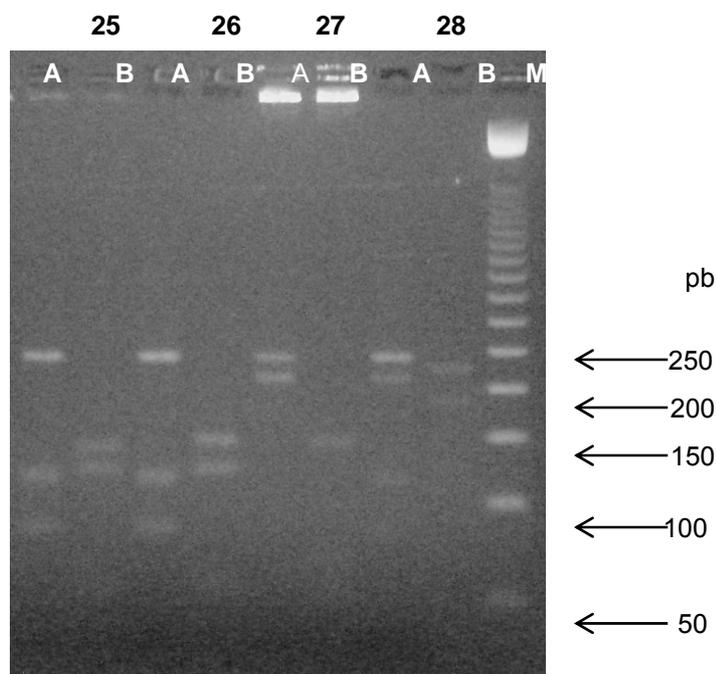


Figura 21. Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 25 al 28 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); A: Digestión con *BstEII*; B: Digestión con *HaellI*.

Tabla 24. Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 25 al 28. Se muestra las características morfológicas, procedencia e identificación a nivel de especie correspondiente de cada aislado.

Aislado N°	Origen	Método	Morfología	Patrón de restricción		Especie
				<i>BstEII</i>	<i>HaellI</i>	
25	Conejeros Edo. Nueva Esparta	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento lento. No pigmentadas aspecto seco	235/120/85	145/130	<i>M. sherrisii</i> tipo 1
26	Conejeros Edo. Nueva Esparta	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y rugosas	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1
27	Maracay, Edo. Aragua	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido Pigmentadas y mucosas	235/210	145/70/60/55	<i>M. abscessus</i> tipo 1
28	Hospital Vargas Caracas. DC	HPC 0.05%	Crecimiento lento. Pigmentadas y mucosas	235/210	185/130	<i>M. simiae</i> tipo 1

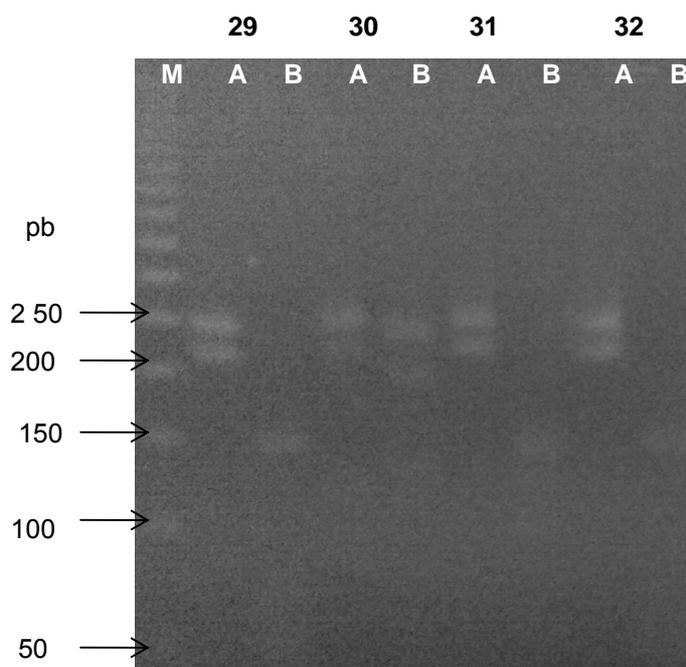


Figura 22. Resultados de los patrones de restricción de los productos de PRA-*hsp65* de los aislados 29 al 32 obtenidos en el procesamiento de las muestras de agua M: marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); A: Digestión con *BstEII*; B: Digestión con *HaeIII*.

Tabla 25. Características de aislamiento, morfología, patrones de restricción e identificación a nivel de especie de los aislados 29 al 32. Se muestra las características morfológicas, procedencia e identificación a nivel de especie correspondiente de cada aislado.

Aislado N°	Origen	Método	Morfología	Patrón de restricción		Especie
				<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	
29	Maracay, Edo. Aragua	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido. No pigmentadas aspecto mucoso	235/210	145/70/60/55	<i>M. abscessus</i> tipo 1
30	Hospital Vargas, Caracas, DC	HPC 0.05%	Crecimiento lento. Pigmentadas.	235/210	185/130	<i>M. simiae</i> tipo 1
31	Tabay, Edo. Mérida	HPC 0.05%	Crecimiento rápido Pigmentadas y mucosas	235/210	140/125/100/50	<i>M. septicum</i> tipo 1/ <i>M. porcinum</i> tipo 1/ <i>M. peregrinum</i> tipo 2 (*)
32	Maracay, Edo. Aragua	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%	Crecimiento rápido. No pigmentadas y mucosas	235/210	145/70/60/55	<i>M. abscessus</i> tipo 1

(\*) Estas especies tienen el mismo patrón de PRA-*hsp65* y las mismas características de crecimiento por lo que no se pueden diferenciar entre sí.

En cuanto a la diversidad de especies de MNT aisladas en este trabajo se obtuvieron 11 especies distintas, (9 de crecimiento rápido y 2 de crecimiento lento) cuando se empleó el método de HPC al 0.05% mientras que con ácido oxálico al 5% se aislaron 6 especies diferentes (4 de crecimiento rápido y 2 de crecimiento lento) (tabla 26).

**Tabla 26. Diversidad de especies aisladas por método de descontaminación.** Se muestra también el número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas por especie.

Especie	UFC obtenidas por método	
	HPC 0.05%	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 5%
<i>M. abscessus</i> tipo 1	30	34
<i>M. brisbanense</i> tipo 1	4	-
<i>M. chelonae</i> tipo 1	11	-
<i>M. chitae</i> tipo 1	12	-
<i>M. fortuitum</i> tipo 1	55	23
<i>M. fortuitum</i> tipo 2	35	-
<i>M. goodi</i> / <i>M. mageritense</i> / <i>M. smegmatis</i> (*)	8	10
<i>M. gordonae</i> tipo 6 (**)	1	-
<i>M. peregrinum</i> tipo 1	33	-
<i>M. peregrinum</i> tipo 3	31	1
<i>M. septicum</i> / <i>M. porcinum</i> / <i>M. peregrinum</i> 2 (*)	1	-
<i>M. sherrisii</i> tipo 1 (**)	-	1
<i>M. simiae</i> tipo 1 (**)	6	124
<i>Mycobacterium</i> sp.	1	-
<b>Total</b>	<b>228</b>	<b>193</b>

(\*) Especies que comparten el mismo patrón de PRA-*hsp65* y las mismas características de crecimiento

(\*\*) MNT de crecimiento lento. **UFC**: Unidades Formadoras de Colonias.

En la tabla 26 se muestra que las especies *M. fortuitum* tipo 1 y 2, *M. peregrinum* tipo 1 y 3, *M. abscessus* tipo 1 y *M. simiae* tipo 1 fueron las especies más abundantes en las muestras de agua procesadas.

Se realizó un análisis de  $\chi^2$  para determinar si una(s) especie(s) determinada(s) eran aislada(s) con mayor frecuencia dependiendo del agente químico descontaminante que se empleara. En el caso de *M. fortuitum* (morfortipos 1 y 2) los resultados mostraron que no hay diferencia significativa ( $p=0.414$ , nivel de confianza 95% y  $\alpha=0.05$ ) en el uso del método de aislamiento. Resultados similares se obtuvieron con *M. abscessus* tipo 1 en donde tampoco hubo diferencias significativas en el método de descontaminación empleado ( $p=0.287$ , nivel de confianza 95% y  $\alpha=0.05$ ).

En la tabla 27 se muestra que dependiendo del método de descontaminación empleado se obtienen diferentes especies de MNT a partir de una misma muestra de agua.

Tabla 27. Comparación en la diversidad de especies de MNT obtenidas por cada tratamiento de descontaminación empleado.

Muestra	Especie(s) aislada(s) por tratamiento	
	HPC 0.05%	COOH 5%
San Diego, Edo. Carabobo	<i>M. fortuitum</i> tipo 1 <i>M. peregrinum</i> tipo 3 <i>M. gordonae</i> tipo 6	<i>M. fortuitum</i> tipo 1
Conejeros, Edo. Nueva Esparta	<i>M. goodii/M. mageritense/</i> <i>M. smegmatis</i> (*) <i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo 1 <i>M. sherrisii</i> tipo 1
Valera, Edo. Trujillo	<i>Mycobacterium</i> sp.	Resultado negativo
Chacaito, Caracas, DC.	Contaminación del medio	<i>M. simiae</i> tipo 1
Tabay, Edo. Mérida	<i>M. septicum/</i> <i>M. porcinum/M.peregrinum</i> tipo 2	Contaminación del medio
Hosp. Cd. Bolívar. Edo. Bolívar	<i>M. brisbanense</i>	Contaminación del medio
Hospital Vargas, Caracas. DC	<i>M. chitae</i> tipo 1 <i>M. simiae</i> tipo 1	Contaminación del medio
Río Orinoco. Edo. Bolívar	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	Contaminación del medio

(\*) Especies que comparten el mismo patrón de PRA-*hsp65* y las mismas características de crecimiento.

## DISCUSIÓN

Las Micobacterias No Tuberculosas o atípicas (MNT) han producido en los últimos 15 años un aumento en la prevalencia de enfermedades en humanos que son diferentes a la tuberculosis (TB) tanto en sintomatología como en el tratamiento clínico. En los países desarrollados se ha incrementado el aumento en el aislamiento de especies de micobacterias, tanto conocidas como de nueva descripción, sobre todo de fuentes ambientales como el agua (Fernández de Vega, 2005).

Para el aislamiento de MNT a partir del agua, muchos estudios han empleado pequeñas modificaciones de métodos desarrollados para el diagnóstico de la TB. No obstante estos métodos no han sido adaptados para las muestras de agua, por lo que resultan ser inadecuados (Neumann y col., 1997).

Algunos de los factores que afectan la elección de un método de aislamiento de MNT del agua son las variables de tasas y requerimientos de crecimiento de estos microorganismos y las diferentes fuentes de agua (aguas tratadas, aguas superficiales o agua naturales como lagos, ríos, entre otros) en la cual habitan, el volumen de la muestra, el método de concentración (centrifugación ó filtración), el medio de cultivo y la temperatura de incubación (Thomson y col., 2008).

Debido al crecimiento lento de las micobacterias es necesario el uso de métodos de pretratamiento con agentes químicos descontaminantes, para limitar el sobrecrecimiento de otras bacterias y hongos asociados al agua. No obstante, la selección del agente descontaminante puede también limitar la detección de ciertas especies de MNT y reducir la tasa de positividad de muestras y el número de colonias visibles (Thomson y col., 2008).

Es por ello que en este estudio se compararon varios métodos de concentración y descontaminación, con el propósito de establecer un protocolo que ofrezca el mayor porcentaje de recuperación de unidades formadoras de colonias de MNT y diversidad de especies, a partir de muestras de agua de Venezuela.

La sedimentación es el proceso natural por el cual las partículas más pesadas y que se encuentran suspendidas en ella, son removidas por la acción de la gravedad (Pérez, 2005). La sedimentación como tal, es en esencia un fenómeno netamente físico. Esta relacionada exclusivamente con las propiedades de caída de las partículas en el agua. Cuando se produce

sedimentación de una suspensión de partículas el resultado final será siempre un fluido clarificado y una suspensión más concentrada (Pérez, 2005).

Basado en lo anteriormente descrito estudiamos la sedimentación como una técnica de concentración de MNT, alternativa a la centrifugación y a la filtración, debido a que tiene como principal ventaja el hecho que puede llevarse a cabo sin el uso de equipamientos costosos, como centrifugas o equipos de filtración (Miörner y col., 1996). Además el hecho que la pared de las micobacterias está constituida en un 80% por lípidos les confiere la propiedad de ser hidrofóbicas, por lo cual en un ensayo de sedimentación, estos microorganismos por acción de la gravedad se localizarían, en teoría, en la superficie de una suspensión acuosa (Brooks y col., 1984).

Brooks y colaboradores (1984) obtuvieron bajos porcentajes de recuperación (3.5%) cuando inocularon *M. avium* en una suspensión que contenía una porción de suelo estéril, atribuyendo entonces esa pérdida a la unión irreversible mediante interacciones de tipo hidrofóbicas de las células bacterianas a las partículas del suelo ó a las paredes del vidrio del tubo que contenía la suspensión, por lo cual recomendaron la adición de detergentes aniónicos como el Tween 80 al 1% en soluciones acuosas para una mejor recuperación de micobacterias.

En nuestros resultados la adición de Tween 80 al 1% mejoró considerablemente la recuperación de *M. abscessus* probablemente debido a la disminución de la adherencia de las células con las paredes del embudo de decantación. Sin embargo, también se obtuvo una uniformidad en la distribución de las células a lo largo de la columna de las diferentes soluciones evaluadas y por consiguiente un factor de concentración igual a 1 en las mismas. Por tal motivo, descartamos el uso de esta técnica para concentrar MNT a partir de las muestras de agua.

Una explicación razonable de este fenómeno sería que en la sedimentación, las células están sometidas a dos fuerzas físicas como la fuerza de flotación (FF) que es igual al peso del volumen de la solución desplazado por las células (principio de Arquímedes) y la fuerza gravitacional (FG) las cuales probablemente están en equilibrio ocasionando entonces que *M. abscessus* no sedimentará en un porción específica.

Miörner y colaboradores (1996) realizaron un estudio similar al nuestro, en el cual evaluaron la recuperación de bacilos ácido resistentes de muestras de esputo comparando la sedimentación y la centrifugación como técnicas de concentración. Ellos obtuvieron que la centrifugación fue más eficiente para la concentración de bacilos ácido resistentes. Pero también concluyeron que cuando se agregaba quitina en los ensayos de sedimentación, la sensibilidad aumentaba en un 80%.

En nuestra investigación no empleamos la centrifugación debido a que no contamos con centrifugas para más de 200 mL, lo cual representa una limitación física por lo que empleamos la filtración. Thomson y colaboradores (2008) demostraron que la filtración como técnica de concentración es mejor que la centrifugación ya que provee altos rendimientos, es más simple y requiere de menos tiempo de ejecución. Sin embargo, la filtración tiene la desventaja que los poros de la membrana pueden obstruirse debido a la contaminación y cantidad de residuos orgánicos presentes en el agua.

En los ensayos de filtración los mejores resultados se obtuvieron cuando la suspensión de *M. abscessus* y *P.aeruginosa* ATCC 27853 se incubó con los agentes químicos descontaminantes evaluados (HPC al 0.05% y 0.75% y NaOH al 2%), por un período de tiempo y luego se filtraban, debido a que no se observó contaminación por *P. aeruginosa* en los medios de cultivo. El hecho de observar crecimiento en los límites de la membrana luego que la misma fuera descontaminada directamente podría significar que el acceso por parte de los agentes químicos descontaminantes en esa área de la membrana es muy poco o escaso por lo que hay un impedimento físico en el equipo de filtración lo cual favorece el crecimiento de agentes contaminantes, razón por la cual se decidió procesar las muestras de agua incubándolas previamente con los agentes químicos descontaminantes y luego filtrarlas.

En nuestro estudio se demuestra que existen diferencias en la sensibilidad de las MNT empleadas en la optimización del método de descontaminación que depende de la especie y aparentemente también del tiempo de crecimiento de las mismas (rápido o lento) ya que en el caso de *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. mucogenicum* (todas de crecimiento rápido) el mayor porcentaje de recuperación obtenido fue con HPC independientemente de la concentración evaluada (0.05% y 0.75%); mientras que *M. marinum* y *M. simiae* (crecimiento lento) mostraron mejores porcentajes de recuperación con ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico al 6%. Por lo que es de suponer que las MNT de crecimiento lento son más resistentes a tratamientos de descontaminación fuertes o muy agresivos como los ácidos que las MNT de crecimiento rápido, debido quizás a que requieren un mayor tiempo de adaptación antes de empezar a crecer en medios de cultivo sólidos.

El ácido oxálico mostró buenos porcentajes de recuperación para *M. simiae* (63.4%) *M. marinum* (60.5%) y para *M. fortuitum* (31.5%) lo cual demuestra que este método favorece la recuperación de estas especies.

El uso de ácido sulfúrico al 6% y NaOH al 2% y 4% mostró que las MNT de crecimiento rápido evaluadas (*M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. mucogenicum*) son extremadamente sensibles frente a estos agentes químicos descontaminantes ya que menos del 1% de éstas

fueron recuperadas lo cual concuerda con estudios reportados previamente (Sisco y col., 2006; Radomski y col., 2010). También encontramos que el ácido sulfúrico es un poco mejor que el NaOH en la recuperación de MNT de crecimiento rápido, lo cual esta en contradicción con el trabajo de Buijltjes y Petit (2004) quienes concluyen que el ácido sulfúrico recupera una mayor cantidad de MNT de crecimiento rápido que el NaOH al 2%.

Las MNT de crecimiento lento evaluadas en este ensayo (*M. marinum* y *M. simiae*) mostraron que son más resistentes a la acción del ácido oxálico al 5%, ácido sulfúrico al 6% y NaOH al 2% y 4% que las de crecimiento rápido anteriormente mencionadas, por lo que quizás este comportamiento se deba a reordenamientos en los lípidos de la pared celular en estas especies lo cual es una hipótesis. *M. simiae* demostró ser la especie más resistente con todos los agentes químicos descontaminantes evaluados que las otras especies.

En cuanto al procesamiento de las muestra de agua de Venezuela, nuestro estudio demostró que el método de HPC al 0.05% es más eficiente que el método de ácido oxálico al 5% ya que se obtuvo mayor número de muestras positivas, baja tasa de contaminación y mayor diversidad de especies de MNT aisladas a pesar de que también encontramos mayor número de muestras negativas.

El método de HPC al 0.05% es usado principalmente para el procesamiento de muestras con bajos niveles de contaminación, tales como agua potable, agua de grifos y aguas para ser inoculadas artificialmente con MNT (Radomski y col., 2010).

A pesar de que en nuestro estudio utilizamos HPC al 0.05% los resultados son similares con los obtenidos por Neumann y colaboradores (1997), quienes usando CPC al 0.05%, obtuvieron también buenos porcentajes de muestras positivas por MNT y poca contaminación. Adicionalmente, en su estudio también encontraron que independientemente de cualquier combinación de método de descontaminación y medio de cultivo empleado, la incubación a 30° C arroja mayor rendimiento, mayor número de unidades formadoras de colonias y mayor diversidad de especies de MNT razón por la cual utilizamos esta temperatura de incubación en esta investigación, encontrando para entonces hasta 12 especies de MNT distintas, incluyendo las de nueva descripción.

A pesar de que en el trabajo de Thomson y colaboradores (2008) se demostró que los residuos de clorina presentes en el agua potable y de grifos no afecta la recuperación de MNT, ya que las mismas son resistentes a la clorina, cuando se procesaron las muestras de agua incubándolas con NaOH al 2%, obtuvimos la formación de un precipitado que impedía la filtración de la muestra después de 20 minutos de incubación. Por lo cual concluimos que este

fenómeno podría deberse a una reacción química del NaOH con el hipoclorito de sodio (NaOCl) presente en las muestras de agua y por consiguiente intentamos neutralizarlo con tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ya que se formaría cloruro de sodio, sulfato de sodio (ambos solubles en agua) y agua, de acuerdo a la siguiente reacción química:



Sin embargo, obtuvimos que aún se formaba el precipitado en las muestras por lo que concluimos que no se puede adaptar el método de NaOH para el procesamiento de muestras de agua incubando las mismas con este agente. De manera que la única opción sería filtrar las muestras, y luego descontaminar por 20 minutos con NaOH la membrana, pero como se describió anteriormente este procedimiento tiene el riesgo que los medios de cultivo se contaminen, razón por la cual no fue practicado. Tal vez la precipitación que se obtiene es debido a la formación de otras sales, entre ellas la de calcio.

En este estudio se demostró que también el uso de PANTA no restringe en su totalidad el crecimiento de otras bacterias y hongos asociadas a las muestras de agua, pero sin embargo es imprescindible su uso en medios para el aislamiento de MNT a partir de esas muestras. Sorprendentemente encontramos que el PANTA tiene efecto negativo sobre *M. mucogenicum*, ya que no se observó el crecimiento de esta especie en el ensayo de evaluación del PANTA. *M. mucogenicum* es un complejo que incluye a las especies *M. mucogenicum*, *M. aubagnense* y *M. phocaicum*, fue aislada por primera vez en 1976 a partir de dos pacientes que presentaban casos de peritonitis crónica en Francia. Las investigaciones para la época sugirieron que la inefectiva desinfección permitió la colonización del equipamiento de diálisis para tratar la peritonitis en vista que después se reportaron otros casos de aislamiento de esta especie en el mismo centro médico (Adékambi y col., 2006 y 2009). Debido a esto se realizó un estudio por Adékambi y colaboradores (2006 y 2009) en el cual evaluaron la sensibilidad de este complejo frente a una cantidad de antibióticos de última generación. En los resultados obtenidos por estos autores se encontró que esta especie de MNT es sensible a una gran cantidad de drogas como amikacina, ciprofloxacina, imipenem, claritromicina, doxiciclina, cefoxitina, azlocilina y trimetropina, estos dos últimos componentes del PANTA. Es por ello que en nuestro estudio esta especie, al igual que otras probablemente sensibles a PANTA, no pudieron ser aislada de las muestras de agua (Adékambi y col., 2006 y 2009).

También se demostró que el uso del medio de cultivo puede afectar el aislamiento de MNT a partir de muestras de agua, debido a que en la optimización del método de descontaminación, las especies de crecimiento lento *M. avium* y *M. kansasii* no crecieron después de 3 semanas de

incubación, demostrando que en el aislamiento de MNT se deberían utilizar varios medios de cultivo como Middlebrook 7H11 (con y sin PANTA), agar sangre, placas de Lowenstein-Jensen, entre otros.

El método estandarizado que obtuvimos en este estudio comparado con los que han sido anteriormente descritos ofrece una mayor recuperación de MNT ya que al usar la filtración como técnica de concentración garantizamos un mayor número de MNT aisladas de las muestras de agua que usando la centrifugación, la cual a pesar que es ampliamente usada por otros autores se ha demostrado que se obtienen pérdida de MNT. Además el hecho que establecimos el porcentaje de recuperación con algunas especies representativas de MNT (*M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. marinum* y *M. simiae*) permite conocer la cantidad exacta de MNT que se encontraban en una muestra de agua antes del proceso de descontaminación de la misma, lo cual no ha sido reportado por otros autores.

En los últimos años, las técnicas moleculares han facilitado la identificación de especies de MNT y permitido describir nuevas especies que están asociadas en algunos casos con enfermedades en humanos y animales (Chimara y col., 2008). La técnica de PRA-*hps65* fue descrita inicialmente por Telenti y colaboradores en 1993 y se basa en la detección de los fragmentos de restricción del polimorfismo del gen *hsp65*, que codifica para una proteína de 65 kDa. Esta técnica molecular posee la capacidad de identificar todas las especies del género *Mycobacterium*, sin utilizar técnicas sofisticadas que requieran del uso de sondas y/o procedimientos de hibridación (Telenti y col., 1993; Devallois y col., 1997; Brunello y col., 2001; Chimara y col., 2008). A esta característica, se suma su efectividad para identificar micobacterias directamente de muestras clínicas, sin la necesidad de cultivar la bacteria, lo cual permite identificar especies de micobacterias difíciles de aislar en medios de cultivo (Taylor y col., 1997). La técnica de PRA-*hsp65*, no puede hacerse directamente a partir de muestras de agua debido a que es necesario previamente concentrar las micobacterias que pudiesen estar presentes en las mismas por técnicas como la filtración y/o centrifugación.

En nuestro estudio, se logró identificar con esta técnica el 96,8% de los aislados positivos para la coloración de Ziehl Nielsen, obtenidos en los medios de cultivo, de una manera rápida (en un día) y fiable. Algunas de las especies que se aislaron son aquellas que se han reportado en otros estudios como abundantes en el agua, tales como: *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. peregrinum* y *M. simiae*. Otras fueron especies que han sido recientemente descritas como *M. brisbanense* y *M. sherrisii*, o que no se han asociado con cuadros de micobacteriosis por su condición de saprofitas, como el caso de *M. gordonae* y *M. chitae*. El caso de los aislados que no pudieron ser discriminados por PRA-*hps65*, como el

grupo de *M. smegmatis* / *M. goodii* / *M. mageritense* y el grupo de *M.septicum* / *M.peregrinum* tipo 2 / *M. porcinum* 2 debido a que comparten no solo el mismo patrón de restricción sino las mismas características de crecimiento (rápidas y no pigmentadas), concluimos que la identificación de éstas se debe realizar aplicando otras técnicas como la secuenciación del gen que codifica la subunidad 16S ribosomal, el gen *rpoB* (que confiere resistencia por la rifampicina) y otros genes comunes en micobacterias.

Existen pruebas de susceptibilidad en discos de tobramicina que pueden ser usadas para la diferenciación entre el grupo de *M. smegmatis* (*M. smegmatis*, *M. goodii* y *M. mageritense*) ya que un tamaño de zona intermedio de lectura (11-30 mm) con este antibiótico es característico para *M. goodii*, mientras que zonas mayores de 30 mm son que los cultivos de *M. smegmatis* tienen zonas mayores de 30 mm y *M. mageritense* es resistente (Brown y col., 1999).

El aislado cuyo patrón de restricción no ha sido reportado en la base de datos <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>, probablemente corresponda a una nueva especie de MNT, ya que hubo digestión enzimática con *BstEII* del producto de PCR del gen *hsp65*, esto debido a que otros actinomicetos como *Nocardia* a pesar de que amplifican dicho gen no presentan luego digestión con la enzima *BstEII*. En todo caso, es imprescindible usar técnicas de secuenciación de varios genes como *rpoB*, *hsp65*, 16S, entre otros que nos permitan corroborar este supuesto.

En todo caso, en nuestra investigación, concluimos que en Venezuela al menos con este muestreo realizado, existe una gran diversidad de especies de MNT en los sistemas de distribución de agua potable y sistemas naturales. Las especies *M. peregrinum* tipo 3 y tipo 1, *M. fortuitum* tipo 1 y 2 y *M. abscessus* tipo 1 fueron las especies más comunes en Venezuela, todas éstas son especies potencialmente patógenas para el hombre por lo que el agua constituye un vehículo para la adquisición de cuadros de micobacteriosis. Es por ello que determinar la diversidad y abundancia de MNT en muestras de agua destinadas para actividades humanas es de gran interés clínico y/o preventivo, por lo cual nuestro estudio puede ser usado para este propósito.

## CONCLUSIONES

- La sedimentación es una técnica que demostró ser inadecuada para la concentración de MNT a partir de muestras de agua debido a que se encontró uniformidad en la distribución de *M. abscessus* utilizada en esos ensayos.
- La mejor condición para la filtración de las muestras de agua es incubando las mismas con el agente químico descontaminante y luego filtrarlas transcurrido un período de tiempo.
- *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. marinum* y *M. simiae* son especies suficientemente representativas para evaluar los porcentajes de recuperación con los agentes químicos descontaminantes empleados.
- El uso de HPC al 0.05% ofreció mejores porcentajes de recuperación para todas las especies de MNT evaluadas que los otros agentes químicos descontaminantes evaluados (NaOH, ácido sulfúrico y ácido oxálico).
- Se evidenció que dependiendo del tiempo de crecimiento, las especies de MNT presentan diversa sensibilidad frente a diversos agentes químicos descontaminantes.
- El muestreo realizado es representativo ya que abarcó 15 de 24 estados de Venezuela y en la cual se demostró la presencia de MNT en sistemas de distribución de agua potable y sistemas naturales.
- En el procesamiento de las muestras de agua de Venezuela, el método de HPC al 0.05% demostró ser más eficiente debido a que se obtuvieron mayor número de muestras positivas y diversidad de especies de MNT y menor tasa de contaminación que el método de ácido oxálico al 5%.
- El uso de PANTA en medio tripticasa de soya inhibió el crecimiento de *M. mucogenicum* debido a que esta especie es sensible a la trimetropina y azlocilina (constituyentes del PANTA) por lo que pudiera afectar la recuperación de otras especies en las muestras de agua sensibles a algún componente del mismo.
- PRA-*hsp65* demostró ser una técnica fiable para la identificación de especies de MNT ya que logró identificar de manera rápida y precisa el 96.8% de los aislados ZN positivos obtenidos en las muestras de agua.

- El aislado que no pudo ser identificado por PRA-*hps65* probablemente se trate de una nueva especie de MNT.
  
- Se demostró que hay una gran diversidad de especies de MNT en muestras de agua de Venezuela siendo *M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. abscessus* las más abundantes y *M. chitae*, *M. brisbanense*, *M. sherrisii* las más raras ya que se han reportado recientemente.
  
- Este trabajo aporta importante información de interés clínico ya que se estandarizó un protocolo de concentración y de descontaminación para el aislamiento de MNT a partir de muestras de agua lo cual permite establecer en algunos casos el reservorio y la fuente de infección para prevenir la aparición de brotes, pseudobrotes y casos aislados de micobacteriosis, los cuales en los últimos años se han incrementado dentro de la población de nuestro país.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- ✓ Usar la filtración como técnica de concentración de MNT a partir de muestras de agua.
- ✓ Utilizar Tween 80 al 1% para evitar la adherencia superficial y pérdida de MNT en el procesamiento de muestras de agua.
- ✓ El uso de varios medios de cultivo (Lowenstein Jensen, Middlebrock 7H10 y 7H11, agar sangre, entre otros) que permitan ampliar el espectro de especies de MNT aisladas debido a que algunas de estas requieren de suplementos nutricionales especiales como hemina, micobactina, entre otros.
- ✓ Emplear placas con y sin PANTA para el procesamiento de muestras de agua debido a que probablemente existan especies de MNT que sean sensibles al mismo.
- ✓ El uso de varios agentes químicos descontaminantes para el procesamiento de muestras de agua debido a que se demostró que dependiendo del método de descontaminación se aíslan determinadas especies en una misma muestra.
- ✓ Utilizar PRA-*hsp65* debido a que constituye una técnica fiable, rápida y sencilla para la identificación de especies de MNT.
- ✓ El uso de técnicas de secuenciación para la identificación de especies cuyos patrones de restricción por PRA-*hsp65* no se hayan reportado ó que sea el mismo para diferentes especies.

## BIBLIOGRAFÍA

Adékambi, T., Foucault, C., La Scola, B., Drancourt, M. 2006. Report of two fatal cases of *Mycobacterium mucogenicum* central nervous system infection in immunocompetent patients. **44**: 837-840.

Adékambi, T. 2009. *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**: 911-918.

Alcaide, F., Esteban, J., González, J., Palacios, J. 2005. Micobacterias. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Novena Edición, Cercenado E, Cantón R Editores. Madrid, España.

Arend, S.M., van Soolingen, D., Ottenhoff, T.H. 2009. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **3**:201-208.

Bailey, R.K., Wyles, S., Dingley, M., Hesse, F., Kent, G.W. 1970. The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water. *Am. Rev. Respir. Dis.* **101**: 430-431.

Bello, T., Rivero-Olivero, I., de Waard, J. 2006. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**: 319-321.

Beerwerth, W. 1967. Culture of mycobacterias from the droppings of domestic animals and the role of these bacteria in epizootiology. *Prax. Pneumol.* **21**: 189-202.

Berdinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorf, K., Zehnder, A.J.B. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneforms bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3973-3977.

Brennan, P.J., Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev. Biochem.* **64**: 29-63.

Brennan, P.J., Crick, D.C. 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**:475-488.

Brooks, R.W., George, K.L., Parker, B.C., Falkinham, J.O, Gruft, H. 1984. Recovery and survival of nontuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions. *Can J Microbiol.* **30**: 1112-1117.

Brown, BA. Springer, B. Steingrube, VA. Wilson, RW. Pfyffer, GE. Garcia, MJ. Menendez, MC. Rodriguez-Salgado, B. Jost, KC. Chiu, SH. Onyi, GO. Böttger, EC. Wallace, RJ Jr. 1999. *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1493-1511.

Brown, M.H. y Mayes, T. 1980 The growth of microbes at low pH values. Biochemistry. Academic Press. USA. p 71-98.

Buijtelts P., Petit P. 2005. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J. Microbiol Methods*, **62**: 83-88.

Bullin, C.H., Tanner, E.I. Collins, C.H. 1970. Isolation of Mycobacterium xenopi from waters taps. *J. Hyg.* **68**: 97-100.

Camirero, J.A. 2001. Micobacterias atípicas. *BSCP Can Ped.* **5**: 237-246.

Caroli, G., Levre, E., Armani, G., Biffi-Centili, S., Molinari, G. 1985. Search for acid-fast bacilli in bottled mineral waters. *J Appl Bact.* **58**: 461-464.

Casal, M., Guerrero, A., Martín, N., Moreno, S., Nogales, M. 1999. Procedimientos en Microbiología Clínica. Capítulo 9: Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. Editor: Juan J. Picazo. Madrid, España.

Casal, M., Casal, M. 2000. Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. *Enfer. Emerg.* **4**: 220-230.

Casal, M., Liu, J., Draper, P. y Brennan, P. 2003. Como denominar a las micobacterias diferentes de *M. tuberculosis* y *M. leprae*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **21**: 296-298.

Chan, E.D., Kaminska, A.M., Gill, W., Chumura, K y colaboradores. 2007. Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing

mycobacteria and AAT inhibits *Mycobacterium abscessus* infection of macrophages. **39**: 690-696.

Chimara, E., Ferrazoli, L., Misuka, S., Martins, M., Durham, A., Arbeit, A., Leão, S. 2008. Reliable identification of mycobacteria species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Micro*. **8**:48-59.

Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun*. **65**: 3759-3767.

Cortesia, C. 2006. Desarrollo de un nuevo método rápido y fácil para determinar la concentración mínima inhibitoria de desinfectantes y antibióticos sobre cepas de micobacterias atípicas que expresan el gen de la proteína fluorescente verde. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C). Centro de Microbiología y Biología Celular, Altos de Pipe, Venezuela.

Covert, T., Rodgers, M., Reyes, A. 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. **65**: 2492-2496.

Donlan RM, Costeron JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev*. **15**: 167–193.

du Moulin, G., Stotmeier, K. 1978. Use of cetylpyridinium chloride in the decontamination of water for culture of mycobacteria. *Appl Enviro Microbiol*. **36**:771-773.

Dundee, L., Grant., I.R., Ball., H.J., Rowe, M.T. 2002. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from milk. **33**: 173-177.

Engel, H.W.B., Groothuis, W, Wouda, W., König, C.D.W., Lendfers, M. 1978. "Pig – compost" as a source of *Mycobacterium avium* infection in swine. *Zentralbl. Verterinaarmed. Reihe B*, **25**: 373-382.

Falkinham, J.O. III 1996. Epidemiology of infection by non-tuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. **9**: 177-215.

Falkinham, J.O. III 2002. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med*, **23**: 529-551.

Falkinham, J.O. III. 2008. Surrounded by Mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.* **2**:356-367.

Falkinham, J.O. III. 2009. The biology of environmental mycobacteria. *Environ. Microbiol. Reports.* **1**: 477-487.

Falkinham, J.O. III 2010. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiol.* **5**: 1-10.

Falkinham, J.O. III, Parker, B.C., Gruft, H. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Geographic distribution in the eastern United States. *Am. Rev. Respir. Dis.* **121**: 931-7.

Falkinham, J.O. III., Norton, C., Le Chavallier, M. 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* **67**:1225-1231.

Falkinham, J.O. III., Iseman, M.D., de Haas, P., van Soolingen, D. 2008. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J. Water Health.* **6**: 209-213.

Fernández de Vega, F. 2005. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.* **1**:53-57.

Gilbert, P., Moore, L.E. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 703-715.

Glover, N., Holtzman, T., Aronson, S., Froman, O., Berlin, O.G.W., Dominguez, P., Kundel, K.A y colaboradores. 1994. The isolation and identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) recovered from Los Angeles potable water, a possible source of infection in AIDS patients. *Int. J. Environ. Health Res.* **4**: 63-72.

Goslee, S., Wolinsky, E. 1976. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Ame. Rev. Respir. Dis.* **113**: 287-292.

Hedgecock, L. W., Faucher, I.O. 1961. Isolation of increased numbers of unclassified mycobacteria following decontamination of sputum with malachite green and crystal violet. *Am. Rev. Respir. Dis.* **84**: 710-718.

Hirsch, C.F., Christensen, D.L. 1983. Novel method for selective isolation of Actinomycetes. *Ame Enviro Microbiol.* **46**: 925-929.

Iañez, E. 1998. Acción de los agentes químicos sobre las bacterias. eianez@goliat.ugr.es

Iivanainen, E., Martikainen, P.J., Väänänen, P.K., Katila, M.L. 1993. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *J Appl Microbiol.* **59**: 398-404.

Iivanainen, E., Martikainen, P.J., Katila, M.L. 1997. Comparision of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters. *J Appl Microbiol.* **82**: 121-127.

Jaramillo, V.L., McCarthy, C.M. 1986. Recovery of *Mycobacterium avium* after treatment with Chemicals decontaminants. *Can J Microbiol.* **32**: 728-732.

Kamala, T., Paramavisan, C.N., Herbert, D., Venkatesan, P., Prabhakar, R. 1994. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 1021-1024.

Kleeberg, H., Nel, E. 1980. Ocurrance of environmental atypical mycobacteria in South Africa. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.* **53**: 405-418.

Korman, T., Globan, M., Sievers, A., y col., 1997. A novel *Mycobacterium* isolated from a man with AIDS. *Spanish J of Chemoter.* **2**: 10-15.

Le Dantec, C., Duguet, C.J., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., Vincent, V. 2002. Chloride disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1025-1032.

Liu, J., Barry, C., Nikaido, H. 1999. Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence. Capitulo 12: Cell wall: physical structure and permeability. Segunda Edición. Editorial Blackwell Science, USA.

Manual de Laboratorio, 2006. Protocolo de Trabajo. Laboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina. UCV, Caracas, Venezuela.

- Marcus, L.C., Strottmeier, K.D., Morrow, R.H. 1976. Experimental alimentary infection of Anole lizards (*Anolis caroliensis*) with *Mycobacterium ulcerans*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **25**: 630-632.
- Marras, T.K., Daley, C.I. 2002. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin. Chest. Med.* **23**: 553-567.
- Marras, T.K., Chedore, P., Ying, A.M., Jameison, F. 2007. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax*, **8**: 661-666.
- McDonnell, G., Russell, D.A. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 147-179.
- McSwiggan, D.A, Collins, C.H. 1974. The isolation of *M. kansasii* and *M. xenopi* from water systems. *Tubercle*,**55**: 291-297.
- Miörner, H., Ganlöv, G., Yohannes, Z., Adane, Y. 1996. Improved Sensitivity of Direct Microscopy for Acid-Fast Bacilli: Sedimentation as an alternative to centrifugation for concentration of tubercle bacilli. *J Clin Micro.* **34**: 3206-3207.
- Mitchison, D.A., Allen, B.W., Carrol, L., Dickinson, J.M y colaboradores. (1972). A selective oleic acid albumina gar médium for tubercle bacilli. *J. Med. Microbiol.* **5**:165-175.
- Neumann, M., Schulze-Röbbecke, R., Hagenau, C. 1997. Comparision of methods for isolation of mycobacteria from water. *Appl Environ Microbiol.* **63**:547-552.
- Nishiuchi, Y., Tamaru, A., Kitada, S., Taguri, T., Matsumoto, S., Tateishi, Y., Yoshimura, M y colaboradores. 2009. *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients bathrooms. *Jpn. J. Infec. Dis.*, **62**: 182-186.
- Pérez, L.E. 2005. Teoría de la sedimentación. Cátedra de Hidráulica aplicada a la ingeniería sanitaria. Instituto de Ingeniería Sanitaria y Ambiental .UNAM, México D.F. p 1-25.
- Petroff, E.I., Vera, H.D. 1915. Some cultural studies on the tubercle bacillus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **26**: 276-279.

Phillips, B.J., Kaplan, W. 1976. Effect of cetylpyridinium chloride on pathogenic fungi and *Nocardia asteroides* in sputum. *J Clin Microbiol.* **3**: 272-276.

Primm, T., Lucero, C., Falkinham, J.O. III. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Reviews.* **17**: 98-106.

Radomski, N. Cambau, E, Moulin L, Haenn S, y colaboradores. 2010. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. **76**: 3514-3520.

Reyes, E. 2002. Técnicas de biología molecular para el estudio epidemiológico de *Mycobacterium tuberculosis*. Universidad de Los Andes. Facultad de Medicina. Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales. Mérida, Venezuela. p 92.

Rhines, C. 1935. The persistence of avian tubercle bacilli in soil and in association with soil microorganisms. *J. Bacteriol.* **29**: 299-311.

Runyon, E.H., Timpe, A. 1954. The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. A preliminary report. *J. Lab. Clin. Med.* **44**:202-209.

Russell, A. 2002. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *J. Antimicrobial Chemo.* **49**: 597-599.

Ryan, K.J., Ray, G.C. 2004. Sherris Medical Microbiology, Cuarta Edición, Mc Graw Hill Interamericana. México.

Salton, M. 1968. Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability. *J Gen Physiol.* **52**: 2525-2775.

Schlossberg, D. 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. 4<sup>a</sup> Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México.

Schulze-Robbecke, R., Weber, A., Fischeider, R. 1991. Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples. *J Microbiol Methods.* **14**: 177-183.

Schinnick, T. 1987. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **169**:1080-1088.

Sisco, C., Rivero-Olivero, I., de Waard, J. 2006. Evaluación de la recuperación de micobacterias no tuberculosas con agentes químicos descontaminantes. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. UCV.

Smithwick, R.W., Stratigos, B., David, H.L. 1975. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, **1**: 411-413.

Soberón, G. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) pp 24.

Songer, G. 1980. Methods for selective isolation of micobacterias from the environmental. *Can J Microbiol*. **27**: 1-7.

Steck, P., Schwarztz, M., Rosendhal, G., Gray, R. 1978. Mycolic acids: a reinvestigation. *J. Biol. Chem*. **253**: 5625-5709.

Taylor, T., Patterson, C., Hale., Y., Safranek, W. 1997. Routine use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J. Clin. Microbiol*. **35**: 79-85.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E., Bodmer, T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. **31**: 175-178.

Thomson, R., Carter, R., Gilpin, C., Coulter, C., Hargreaves, M. 2008. Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl Environ Microbiol*. **74**: 3094-3098.

van Ingen, J., Boeree, M.J., Dekhuijzen, R., van Soolingen, D. 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases. Review. **15**: 888-893.

Webb, V., Davies, J. 1998. Antibiotics and antibiotic resistance in mycobacteria. Molecular Biology and Virulence. Ed. Ratledge, C and Dake, J. pp.297-306. Oxford: Blackweell Science Ltd.

Wolinsky, E., Ryneerson, K.T. 1979. Mycobacteria in soil and their relation to disease associated strains. *Ame Rev Resp Dis*. **97**: 1032-1037.

Wolinsky, E., Davis. B., Duplecco, R., Eisen, H. y Ginisber, H. 1990. *Mycobacterium*. Tratado de microbiología. Tercera edición. México. Salvat. p 589-604.

Yamazaki, Y., Danelishvili, L., Wu, M., MacNab, M., y colaboradores. 2006 *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 819–825.

#### Referencias de Internet

<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>,

<http://www.cosmosbiomedical.com/education/bacteriology/1-M.tuberculosis.shtml>.

(Consulta 15 de Agosto de 2010).

<http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/1152892> (Consulta 15 de Agosto de 2010).

[www.higiene1.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap24.pdf](http://www.higiene1.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap24.pdf) (Consulta: 23 de Agosto de 2010).

<http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n42/mesoterapia.html> (Consulta 16 de Enero del 2010).

[www.neb.com/nebecomm/products](http://www.neb.com/nebecomm/products) (Consulta 18 de Enero del 2010).