

## Efecto de descontaminantes sobre la población de *Mycobacterium fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*.

Decontaminating effect on the population of *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae* and *M. abscessus*

Carvajal Karla, Guevara Leyismar, García Enrique, Ramírez Ana\*

\*Laboratorio de Microbiología del Suelo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (U.L.A). Sector Campo de Oro, Mérida - Venezuela.

Recibido marzo 2011 - Aceptado mayo 2011

### RESUMEN

Las micobacterias atípicas (MA) son microorganismos saprófitos en muchos ecosistemas, cuyo aislamiento se puede alterar por el efecto de sustancias usadas para la descontaminación de las muestras ambientales. En este trabajo se evaluó el efecto de los procesos de descontaminación con cloruro de cetilpiridinium (CPC) e hidróxido de sodio (NaOH) sobre la población de *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*. El medio de cultivo utilizado fue una modificación del medio Löwenstein-Jensen (medio base con y sin NaCl 4%). Las suspensiones bacterianas fueron ajustadas al patrón 0,5 de McFarland, realizándose diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  antes y después del proceso de descontaminación con CPC al 0,5% y 0,75%, NaOH al 1%. Dichas diluciones se inocularon en microplacas de 96 pozos y la estimación de la población se realizó mediante el método del número más probable (NMP). Se observó una disminución del crecimiento de *M. chelonae* al agregar al medio, NaCl 4%. El CPC fue el agente con menor efecto sobre las MA, obteniéndose poblaciones estadísticamente similares a la población inicial, *M. chelonae* fue la especie más resistente al efecto inhibitorio de este descontaminante; mientras que el NaOH afectó significativamente la población de las MA estudiadas y con efectos mayores al usarse el NaCl al 4%.

### PALABRAS CLAVE

micobacterias atípicas, cloruro del cetilpiridinium, hidróxido de sodio, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*.

### ABSTRACT

Atypical mycobacteria (AM) are saprophytic organisms in many ecosystems, whose isolation can be altered by the effect of substances used for decontamination of environmental samples. In this study we evaluated the effect of decontamination processes cetilpiridinium chloride (CPC) and sodium hydroxide (NaOH) on the population of *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae* and *M. abscessus*. The culture medium used was a modification of the Löwenstein-Jensen medium (basal medium with and without NaCl 4%). The bacterial suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard, serially diluted to  $10^{-8}$  before and after CPC decontamination to 0.5% and 0.75% and NaOH 1%. These dilutions were inoculated in 96-well microplates and the population was estimated by the method of most probable number (MPN). There was a decline in growth of *M. chelonae* to add to the environment, NaCl 4%. The CPC was the agent with less effect on AM, populations obtained statistically similar to the initial population, with *M. chelonae* species more resistant to the inhibitory effect of this descontaminant, while the NaOH significantly affected the population of the AM study and larger effects when used NaCl 4%.

### KEY WORDS

atypical mycobacteria, cetilpiridinium chloride, sodium hydroxide, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*.

## INTRODUCCIÓN

Dentro del género *Mycobacterium* existen múltiples especies causantes de diversas infecciones humanas [1,2]. Las micobacterias se dividen en 2 grandes grupos, las que pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y las que no pertenecen a este complejo, denominadas micobacterias no tuberculosas o atípicas (MA). Éstas últimas son saprófitas en todos los ecosistemas y se les puede aislar de vegetales, así como del suelo, agua, fango, y sedimentos de diferentes partes y zonas climáticas del mundo. Pueden sobrevivir en ambientes de baja humedad, amplios rangos de pH y temperatura, y a mínimas concentraciones de materia orgánica [3-10]. El hospedero humano adquiere las MA por ingestión, inhalación o inoculación por medio de traumatismos, accidentes, infecciones de heridas quirúrgicas y uso de apósitos contaminados o dispositivos protésicos; además estos microorganismos ocasionan enfermedad pulmonar, enfermedad linfática, ótica, ósea, corneal y cutánea. Las lesiones cutáneas pueden ser localizadas, con un retraso en la cicatrización de las heridas hasta cuadros clínicos diseminados, éstos últimos principalmente en pacientes inmunosuprimidos [5,7,8,11,12].

La proliferación *in vitro* de las micobacterias se complica por el hecho de que son microorganismos de crecimiento lento, por lo tanto, su crecimiento en los medios de cultivos pueden ser solapados por bacterias autóctonas de crecimiento rápido. Los métodos de descontaminación, medios de cultivos y amplificación por PCR, utilizados para investigar la presencia de micobacterias a partir de muestras clínicas, no siempre son eficaces para el aislamiento y/o detección de estas bacterias a partir de muestras ambientales [2,13].

Sustancias como cloruro de cetilpiridinium (CPC), cloruro de benzalconio, hidróxido de sodio (NaOH) a diferentes concentraciones, ácido oxálico, dodecyl sulfato de sodio (SDS) y cetrimida [8], se usan como descontaminantes de las muestras ambientales y pueden afectar la viabilidad de las micobacterias, produciéndose pérdida de ellas durante la exposición a estos agentes, recuperándose sólo un porcentaje menor con respecto al inóculo inicial [8,14]. El interés de la presente investigación fue estudiar el efecto de los procesos de descontaminación con CPC y NaOH sobre la población de *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Medio de cultivo.

El caldo utilizado se denominó medio base

preparado con los componentes del medio estándar Löwenstein-Jensen sin verde de malaquita, y se le añadió extracto de carne (3 g/L) y peptona (5 g/L). Simultáneamente se utilizó el mismo medio base modificado al cual se le adicionó NaCl al 4 %.

Estos medios fueron dispensados en microplacas estériles de 96 pozos a razón de 150  $\mu$ L por pozo.

### 2. Preparación de la suspensión bacteriana.

Las cepas *M. fortuitum* (1256), *M. chelonae* (4009) y *M. abscessus* (2784) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina; Caracas-Venezuela.

Se preparó una suspensión bacteriana homogénea en un tubo con 8 mL de solución fisiológica estéril (SSF) que se ajustó al patrón 0,5 de McFarland.

### 3. Estimación de la población total.

De las suspensiones bacterianas preparadas, como se describió anteriormente, se transfirió 1 mL a tubos estériles y a cada uno de ellos se le agregó 1 mL de SSF estéril para luego ser centrifugadas a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 2 mL de SSF estéril, centrifugándose nuevamente. El sedimento final fue resuspendido en 1 mL de SSF estéril, realizándose diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  de cada cepa. A partir de cada dilución se sembraron 50  $\mu$ L por quintuplicado en placas de medio base con y sin NaCl 4% e incubadas a 30°C durante cuatro semanas.

### 4. Determinación del efecto del cloruro de cetilpiridinium (CPC) al 0,5 % y 0,75 % durante 30 minutos.

Se transfirió por duplicado 1 mL de la suspensión bacteriana de cada cepa preparada inicialmente, a tubos estériles y se le agregó a uno de éstos 1 mL de CPC al 1% y al otro el mismo volumen de CPC al 1,5%, para obtener una concentración final de 0,5 y 0,75%, respectivamente, dejándose actuar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Al finalizar cada periodo de exposición, se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 2 mL de SSF estéril (proceso de lavado) con el fin de eliminar el exceso de CPC. El sedimento final fue resuspendido en 1 mL de SSF estéril. De esta suspensión, se tomaron 0,5 mL y se agregaron en 4,5 mL de SSF estéril, a partir de esta dilución ( $10^{-1}$ ) se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  de cada cepa. De cada dilución se sembraron 50  $\mu$ L por quintuplicado en las placas de medio base e incubadas a 30°C durante cuatro semanas.

### 5. Determinación del efecto del NaOH al 1% durante 15 y 30 minutos sobre la población de micobacterias.

Se realizó el mismo proceso descrito anteriormente, utilizando NaOH al 2%, obteniendo una concentración final de 1%, y se dejó actuar durante 15 y 30 minutos.

Una vez realizadas las diluciones seriadas de cada cepa, se tomaron 50 µL para ser inoculados en microplacas con el medio de cultivo. Las cepas que fueron expuestas al NaOH al 1% durante 30 minutos fueron inoculadas en medio base; mientras que las que tuvieron un tiempo de exposición de 15 minutos fueron sembradas en medio base más NaCl al 4%. Cada dilución fue inoculada por quintuplicado e incubadas a 30°C durante 4 semanas.

En cada microplaca se colocó una cepa *M. peregrinum* ATCC [700686] como control de crecimiento positivo y un pozo sin inocular como control negativo.

### 6. Estimación de la población mediante el método del número más probable (NMP).

La población total, tanto de las suspensiones bacterianas tratadas con descontaminantes y las no tratadas, fueron calculadas por el NMP utilizando las Tablas de Woomer, en las cuales se establece que dos poblaciones son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) cuando el límite inferior de la población más alta es mayor que el límite superior de la población menor [15].

## RESULTADOS

Al evaluar las poblaciones totales en el medio base con y sin NaCl al 4%, se evidenció que el desarrollo de *M. chelonae* fue menor al ser inoculado en el medio base con NaCl al 4% (Tabla 1).

TABLA 1

Estimación de la población de las especies de *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* en los diferentes medios de cultivo de acuerdo al NMP.

Cepa	Población Total medio base			Población Total medio base+ NaCl 4%		
	NMP (microorg/mL)	Log <sub>10</sub>	Límites de confianza (microorg/mL)	NMP (microorg/mL)	Log <sub>10</sub>	Límites de confianza (microorg/mL)
<i>M. chelonae</i> [4009]	9,84 x 10 <sup>6</sup>	6,99	2,98 x 10 <sup>6</sup> - 3,25 x 10 <sup>7</sup>	9,84 x 10 <sup>4</sup>	4,99	2,98 x 10 <sup>4</sup> - 3,25 x 10 <sup>5</sup>
<i>M. fortuitum</i> [1256]	9,84 x 10 <sup>4</sup>	4,99	2,98 x 10 <sup>4</sup> - 3,25 x 10 <sup>5</sup>	9,84 x 10 <sup>4</sup>	4,99	2,98 x 10 <sup>4</sup> - 3,25 x 10 <sup>5</sup>
<i>M. abscessus</i> [2784]	9,84 x 10 <sup>4</sup>	4,99	2,98 x 10 <sup>4</sup> - 3,25 x 10 <sup>5</sup>	2,77 x 10 <sup>4</sup>	4,44	8,39 x 10 <sup>3</sup> - 9,14 x 10 <sup>4</sup>

Factor de dilución: 1/10. Factor de confianza: 3,30. Woomer [15].

NMP: número más probable. Límites de confianza se calcularon multiplicando y dividiendo por el factor de confianza.

En la Tabla 2 se observan las poblaciones estimadas mediante el NMP luego de ser expuestas al CPC a concentraciones de 0,5 y 0,75%. Al compararlas con la población total del medio base (Tabla 1) se puede evidenciar que las poblaciones fueron estadísticamente similares, *M. chelonae* fue la especie más resistente al efecto inhibitorio de dicha sustancia. Las dos concentraciones del CPC ensayadas ejercieron un efecto similar sobre las especies de micobacterias estudiadas.

TABLA 2

Estimación de la población de las especies de *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* luego de la exposición al CPC al 0,5% y 0,75% de acuerdo al NMP.

Cepa	CPC al 0,5%			CPC al 0,75%		
	NMP (microorg/mL)	Log <sub>10</sub>	Límites de confianza (microorg/mL)	NMP (microorg/mL)	Log <sub>10</sub>	Límites de confianza (microorg/mL)
<i>M. chelonae</i> [4009]	4,32 x 10 <sup>6</sup>	6,64	1,31 x 10 <sup>6</sup> - 1,43 x 10 <sup>7</sup>	1,38 x 10 <sup>6</sup>	6,14	4,18 x 10 <sup>5</sup> - 4,55 x 10 <sup>6</sup>
<i>M. fortuitum</i> [1256]	4,32 x 10 <sup>4</sup>	4,64	1,31 x 10 <sup>4</sup> - 1,43 x 10 <sup>5</sup>	4,32 x 10 <sup>4</sup>	4,64	1,31 x 10 <sup>4</sup> - 1,43 x 10 <sup>5</sup>
<i>M. abscessus</i> [2784]	1,38 x 10 <sup>4</sup>	4,14	4,18 x 10 <sup>3</sup> - 4,55 x 10 <sup>4</sup>	4,61 x 10 <sup>4</sup>	4,66	1,40 x 10 <sup>4</sup> - 1,52 x 10 <sup>5</sup>

Factor de dilución: 1/10. Factor de confianza: 3,30. Woomer [15].

NMP: número más probable. Límites de confianza se calcularon multiplicando y dividiendo por el factor de confianza.

En la Tabla 3, al comparar los límites de confianza calculados a partir del NMP, se muestra que las poblaciones de micobacterias expuestas al NaOH al 1% durante 30 minutos difirieron significativamente ( $p < 0,05$ ) de la población total, reduciéndolas considerablemente. *M. fortuitum* fue la especie más afectada.

TABLA 3

Estimación de la población de las especies de *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* después de la exposición al NaOH al 1% durante 30 minutos de acuerdo al NMP.

Cepa	NaOH al 1% (medio base)		
	NMP (microorg/mL)	Log <sub>10</sub>	Límites de confianza (microorg/mL)
<i>M. chelonae</i> [4009]	2,14 x 10 <sup>3</sup>	3,33	6,48 x 10 <sup>2</sup> - 7,06 x 10 <sup>3</sup>
<i>M. fortuitum</i> [1256]	2,40 x 10 <sup>2</sup>	2,38	7,27 x 10 <sup>1</sup> - 7,92 x 10 <sup>2</sup>
<i>M. abscessus</i> [2784]	4,20 x 10 <sup>2</sup>	2,62	1,27 x 10 <sup>2</sup> - 1,39 x 10 <sup>3</sup>

Factor de dilución: 1/10. Factor de confianza: 3,30. Woomer [15].

NMP: número más probable.

Al utilizar el NaOH al 1 % durante 15 minutos en conjunto con el medio base más NaCl al 4%, se observó mayor inhibición de la población de las micobacterias estudiadas, reduciéndose significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a la población total (Tabla 1). Se evidencia que los límites de confianza difirieron estadísticamente uno con respecto al otro en cada especie (Tabla 4).

**TABLA 4**

Estimación de la población de *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. abscessus* luego de la exposición al NaOH 1% durante 15 minutos en medio base más NaCl 4% de acuerdo al NMP.

Cepa	NaOH al 1% (medio base + NaCl 4%)		
	NMP (microorg/mL)	Log <sub>10</sub>	Límites de confianza (microorg/mL)
<i>M. chelonae</i> [4009]	9,80 x 10 <sup>2</sup>	2,99	2,97 x 10 <sup>2</sup> – 3,23 x 10 <sup>3</sup>
<i>M. fortuitum</i> [1256]	9,80 x 10 <sup>2</sup>	2,99	2,97 x 10 <sup>2</sup> – 3,23 x 10 <sup>3</sup>
<i>M. abscessus</i> [2784]	2,00 x 10 <sup>2</sup>	2,30	6,06 x 10 <sup>1</sup> – 6,60 x 10 <sup>2</sup>

Factor de dilución: 1/10. Factor de confianza: 3,30. Woomeer [15]]

NMP: número más probable.

## DISCUSIÓN

El crecimiento de *M. chelonae* fue inhibido significativamente al ser inoculado en el medio con NaCl 4 %; observación que ratifica lo reportado por diversos autores, quienes describen la sensibilidad de esta especie al NaCl, a concentraciones mayores del 5 % [16].

Al analizar los resultados obtenidos del crecimiento de las micobacterias, luego de ser sometidas al CPC a 0,5 y 0,75%, se puede observar que no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos, es decir, que las micobacterias no fueron afectadas por las concentraciones de CPC ensayadas. Resultados similares obtuvieron Neuman y col. [17], quienes al utilizar CPC al 0,005 y 0,05%, el crecimiento micobacterial no difería estadísticamente. Prosser [14] obtuvo resultados semejantes con *M. avium-intracellulare-scrafulaceum* (MAIS) al utilizar diferentes concentraciones de CPC. Este autor señala que aún cuando se aumente la concentración de CPC y se mantenga el mismo tiempo de exposición, no habrá diferencias significativas en las poblaciones de *Mycobacterium*. Estos resultados difieren de los reportados por Valera y col. [8], quienes observan que el crecimiento de *M. phlei* disminuía a medida que se incrementaba la concentración del CPC. Por otro lado, dichos autores también reportan que el

crecimiento fue afectado por el aumento gradual del tiempo de exposición, el mayor efecto lo observan a partir de las 4 horas.

Con relación al efecto del NaOH al 1%, esta sustancia afectó significativamente la población de las micobacterias con respecto a la población total, resultados que coinciden con los reportados por Prosser [14], quien al utilizar NaOH en combinación con hipoclorito, la población del complejo MAIS fue menor que la obtenida con otros descontaminantes; Livanainen [18], utilizó el NaOH con ácido oxálico, resultando muy perjudicial para la micobacterias. Por otra parte, este mismo autor realizó un ensayo utilizando NaOH con verde de malaquita y cicloheximida, logrando eliminar contaminantes de los cultivos a una concentración baja de NaOH (0,3 M) y recuperar una población más alta de micobacterias.

Al comparar los dos tratamientos utilizados en el presente trabajo, el CPC tuvo menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las micobacterias, con respecto a los resultados con NaOH al 1%. Resultados similares a los descritos por Neumann y col. [17], quienes comparan dos métodos de descontaminación (CPC y NaOH-cicloheximida-verde de malaquita) e indican que los mejores resultados se lograron empleando CPC.

De acuerdo a lo referido por diversos autores y los resultados de este trabajo hay que destacar que los agentes descontaminantes actúan de manera distinta sobre las diferentes muestras (suelo, agua, esputo, etc.) y especies de micobacterias, tanto los agentes descontaminantes como el medio de cultivo pueden ser factores que perjudiquen o favorezcan el crecimiento de las mismas.

## CONCLUSIONES

*M. fortuitum* y *M. abscessus* mostraron resistencia al NaCl al 4%, mientras que *M. chelonae* fue más sensible. Las especies de micobacterias estudiadas fueron resistentes al efecto inhibitorio del CPC a las diferentes concentraciones utilizadas y sensibles al NaOH al 1%.

## AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes. Proyecto N° FA-402-06-01-B.

Los autores CK, GL, y RA tuvieron igual participación en la realización del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Fernández FA, Moreno JE, González MJ, Palacios GJ. Micobacterias. Procedimientos en Microbiología Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Clínica. 2ª ed. España: SEIMC; 2005. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>. [Consulta 2009, Octubre 10]
- [2] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. Microbiología Médica. 6ª ed. Madrid: Elsevier; 2009. p. 297-310.
- [3] Casal M, Casal M. Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. *Enf Emerg*. 2000; 2(4): 220-230.
- [4] Oriani DS, Sagardoy MA. Susceptibilidad de *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium kansasii* frente a tres soluciones germicidas. *In Vet*. 2005; 7: 1514-1520
- [5] Oriani DS, Sagardoy MA. Nontuberculous mycobacterias in soils of La Pampa Province (Argentina). *Rev Arg Microbiol*. 2002; 34: 132-137.
- [6] Gupta P, Katoch VM, Gupta UD, Chauhan DS, Das R, Singh D, et al. A preliminary report on characterization and identification of nontuberculous mycobacterias (NTM) on the basis of biochemical tests and protein/isoenzyme electrophoretic patterns. *Indian J Med Microbiol*. 2002; 20(3): 137-140.
- [7] Del Solar M, Salomón M, Bravo F, Seas C, Gotuzzo E, Culqui D, et al. Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética. Reporte de casos y revisión de la literatura. *Folia Dermatol*. 2005; 16(3): 127-135.
- [8] Valera D, Palencia J, García E, Ramírez A. Efecto del cloruro de cetilpiridium y utilidad como descontaminante para el aislamiento de *Mycobacterium phlei* en muestras de suelo. *Rev Fac Farm*. 2008; 50(1): 10-15.
- [9] Primm T, Lucero C, Falkinham. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(1): 98-106.
- [10] Thorel MF, Falkinhaln III JO, Moreau RG. Environmental micobacteria from alpine and subalpine habitats. *FEMS Microbiol Ecol*. 2004; 49: 343-347.
- [11] Caminero J. Micobacterias atípicas. *BSCP Can Ped*. 2001; 25(2): 237-248.
- [12] Thakur RS, Cutaneous infection with *Mycobacterium fortuitum*: an unusual presentation. *Indian J Med Microbiol*. 2008; 26(4): 388-390.
- [13] Chilima BZ, Clark IM, Floyd S, Fine P, Hirsch PR. Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, Northern Malawi. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(4): 2343-2350.
- [14] Prosser BA. Methods used to investigate a possible environmental source of *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulanceum* (MAIS) infection in farmed deer. *J Appl Bacteriol*. 1989; 66: 219-226.
- [15] Woome P. Most probable number counts. En: Mickelson S, Ed. *Methods of Soil Analysis. Microbiological and Biochemical Properties*. E.E.U.U.: Soil Science Society of America, Inc., 2 ed.; 1994. p. 59-79.
- [16] Coville P, Witebsky F. Variables affecting results of sodium chloride tolerance test for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36(6): 1555-1559.
- [17] Neuman M, Schulze- Robbecke R, Hagenav C, Behringer K. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(2): 547-552.
- [18] Livanainen E. Isolation of mycobacteria from acidic forest soil samples: comparison of cultura methods. *J. Appl. Bacteriol*. 1995; 78: 663-668.