



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA**

Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Comparación de diferentes agentes
descontaminantes para la recuperación de
micobacterias previamente aisladas de
muestras clínicas**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central
de Venezuela, por el bachiller Jesús David
Ramírez Orduz como requisito parcial para
optar al título de Licenciado en Biología

Caracas, Venezuela

Mayo-2011

Tutores:

LIC. LOREN OROZCO

LIC. ROXANA GAJARDO

ÍNDICE

Contenido	Página
Índice de tablas	V
Índice de figura	VI
Lista de abreviaturas.....	X
Resumen	XI
Introducción	1
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
Complejo <i>Mycobacterium laprae</i>	4
Micobacterias atípicas	5
Diagnóstico del género <i>Mycobacterium</i>	5
Métodos de descontaminación empleados para el aislamiento de Micobacterias.	6
a) Método de Petroff	7
b) Método de N-acetil-L-Cisteína - NaOH	7
c) Método de Kudoh	8
d) Método de Ácido Oxálico 5%	8
e) Método de Ácido Sulfúrico 6%	9

f) Métodos que emplean Compuestos de Amonio Cuaternario (QACs).	9
Medios de cultivo empleados para el crecimiento de micobacterias	10
Identificación del género <i>Mycobacterium</i> empleando la técnica “análisis con enzimas de restricción del polimorfismo del gen <i>hsp65</i> (PRA)”	11
Metodologías empleadas para evaluar la eficacia de los desinfectantes sobre las micobacterias	12
Método de suspensión	12
a) Ensayo de recuento de colonias en placas	12
b) Ensayo colorimétrico con 3',6'-fluoresceína diacetil (FDA)	13
Citometría de flujo	13
Fluorimetría	14
Antecedentes	15
Justificación	19
Objetivos	20
Objetivo General	20
Objetivos específicos	20
Marco metodológico	21
Material biológico	21
Agentes descontaminantes evaluados	21

Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo	21
Protocolo de descontaminación	22
Metodología de siembra en placas de agar.....	22
Metodología de estimación de la hidrólisis del compuesto 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA) por análisis de citometría de flujo y fluorimetría	23
Protocolo de neutralización	23
Preparación de la solución de trabajo de 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA)	23
a) Lectura de la hidrólisis del compuesto 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA) por análisis de citometría de flujo	23
b) Lectura de la hidrólisis del compuesto 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA) por análisis de fluorimetría	24
Análisis estadístico	24
a) Metodología de siembra en placas de agar	25
b) Metodología de estimación de la hidrólisis del compuesto 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA) por análisis de fluorimetría	25
c) Metodología de estimación de la hidrólisis del compuesto 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA) por análisis de citometría de flujo	25
Resultados	26
Metodología de siembra en placas de agar	26

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. abcessus</i>	26
b) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. chelonae</i>	28
c) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. fortuitum</i>	31
d) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. tuberculosis H37Ra</i>	33
Metodología de estimación de la hidrólisis del compuesto 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA) por análisis de fluorimetría	35
a) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. abcessus</i>	35
b) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. chelonae</i>	39
c) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. fortuitum</i>	43
d) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. tuberculosis H37Ra</i>	46
Metodología de estimación de la hidrólisis del compuesto 3´6´-fluoresceína diacetil (FDA) por análisis de citometría de flujo	49
a) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. abcessus</i>	49

b) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. chelonae</i>	55
c) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. fortuitum</i>	59
d) Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de <i>M. tuberculosis H37Ra</i>	65
Discusión	70
Conclusión	76
Recomendaciones	77
Bibliografía	78
Anexo	82
Anexo I	83
Anexo II	84
Anexo III	85
Anexo IV	86

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Clasificación de las micobacterias según Runyon 1959.....	3
Tabla 2. Micobacterias empleadas para la estimación del efecto causado por diferentes agentes descontaminantes.	21
Tabla 3. Concentración y volumen (soluciones stock) de los diferentes agentes químicos y neutralizantes.	23
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de <i>M. abscessus</i> estimado por la metodología de siembra en placas de agar.	28
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) de <i>M. chelonae</i> estimado por la metodología de siembra en placas de agar.	30
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) de <i>M. fortuitum</i> estimado por la metodología de siembra en placas de agar.	32
Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra estimado por la metodología de siembra en placas de agar.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Estructura de la pared celular de un bacilo ácido resistente	2
Figura 2. Comparación de la recuperación de <i>M. abscessus</i> para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar.....	26
Figura 3. Comparación de la recuperación de <i>M. chelonae</i> para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar.	29
Figura 4. Comparación de la recuperación de <i>M. fortuitum</i> para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar.	31
Figura 5. Comparación de la recuperación de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar.	33
Figura 6. Cinética de incorporación del FDA para <i>M. abscessus</i> y el efecto de los agentes descontaminantes.	36
Figura 7. Comparación del porcentaje de recuperación de <i>M. abscessus</i> estimadas en paralelo por análisis de fluorimetría y por recuento de colonias en placas de agar.	37
Figura 8. Cinética de incorporación del FDA para <i>M. chelonae</i> y el efecto de los agentes descontaminantes.	40
Figura 9. Comparación del porcentaje de recuperación de <i>M. chelonae</i> estimadas en paralelo por análisis de fluorimetría y por recuento de colonias en placas de agar.	41

Figura 10. Cinética de incorporación del FDA para <i>M. fortuitum</i> y el efecto de los agentes descontaminantes.	44
Figura 11. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para <i>M. fortuitum</i> por siembra en placa de agar y Fluorimetría.	45
Figura 12. Cinética de incorporación del FDA para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y el efecto de los agentes descontaminantes.	47
Figura 13. Comparación del porcentaje de recuperación de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra estimadas en paralelo por análisis de fluorimetría y por recuento de colonias en placas de agar.	48
Figura 14. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo).	50
Figura 15. Análisis de citometría de flujo para las células vivas marcadas con FDA (control positivo).	50
Figura 16. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. abscessus</i>	51
Figura 17. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. abscessus</i>	52
Figura 18. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para <i>M. abscessus</i> por siembra en placa de agar y citometría de flujo.	53
Figura 19. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo) y células vivas marcadas con FDA (control positivo).	55
Figura 20. . Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. chelonae</i> , empleando el agente descontaminante NaOH al 2% y 4%.	56

Figura 21. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. chelonae</i> , empleando los agentes químicos HPC 0,75%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico al 6%.	57
Figura 22. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para <i>M. chelonae</i> por siembra en placa de agar y citometría de flujo.	58
Figura 23. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo) y células vivas marcadas con FDA (control positivo).	60
Figura 24. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. fortuitum</i> , empleando el agente descontaminante NaOH al 2% y 4%.	61
Figura 25. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. fortuitum</i> , empleando los agentes químicos HPC 0,75%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico al 6%.	62
Figura 26. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para <i>M. fortuitum</i> por siembra en placa de agar y citometría de flujo.	63
Figura 27. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo) y células vivas marcadas con FDA (control positivo).	65
Figura 28. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra, empleando el agente descontaminante NaOH al 2% y 4%.	66
Figura 29. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra, empleando los agentes químicos HPC 0,75%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico al 6%.	67
Figura 30. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra por siembra en placa de agar y citometría de flujo.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

CMB: Concentración mínima bactericida

CMF: Citometría de flujo

FDA: 3',6'-fluoresceína diacetil

HPC: Cloruro de Hexadecil Piridinium

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

mAGP: arabinogalactano-peptidoglicano

NaOH: Hidróxido de sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

QACs: Compuestos de Amonio Cuaternario

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

UFR: Unidades de Fluorescencia Relativa

Resumen

En el diagnóstico de las infecciones producidas por micobacterias, el cultivo de las muestras es necesario, ya que permite identificar la especie que está causando el cuadro clínico; por esta razón el agente descontaminante empleado es fundamental en la eliminación de la flora bacteriana asociada a las micobacterias. Tradicionalmente, la susceptibilidad de las micobacterias a desinfectantes y antisépticos ha sido objeto de estudio con base en su estructura celular, composición y fisiología, caracterizándose principalmente por su resistencia a compuestos de amonio cuaternario. Hoy en día se conoce que algunos agentes descontaminantes tienen efectos tóxicos sobre las micobacterias por lo que puede verse alterada su recuperación. Es por ello que en el presente trabajo se evaluaron diferentes descontaminantes con el fin de estimar cual agente proporciona el mayor porcentaje de recuperación (HPC al 0.75%, NaOH al 2% y 4%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico 6%), comparando un grupo de aislados clínicos de especies representativas del género *Mycobacterium* (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. tuberculosis H37Ra.*, *M. abscessus*). Para tal fin fueron comparadas la metodología de siembra en placas de agar, citometría de flujo y fluorimetría, estas dos últimas técnicas se fundamentaron en la hidrólisis del FDA a fluoresceína.

Los resultados obtenidos por la metodología de siembra en placas de agar demuestran que existe una variable sensibilidad de las micobacterias estudiadas ante los agentes químicos descontaminantes, siendo el HPC al 0.75% el agente químico que mostró un mayor porcentaje de recuperación para todas las especies evaluadas; mientras que el NaOH 2% y 4%, y el ácido sulfúrico al 6% demostraron ser los agentes con menores porcentajes de recuperación, comprometiendo seriamente la viabilidad de las micobacterias ensayadas. Por otra parte, la metodología de fluorimetría sumado a la tinción con FDA se presenta como una alternativa rápida para la estimación de la viabilidad celular en micobacterias, ya que permite reducir el tiempo de diagnóstico a tan solo 4 horas, no siendo estadísticamente significativo la diferencia entre los valores obtenidos por siembra en placas de agar y análisis de fluorimetría, lo que constituye un gran avance sobre la investigación de estos microorganismos. En contraste, la citometría de flujo revelo grandes discrepancias con la metodología de siembra en placas de agar, por tanto el uso de esta técnica no se presenta como una herramienta útil para la estimación de viabilidad celular.

INTRODUCCIÓN

En términos generales el género *Mycobacterium* está formado por bacilos aerobios inmóviles, con un tamaño de 0,2 a 0,6 μm de ancho y 1 a 10 μm de largo. La mayoría de las micobacterias son organismos prototróficos para todos los aminoácidos, las bases purínicas, pirimidínicas y para las vitaminas del complejo B. Satisfacen sus requerimientos energéticos por la oxidación completa de la glucosa a dióxido de carbono y agua, adicionalmente necesitan ión amonio como fuente de nitrógeno (Yeboah-Manu, D. y col., 2004). Sólo algunas especies (*Mycobacterium genavense* o *Mycobacterium haemophilum*) necesitan suplementos especiales como micobactina, hemina u otros componentes férricos. Por otro lado, el crecimiento de las micobacterias se ve estimulado por la presencia de CO_2 y ácidos grasos (Fernández y col., 1999).

La pared micobacteriana posee un elevado contenido de lípidos que se ubica entre el 50 y 60%, y se caracterizan por ser excepcionalmente complejos, altamente hidrofóbicos y refractarios al ataque hidrolítico por parte de enzimas celulares. Adicionalmente, se ha propuesto la existencia de un componente externo de naturaleza cerosa. Dicha pared está constituida por un complejo macromolecular integrado por ácidos micólicos, arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) y otros poliglicolípidos, los cuales están unidos covalentemente (Casal col., 2003). Todas las características antes descritas, le confieren a la bacteria baja permeabilidad, representando una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales (Figura 1).

Los ácidos micólicos se ubican en la capa más externa de la pared celular y representan el principal constituyente de este complejo de macromoléculas. Estos ácidos tienen de 70- 80 carbonos ramificados que además, se estructuran formando una capa lipídica similar a la membrana externa clásica de cualquier microorganismo Gram negativo y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la

envoltura (Steck y col., 1978). Los ácidos micólicos beta-hidroxiácidos están esterificados con el arabinogalactán (componente medio), un polímero formado por residuos D-galactofuranosil y D-arabinofuranosil. El arabinogalactán se conecta con el peptidoglicano, 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 peptidoglicano, junto a moléculas de N-acetilglucosamida y ácido-N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina, esta capa es el esqueleto de las bacterias que le da forma y rigidez (Casal y col., 2003).

Por su parte, la membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana. Está compuesta fundamentalmente por fosfolípidos (20- 30%) y proteínas (50- 70%). Los fosfolípidos forman una bicapa con los grupos polares (hidrófilos) hacia afuera y la parte no polar (hidrofóbica) hacia adentro. Estos fosfolípidos de la membrana la hacen fluida, permitiendo que las proteínas que se encuentran inmersas dentro de esta capa, se muevan lateralmente en el mosaico de moléculas de lípidos (Casal y col., 2003).

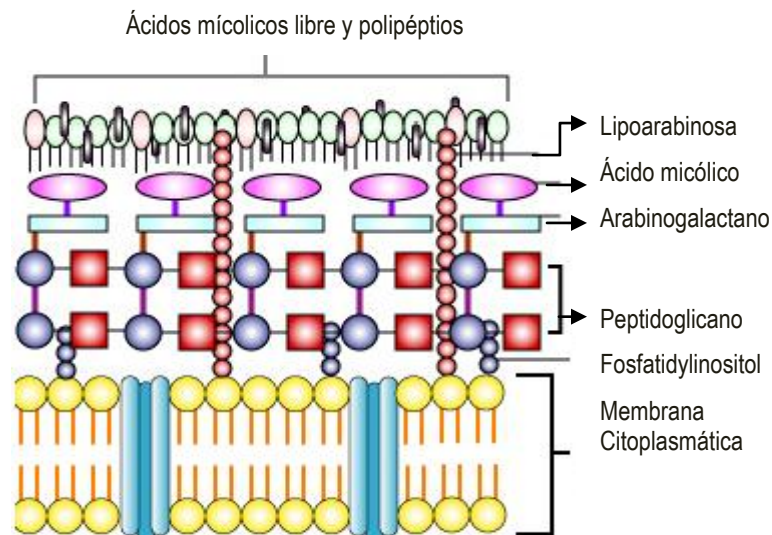


Figura 1: Estructura de la pared celular de un bacilo ácido resistente.
 Tomado de <http://www.cat.cc.md.us/bio14/lecguide/unit/prostruct/u1fi11.html>.
 (Consultado: 3 de Octubre de 2009)

En la actualidad se han identificado aproximadamente 100 especies de micobacterias, muchas de las cuales están asociadas a enfermedades en el ser humano (Casal y col., 2003). La clasificación de las micobacterias propuesta por Runyon (1959), desde el punto de vista microbiológico, agrupa a las micobacterias en seis grandes grupos según la velocidad de crecimiento y pigmentación (Tabla 1). Dentro de esta clasificación se consideran como fotocromógenas a aquellas micobacterias capaces de producir pigmentos en presencia de luz, mientras que las escotocromógenas son aquellas caracterizadas por la producción de pigmentos en la ausencia de luz y por último se encuentran las no cromógenas que no producen pigmento (Korman y col., 1997).

Tabla 1: Clasificación de las micobacterias según Runyon 1959. Tomado de Casal y col. 1999

<u>Grupos de crecimiento lento</u>	Grupo I Fotocromógenas	Grupo II Escotocromógenas	Grupo III No cromógenas
	<i>M. kansasii</i>	a) Pigmento rosa-rojo: <i>M. lactis</i>	<i>M. avium</i>
	<i>M. asiaticum</i>	b) Pigmento amarillo-naranja: <i>M. gordonae</i>	<i>M. intracellulare</i>
	<i>M. intermedium</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. gastri</i>
	<i>M. marinum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. terrae</i>
		<i>M. szulgai</i>	<i>M. triviale</i>
		c) Pigmento irregular <i>M. xenopi</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
		<i>M. simiae</i>	<i>M. malmoense</i>
		<i>M. ulcerans</i>	<i>M. haemophilum</i>
			<i>M. shimoides</i>
			<i>M. celatum</i>
			<i>M. interjectum</i>
			<i>M. branderi</i>
			<i>M. genavense</i>
<hr/>			
<u>Grupos de crecimiento rápido</u>	Grupo IV Fotocromógenas	Grupo V Escotocromógenas	Grupo VI No cromógenas
	<i>M. novocastrense</i>	a) Pigmento rosa-rojo: <i>M. engbaecki</i>	<i>M. fallax</i>
		b) Pigmento amarillo-naranja: <i>M. acapulcense</i>	<i>M. fortuitum</i>
		<i>M. aurum</i>	<i>M. chelonae</i>
		<i>M. duvalii</i>	<i>M. abscessus</i>
		<i>M. gadium</i>	<i>M. agri</i>
		<i>M. neoaurum</i>	<i>M. chitae</i>
		<i>M. gilvum</i>	<i>M. moriokaiense</i>
		<i>M. obuense</i>	<i>M. confluentis</i>
		<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. mucogenicum</i>
		<i>M. aichiense</i>	
		<i>M. chubuense</i>	
		<i>M. tokaiense</i>	
		c) Pigmento irregular <i>M. phlei</i>	
		<i>M. vaccae</i>	
		<i>M. thermoresistibile</i>	
		<i>M. smegmatis</i>	
		<i>M. austroafricanum</i>	

No se incluyen en esta clasificación especies que no suelen aislarse de productos patológicos humanos, sino ambientales como: *M. alvei*, *M. brumae*, *M. chlorophenicum*, *M. farcinogenes*, *M. hiberniae*, *M. holderi*, *M. komosense*, *M. lepraemurium*, *M. madagascariense*, *M. mageritense*, *M. microti*, *M. porcium*, *M. poriferae*, *M. pulveris*, *M. senegalense*, *M. sphagni*.

En la actualidad, ante la incesante identificación de nuevas especies con diferentes características fenotípicas, se opta por realizar una identificación a nivel de especie, por lo cual se establecen tres grupos en función de las patologías que éstas producen: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, Complejo *Mycobacterium leprae* y Micobacterias atípicas (Casal y col., 2000).

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* está constituido por agentes patógenos que incluyen especies estrechamente relacionadas entre sí, las cuales muestran 99% de homología en su molécula de ADN, caracterizándose principalmente por ser agentes patógenos de crecimiento lento (Casal y Casal, 2000). Este complejo comprende aquellas micobacterias capaces de causar tuberculosis como: *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluyendo el bacilo de Calmete-Guerin utilizado en la vacunación), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. mungi*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. microtti* (productor de tuberculosis en ratones) (Alexander y col., 2010).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa prevenible y curable que se transmite por el aire. Los pacientes con TB activa cuyos pulmones albergan bacilos que pueden contagiar a otras personas cuando tosen. En 2005 8,8 millones de personas contrajeron la enfermedad, y de éstas, 1,6 millones fallecieron. Cuando un paciente infectado con TB es diagnosticado pronto y recibe un tratamiento completo, deja rápidamente de ser contagiosos y termina curándose (<http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/>).

Complejo *Mycobacterium leprae*

En este complejo se incluyen las especies *M. leprae*, causante de la lepra humana, y *M. lepraemurium*, agente causal de la lepra en roedores (Casal y Casal, 2000).

Micobacterias Atípicas

Las micobacterias atípicas incluyen a todas aquellas especies del género *Mycobacterium* distintas de *M. tuberculosis* y *M. leprae*. (Casal y Casal, 2000).

En la infección por micobacterias atípicas, la transmisión de persona a persona es rara, siendo el mecanismo más aceptado, la aerosolización de microorganismos al medio ambiente y su posterior ingestión por vía digestiva, en el caso de la linfadenitis en niños y en las formas diseminadas de los pacientes con SIDA (Casal y Casal, 2000).

En las últimas décadas, el estudio de las micobacterias atípicas ha cobrado relevancia debido al aumento en el número de aislamientos asociados a enfermedades a nivel mundial. Un hecho importante que en los últimos tiempos ha captado la atención de los investigadores es el aumento de brotes registrados en infecciones de la piel y tejidos blandos, que relacionan a las micobacterias no tuberculosas con procedimientos cosmetológicos, reportados en países como Colombia, Estados Unidos y Venezuela (Bello y col., 2004).

Diagnóstico del género *Mycobacterium*

La presencia de micobacterias en las muestras de interés se puede determinar en un primer paso, mediante la observación microscópica (baciloscopía). El fundamento de la técnica se basa en la propiedad ácido resistente que presentan las micobacterias, la cual no es privativa de ellas, dado que también aparece en algunos otros microorganismos (Liu y col., 1999).

Las micobacterias presentan una coloración irregular frente a la tinción Gram, motivo por el cual se emplean otras técnicas alternativas que permiten una

coloración homogénea y diferencial de la mayoría de las bacterias, entre las que podemos mencionar la tinción de Ziehl-Neelsen, la tinción de Kinyoun y la tinción con Auramina – Rodamina, de las cuales la tinción Ziehl-Neelsen y la tinción de Kinyoun se basan en la aplicación de calor o aumento en el tiempo de contacto entre la muestra y la fucsina, con la finalidad de lograr una penetración profunda en la pared micobacteriana, generando un complejo molecular producto de la interacción de estos dos componentes, que genera una mayor resistencia a la acción decolorante de una solución ácido-alcohólica, los bacilos se muestran de color fucsia con un fondo azul (generado por el azul de metileno). Por otro lado, la tinción de auramina – rodamina se fundamenta en la alta afinidad que tienen los ácidos micólicos de la pared celular de las micobacterias con los fluorocromos auramina y rodamina. Tras la tinción, los microorganismos son observados en un microscopio de fluorescencia presentándose como puntos amarillos o amarillo-verdosos brillantes sobre fondo negro (Liu y col., 1999).

Métodos de descontaminación empleados para el aislamiento de Micobacterias.

Uno de los pasos fundamentales en el tratamiento de las muestras para el diagnóstico de las infecciones causadas por micobacterias, es el proceso de descontaminación, cuyo objetivo es reducir el sobrecrecimiento bacteriano no deseado en muestras que contengan una flora bacteriana mixta (Konemam, 1999). Se ha demostrado que si el procedimiento no es llevado de forma cuidadosa, los agentes químicos empleados pueden ser tóxicos para las micobacterias afectando de esa manera el resultado (falso negativo), y si el procedimiento no es efectivo se da lugar a un sobrecrecimiento de la flora asociada (Ratnam y col., 1987).

Tomando en cuenta estas características se han desarrollado una serie de metodologías que emplean agentes químicos descontaminantes fundamentados en procesos alcalinos, ácidos y por último en amonios cuaternarios. Entre los que encontramos:

a) Método de Petroff:

Este es el método más difundido en el mundo entero y recomendado por la OMS, en especial en países en vías de desarrollo donde la tuberculosis es prevalente, su inoculación se realiza en medios a base de huevos con pH cercano al neutro (pH=7) (Kleeberg, 1980).

Esta metodología emplea una solución de hidróxido de sodio al 4%, que tiene propiedades mucolíticas y descontaminantes. Al tratarse de un procedimiento alcalino muy potente, resulta crítica la concentración empleada, así como el tiempo de incubación. Una descontaminación agresiva es capaz de eliminar de 20 a 90% de las micobacterias presentes en una muestra clínica (Kleeberg, 1980).

Una de las desventajas de este método consiste en la necesidad de una centrífuga para el procesamiento de las muestras lo que limita su uso en trabajos de campo y a la vez, limita el número de muestras que pueden ser procesadas al mismo tiempo, ya que el mismo dependerá de la capacidad que posea la centrífuga (Kleeberg, 1980).

b) Método de N-acetil-L-Cisteína - NaOH:

La N-acetil-L-Cisteína es un agente mucolítico que puede digerir rápidamente el esputo liberando las micobacterias presentes, esta metodología permite trabajar con concentraciones de hidróxido de sodio más bajas cuando se utilizan de forma conjunta. La combinación N-acetil-L-Cisteína con NaOH al 2%, es el método de descontaminación – digestión más difundido en el mundo (Narváez y col., 1998).

Este método aunque representa una menor toxicidad para las micobacterias por cuanto la concentración del hidróxido de sodio es menor, presenta las mismas desventajas que el método de Petroff en el procedimiento de centrifugación (Narváez y col., 1998).

c) Método de Kudoh:

Se han desarrollado y evaluado varias modificaciones del Método de Petroff se encuentra el método de Kudoh, que aunque puedan resultar menos eficientes en laboratorios muy bien equipados y con alto presupuesto, son muy útiles para situaciones en las que es necesario establecer el cultivo en laboratorios con estufa de incubación pero sin centrífuga adecuada, muchas veces sin área de contención de las actividades de mayor riesgo y con difícil acceso a un laboratorio de referencia (Sisco y col., 2006).

En esta técnica se emplea una solución de hidróxido de sodio al 4% como agente descontaminante y mucolítico, al igual que en el método de Petroff. La diferencia radica en que en este método no se emplea la centrifugación de la muestra con el descontaminante, sino el contacto de la muestra y el descontaminante a través de un hisopo estéril durante dos minutos (Manual de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2004).

d) Método de Ácido Oxálico 5%:

Cuando la descontaminación por métodos alcalinos no es posible en muestras de esputo, se recurre al método del ácido oxálico al 5%. La desventaja que presenta esta metodología es la baja recuperación de micobacterias (Narváez y col., 1998).

Su mecanismo de acción 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 la concentración de hidrógeno afecta el estado iónico de las enzimas en la

membrana, que regulan el tamaño y la variación del flujo de protones (Brown y Mayes, 1980).

La técnica mezcla volúmenes iguales de ácido oxálico (5%) y de muestras de esputo durante un período de 15 minutos, posteriormente se somete a un proceso de centrifugación y neutralización empleando una solución de NaOH 4% estéril que contiene rojo de fenol como indicador de pH (Manual de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, 2004).

e) Método de Ácido Sulfúrico 6%:

Aunque su uso no es universal, en el año 2005 se reportó que el método de descontaminación con ácido sulfúrico permite mayor recuperación de micobacterias no tuberculosas de muestras clínicas que el método de N-acetil-L-Cisteína - NaOH (Buijtels y Petit, 2005).

Al igual que el ácido oxálico, el ácido sulfúrico tiene efectos sobre algunas proteínas de membrana presentes en las bacterias, generando una alteración en su potencial químico, desencadenando una pérdida en la integridad física de la pared celular. En cuanto a su metodología se emplea de manera similar a la del ácido oxálico, descrita anteriormente (Brown y Mayes, 1980).

f) Métodos que emplean Compuestos de Amonio Cuaternario (QACs):

Desde 1935, fecha en la que se desarrollaron estos compuestos, se ha visto que los QACs son mucho más eficaces en la prevención del crecimiento de las bacterias (bacteriostáticos) que en su destrucción. Además, son más efectivos frente a las bacterias Gram positivas, y su efecto es eficiente sobre bacterias y virus. Los QACs son considerados desinfectantes de bajo nivel, pueden ser esporostáticos, pero no son esporicidas (Ahlstrom y col., 1999).

Los compuestos de amonio cuaternario son surfactantes y poseen dos regiones en su estructura molecular, una hidrofóbica y otra hidrofílica.

Dependiendo de la carga o la ausencia de ionización del grupo hidrofílico, los agentes se clasifican en catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros. Los compuestos de amonio cuaternario están dentro del grupo de los agentes catiónicos. Son los más útiles como antisépticos y desinfectantes, y es por ello que se han utilizado para una variedad de propósitos clínicos (Ahlstrom y col., 1999). Estos compuestos catiónicos actúan en la adsorción y penetración del agente en la pared de la célula, donde reaccionan con la membrana citoplasmática y ocurre una desorganización provocando la fuga de material de bajo peso molecular seguido con la degradación de proteínas y ácidos nucleicos para provocar la lisis de la pared celular (Ahlstrom y col., 1999).

Estos compuestos no son micobactericidas, pero tienen una acción micobacteriostática, aunque el efecto real sobre las micobacterias ha sido poco estudiado (McDonnell y Russell, 1999).

Medios de cultivo empleados para el crecimiento de micobacterias

Entre los medios más utilizados para el crecimiento de micobacterias se encuentran los elaborados a base de huevo, que requieren de un proceso de coagulación para su elaboración. Estos son medios ricos que garantizan el crecimiento de la mayoría de las micobacterias. Los mismos contienen un inhibidor para el crecimiento de la flora asociada, que generalmente es un colorante de anilina (verde de malaquita), tienen una larga vida si se guardan refrigerados y resisten a la desecación durante largos períodos de tiempo. Adicionalmente, su alto contenido de fosfolípidos permite neutralizar las sustancias empleadas como agentes descontaminantes, tales como, el hidróxido de sodio y los compuestos de amonio cuaternario (Kleeberg, 1980). Entre los medios a base de huevo se pueden destacar el medio Lowenstein – Jensen, el medio Ogawa y por último el medio Stonebrik.

Por otro lado, se encuentran los medios elaborados a base de agar como medio Middlebrook 7H10 y 7H11. Presentan la ventaja de no necesitar un proceso

de coagulación, por lo que su preparación es más sencilla y se pueden alcanzar concentraciones exactas de antibióticos para las pruebas de susceptibilidad. Entre sus desventajas se encuentra que son más susceptibles a la desecación durante largos períodos de incubación (Casal y col., 1999).

En cuanto a los medios líquidos, se puede mencionar que representan la forma de cultivo con mejor tasa de crecimiento en relación a los medios anteriormente descritos para micobacterias. Tienen la desventaja de no permitir visualizar la morfología de la colonia ni valorar los posibles cultivos mixtos. Entre los más utilizados se encuentra el Medio 7H9 de Middlebrook, que puede ser empleado para subcultivos de micobacterias, pruebas de identificación bioquímica y en la preparación del inoculó para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, entre otros (Casal y col., 1999).

Si bien estos medios de cultivos son los que están descritos en la literatura para el aislamiento de micobacterias, estas pueden crecer en medios nutritivos, como tripticasa de soya, entre otros (Sisco y col, 2006).

Identificación del género *Mycobacterium* empleando la técnica “análisis con enzimas de restricción del polimorfismo del gen *hsp65* (PRA)”.

En la actualidad, la identificación molecular parece ser la mejor alternativa para la identificación de las especies de micobacterias de forma precisa y rápida. Es por ello que Telenti y col. (1993), desarrollaron una técnica basada en la amplificación por PCR del gen *hsp65*, el cual codifica para una proteína de choque térmico (65 kDa) que contiene epitopes únicos y también comunes en varias especies de micobacterias (Schinnick, 1987).

Este método molecular amplifica, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un segmento de 439 pb del gen *hsp65*. El producto amplificado es digerido con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, y la interpretación de los patrones de restricción obtenidos por electroforesis en gel de agarosa, se realizan

por la observación de los algoritmos disponibles en <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> (Telenti y col. 1993).

Metodologías empleadas para evaluar la eficacia de los desinfectantes sobre las micobacterias

Método de suspensión:

En este método los microorganismos son suspendidos en una solución, a la cual se le adiciona posteriormente el desinfectante, luego de un tiempo determinado de contacto, se realiza una dilución de la mezcla y se inocula en un medio de cultivo adecuado para determinar el nivel bactericida del desinfectante (Bello y col., 2004).

Este método ha sido modificado, y actualmente se utiliza una solución neutralizante para detener la acción del desinfectante y poder evaluar su acción durante un tiempo requerido. Es uno de los procedimientos del tipo *in vitro* utilizados en la valoración de la actividad de un antiséptico o desinfectante en su función de eliminación de microorganismos patógenos. El principio básico es determinar la concentración mínima bactericida (CMB), que es la mínima concentración de desinfectante ensayada capaz de reducir en 5 unidades logarítmicas (10^{-5}) una suspensión de bacterias en 20 minutos de contacto con el desinfectante a 37° C (Bello y col., 2004).

Posterior al tratamiento, es necesario determinar la cantidad de células presentes en la muestra y es por ello que se han desarrollado una serie de metodologías para tal fin, entre las que podemos mencionar:

a) Ensayo de recuento de colonias en placas:

Esta técnica se fundamenta en la observación de colonias aisladas, permitiendo estimar el número de bacterias presentes en la muestra sembrada.

Para que el sistema de recuento en placa tenga validez estadística, es necesario contar entre 30 y 300 colonias, con objeto de disminuir el error de la medida. (Mcbain y col., 2004).

b) Ensayo colorimétrico con 3',6'-fluoresceína diacetil (FDA):

En el ensayo colorimétrico, el FDA se utiliza como indicador de crecimiento y viabilidad celular. El método se basa en la capacidad de las bacterias de incorporar FDA, originándose posteriormente su hidrólisis en fluoresceína libre por la acción de esterasas intrínsecas en aquellas bacterias cuya integridad permanezca. A medida que la fluoresceína se acumula en las células, pueden ser fácilmente detectadas por citometría de flujo y fluorimetría. Por el contrario, las células muertas o inhibidas por antimicobacterianos hidrolizan menor cantidad de FDA en relación a las células viables (Bownds y col., 1996).

Citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF) es un método de análisis automatizado en el que células individuales, u otras partículas biológicas, inmersas en una corriente de fluidos, son sometidas a un haz lumínico y examinadas por sensores, que miden sus características físicas o químicas. Así, pueden estudiarse grandes poblaciones celulares midiendo su contenido en ácidos nucleicos, su actividad enzimática, su cinética celular y adicionalmente permite determinar subpoblaciones por la detección de antígenos de superficie, granularidad, entre otros. Todo ello proporciona una confirmación objetiva de los datos morfológicos que tienen significación diagnóstica y pronóstica en muchos casos (Pumarola y col., 2005).

Algunas de las aplicaciones clínicas específicas de la CMF incluyen la determinación de subpoblaciones linfocitarias, la detección de anticuerpos antiplaquetas, el análisis de receptores hormonales, análisis del contenido en ADN-ARN y la estimación de la viabilidad celular. A su desarrollo han contribuido numerosos campos de la ciencia, como la hidrodinámica, la óptica, los

ordenadores de alta velocidad, la gran disponibilidad de fluorocromos y la producción de Anticuerpos Monoclonales (Pumarola y col., 2005).

Fluorimetría

Se fundamenta en las propiedades de algunos compuestos de emitir fluorescencia al incidir radiaciones electromagnéticas de longitud de onda adecuada sobre las moléculas orgánicas originando una transición desde el estado electrónico fundamental hasta un estado electrónico excitado (Pumarola y col., 2005).

En la fluorimetría el análisis automatizado se realiza a través del fluorómetro donde las longitudes de onda de excitación y de emisión se escogen con filtros de absorción o de interferencia. Un fluorómetro de filtro generalmente consta de una lámpara de mercurio como fuente de excitación y un filtro primario para transmitir la longitud de onda excitacional deseada (Pumarola y col., 2005).

ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de las micobacterias, se ha considerado el cultivo como la técnica estándar para la detección de *M. tuberculosis*, pero la mayoría de las muestras de esputo contienen una variedad de microorganismos que impiden el crecimiento de esta especie. Es por esta razón que la descontaminación de las muestras es crucial en los cultivos. Sin embargo, la recuperación de micobacterias es afectada negativamente por la descontaminación, y por ello se ha realizado una serie de trabajos con la finalidad de dilucidar las técnicas de descontaminación más viable para distintas especies de micobacterias.

Sisco y col. (2006), evaluaron la recuperación de cepas de micobacterias no tuberculosas (*M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. marinum*) utilizando Ácido oxálico al 5%, cloruro de hexadecilpiridina (HPC) 0.75% e hidróxido de sodio (NaOH) al 2% y 4%. Sus resultados mostraron un mayor porcentaje de recuperación empleando el agente desinfectante HPC en relación a los demás agentes estudiados, demostrando así que el Ácido Oxálico y el Hidróxido de sodio comprometen seriamente la recuperación de dichas micobacterias, por lo cual su uso y tiempo de incubación debe ser estrictamente controlados.

Buijtels y Petit (2005), compararon el método de descontaminación con N-acetil-L-cisteína-NaOH y el procedimiento con ácido sulfúrico en la detección de micobacterias. De un total de 219 muestras de esputo recogidas de 142 pacientes, la mitad de las muestras fueron tratadas con N-acetil-L-cisteína-NaOH y la otra mitad con ácido sulfúrico. De los 146 cultivos positivos para micobacterias recuperadas después de la descontaminación con ácido sulfúrico, 28 fueron *M. tuberculosis*, 84 micobacterias atípicas (MNT) y 34 bacterias ácido resistentes de crecimiento rápido que no pudieron ser identificadas a nivel de especie; en

comparación con el método de N-acetil-L-cisteína-NaOH, se recuperaron 115 cultivos de micobacterias que consistieron en 34 cepas de *M. tuberculosis*, 55 NTM y 26 de las bacterias ácido resistentes de crecimiento rápido que no pudieron ser identificados. Esto resultados los llevó a la conclusión de que el método alcalino N-acetil-L-cisteína-NaOH en relación al método ácido sulfúrico, no representa diferencias significativas en la recuperación de *M. tuberculosis*, mientras que el método alcalino N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio es menos eficaz en comparación al procedimiento con ácido sulfúrico en la obtención de micobacterias no tuberculosas.

Yeboah y col. (2004), evaluaron diferentes métodos de descontaminación (método de Petroff, método de N-acetil-L-cisteína-NaOH y el método de ácido oxálico), en combinación con cuatro medios de cultivo, todos con base en huevo, para el aislamiento primario de *M. ulcerans* a partir de muestras de tejido blando. Los investigadores concluyen que con el método del ácido oxálico se obtiene un porcentaje de recuperación superior en relación con los otros descontaminantes valorados, siendo favorecido este procedimiento por la utilización de medio Lowenstein-Jensen suplementado con glicerol.

Ratnam y col. (1987), describieron un procedimiento alcalino con N-acetil-L-cisteína-NaOH que combina los pasos de la descontaminación, concentración y la inoculación de muestras en medios de cultivos selectivos. De acuerdo con estos autores, la mayor muerte de micobacterias ocurre durante los primeros minutos de exposición al descontaminante. Ellos observaron que la tolerancia al álcali no era una característica constante; este efecto puede ser de hasta 10^4 células/mL, entre las especies de micobacterias, siendo las especies de crecimiento rápido (*M. fortuitum* y *M. Chelonae*) las más susceptibles al pH alcalino. Adicionalmente observaron que al reducir el tiempo de contacto de la muestra con la solución alcalina y la concentración de NaOH, aumentaba la recuperación de este tipo de micobacterias.

Recientemente, la aplicación de los compuestos de amonio cuaternario en el proceso de descontaminación de micobacterias ha cobrado gran auge en función de su menor susceptibilidad ante este tipo de compuestos.

Smithwick y col. (1975), trabajando con muestras de esputo, demostraron que después de 8 días de exposición con una solución de Cloruro de Cetilpiridina al 1% (también conocido como Cloruro de Hexadecilpiridina) y Cloruro de Sodio al 2% en volúmenes iguales, permanecían viables muestras con bacilos tuberculosos, por lo que es evidente la resistencia de dicha especie a estos compuestos. En esta investigación se plantean que la recuperación de micobacterias atípicas, al emplear esta solución para la descontaminación de muestras de esputo, era mayor en comparación con el método que emplea N-acetil- L- cisteína- NaOH, por tanto ellos concluyeron que los compuestos de amonio cuaternario constituyen una alternativa en los procesos de descontaminación para la recuperación de bacilos tuberculosos en muestras de esputo que deben ser transportadas por más de 24 horas.

Thornton y col (1998), compararon el método que emplea C₁₈ – carboxipropilbetaina (CB-18) con respecto al método N-acetil-L-cisteína-NaOH con tween 80, encontrando que el porcentaje de recuperación para el método N-acetil-L-cisteína-NaOH se encontraba en promedio alrededor de 20% para bacilos tuberculosos, mientras que para micobacterias atípicas se ubicó en un promedio de 11%. En contraste, con el CB-18 se obtuvo un promedio de recuperación de *M. tuberculosis* de 58% y de 65% para micobacterias no tuberculosas, concluyendo de esta manera que el aislamiento de micobacterias se ve favorecido por el uso de compuestos de amonio cuaternario.

Bownds y col. (1996), emplearon las micobacterias atípicas *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. marinum*, en pruebas de susceptibilidad. Para ello utilizaron los antibióticos ciprofloxacina, claritromicina, eritromicina, kanamicina, rifampicina y tobramicina, encontraron que es posible evaluar viabilidad celular en micobacterias, en un lapso de 6 a 24 horas después del inicio de los ensayos de

susceptibilidad mediante el uso de citometría de flujo, empleando una tinción con 3',6'-fluoresceína diacetil (FDA).

Bownds y col (1996), ante la necesidad de determinar métodos alternativos para estimar viabilidad celular, posterior a un proceso de descontaminación, desarrollaron una metodología para determinar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* ante agentes antimicobacterianos. Estos autores demostraron que las pruebas de susceptibilidad de *M. tuberculosis* se pueden lograr rápidamente mediante el uso de citometría de flujo. Los resultados de estas pruebas se encuentran disponibles en un período de 24 horas.

Burdz y col. (2003) emplearon diferentes sistemas de descontaminación para la recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra. Para ello, utilizaron muestras de esputo y otros microorganismos constituyentes de la flora que generalmente está asociada a este tipo de muestras, valiéndose para ello de técnicas de siembra en placa y citometría de flujo. Se valoraron el N-acetil-L-cisteína-NaOH, el método de Petroff y el procedimiento de Yamane, que constituye una variante del método de Petroff que no requiere del proceso de centrifugación. Varios de los parámetros del método N-acetil-L-cisteína-NaOH fueron analizados, incluyendo concentraciones de NaOH final de 0,5 - 3% y los tiempos de exposición de NaOH (de 0 a 30 minutos). Estos investigadores concluyeron que ningún método de descontaminación fue significativamente superior a otro. Sin embargo, una concentración de 1 - 2% de NaOH y un incremento en el tiempo de exposición a este compuesto hasta 30 min, efectivamente elimina a las bacterias contaminantes asociadas a las muestras de esputo, sin afectar significativamente la viabilidad de *M. tuberculosis* H37Ra.

JUSTIFICACIÓN

En el diagnóstico de las infecciones producidas por micobacterias, es necesario el cultivo de las muestras, ya que permite dar a conocer al laboratorio que especie está causando el cuadro clínico, con lo cual se podrán llevar a cabo pruebas de susceptibilidad antimicrobiana que permitan darle al paciente el tratamiento apropiado para su curación.

Para realizar el cultivo, la descontaminación es un paso esencial. Gran parte de los métodos de descontaminación empleados por la mayoría de los laboratorios, utilizan diversos agentes químicos, entre ellos álcalis, ácidos y compuestos de amonio cuaternario, que eliminan la flora asociada y comprometen también la viabilidad de las micobacterias presentes, por lo que el tiempo de exposición, pH y la concentración del agente descontaminante deben ser estrictamente regulados a fin de poder obtener la máxima recuperación posible. Para ello es necesario emplear un agente que logre un equilibrio con una mínima tasa de contaminación en los cultivos pero que permita también una recuperación óptima de micobacterias.

Numerosas investigaciones, han aportado información sobre diferentes metodologías que han permitido la valoración de la viabilidad celular en especies de micobacterias, siendo empleada la metodología de siembra en placa con agar como el estándar de referencia por la mayoría de los estudios, presentando esta última metodología la desventaja de requerir un lapso de 4 a 12 días para arrojar un resultado. Por otra parte, sólo algunos trabajos de investigación, se han centrado en la valoración del porcentaje de recuperación por metodologías rápidas, que permiten obtener un resultado en un periodo inferior a 24 horas, entre los que podemos mencionar la metodología de citometría de flujo, por tal motivo,

es relevante estandarizar nuevas técnicas que permitan estimar el porcentaje de recuperación en especies de micobacterias.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Comparar el efecto de diferentes agentes químicos descontaminantes para la recuperación de micobacterias previamente aisladas de muestras clínicas.

Objetivos específicos:

- Estandarizar metodologías para la estimación adecuada del porcentaje de recuperación en cepas de micobacterias, utilizando: citometría de flujo y recuento de colonias en placas de agar.
- Determinar el porcentaje de recuperación de: *M. fortuitum*, *M. tuberculosis* H37Ra y *M. abscessus*, utilizando diferentes agentes químicos descontaminantes.
- Realizar análisis estadísticos para estimar variaciones causadas por los agentes químicos en el porcentaje de recuperación en cepas de micobacterias.

MARCO METODOLÓGICO

Material biológico:

Para llevar a cabo este trabajo se emplearon cepas de micobacterias atípicas que corresponden a aislados clínicos de pacientes que asistieron al Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, mientras que la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra es una cepa no virulenta empleada como referencia a nivel mundial. (Tabla 2)

Tabla 2. Micobacterias empleadas para la estimación del efecto causado por diferentes agentes descontaminantes.

Micobacteria	Tiempo de crecimiento	Código de referencia
<i>M. fortuitum</i>	Rápido	LTF 4045
<i>M. abscessus</i>	Rápido	LTC 1624
<i>M. chelonae</i>	Rápido	LTC 1590
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	Lento	63C4

Agentes descontaminantes evaluados:

Para el presente estudio se emplearon diferentes agentes descontaminantes representados en concentraciones finales, los cuales son empleados en el aislamiento de micobacterias:

- Solución de NaOH al 2%
- Solución de NaOH al 4%
- Solución de Ácido Oxálico al 5%
- Solución de Ácido Sulfúrico al 6%
- Solución de HPC al 0.75%

Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo:

Se tomó un inoculó bacteriano (cuatro azadas) y se resuspendió en 12 mL de solución salina (NaCl) al 0,85% en un tubo cónico de 15 mL. Seguidamente, se agitó utilizando un vórtex con perlas de vidrio estériles hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, se ajustó la suspensión a una densidad

óptica igual a uno a 600nm, lo que equivale a 10^9 células/mL, de acuerdo a estimaciones previas realizadas en el laboratorio con la metodología de siembra en placas con agar y estimación de la hidrólisis del FDA por citometría de flujo. Por otra parte, para la metodología de estimación de la hidrólisis del FDA, por análisis de fluorimetría, se requirió un ajuste de la suspensión bacteria a una densidad óptica igual a dos a 600nm, lo que equivale a 2×10^9 células/mL.

Protocolo de descontaminación:

En un tubo cónico se mezclaron por separado a volúmenes iguales (1 mL) la suspensión bacteriana de trabajo con los diferentes agentes descontaminante en estudio, seguidamente se agitó e incubó la suspensión durante 20 y 40 minutos a temperatura ambiente. Como control bacteriano se mezclaron volúmenes iguales (1 mL) de la suspensión bacteriana de trabajo y agua con la finalidad de determinar el título de la suspensión inicial.

➤ Metodología de siembra en placas con agar:

Transcurrido el tiempo de incubación con el agente descontaminante, se agitaron por separado los tubos tratados con los agentes descontaminantes y la suspensión bacteriana control utilizando un vórtex. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en caldo de tripticasa de soya con la finalidad de determinar el título bacteriano, desde 10^{-1} a 10^{-7} . Finalmente, se agitaron en el vórtex cada una de las diluciones y se tomaron 20 μ L de cada una sembrando por duplicado en placas de agar tripticasa de soya cuando se emplearon micobacterias atípicas y medio Lowenstein-Jensen para *M. tuberculosis* H37Ra.

Metodología de estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de citometría de flujo y fluorimetría:

Protocolo de neutralización:

Transcurrido el tiempo de incubación con el agente descontaminante, se agitaron nuevamente los tubos en un vórtex y se realizó una neutralización química como se muestra en la tabla a continuación:

Tabla 3. Concentración y volumen (soluciones stock) de los diferentes agentes químicos y neutralizantes. Empleados en la metodología de análisis de la hidrólisis del FDA por citometría de flujo y fluorimetría.

Volumen Suspensión Bacteriana (mL)	Agente Descontaminante	Volumen Agente Descontaminante (mL)	Agente Neutralizante	Volumen Agente Neutralizante (mL)
1	NaOH al 4%(1N)	1	Ácido Clorhídrico (0,5N)	2
1	NaOH al 8% (2N)	1	Ácido Clorhídrico (1N)	2
1	Ácido Oxálico al 5% (0.8M)	1	NaOH (0,8M)	2
1	Ácido sulfúrico al 6% (2.2M)	1	NaOH (2,2M)	2
1	HPC al 0.75%	1	Tween 20 al 2%	2

Por otra parte, se tomaron por separado 1mL de cada una de las neutralizaciones y suspensiones bacterianas y se mezclaron con 1mL de solución tampón Hepes 500 mM (pH 7).

Preparación de la solución de trabajo de FDA

Se empleó una solución madre de FDA a una concentración de $2,5 \times 10^5$ ng/mL, disuelta en acetona y seguidamente se diluyó en solución salina de cloruro de sodio (0,85%) obteniéndose una concentración final de FDA de $2,5 \times 10^4$ ng/mL.

a) Lectura de la hidrólisis del FDA por análisis de citometría de flujo

Se tomaron por separado 900 μ L de cada una de las suspensiones descontaminadas con los diferentes agentes descontaminantes y la suspensión bacteriana a titular. Seguidamente, se mezclaron cada una de las suspensiones con 100 μ L de la solución de trabajo de FDA (concentración final $2,5 \times 10^3$ ng/mL), y se realizó la lectura bajo condiciones de operación del citómetro de flujo

(FACSCalibur). Finalmente, se realizó la metodología de siembra de placas de agar descrita anteriormente.

b) Lectura de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría

Para la descontaminación con HPC, y posterior lectura por fluorimetría fue necesario realizar una neutralización del compuesto por centrifugación, en la cual se mezclaron, en un tubo eppendorf de 1,5 mL, volúmenes iguales (500 μ L) de la suspensión bacteriana de trabajo y el HPC 0,75%. Posteriormente, se agitó e incubó la suspensión durante 20 y 40 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación con el agente descontaminante, se agitaron nuevamente los tubos utilizando un vórtex y se centrifugó a 10.000xg durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en un mililitro 1mL de solución tampón Hepes 500 mM (pH 7).

Finalmente para la lectura de la hidrólisis del FDA por fluorimetría se tomaron por separado 180 μ L de cada una de las suspensiones descontaminadas con los diferentes agentes descontaminantes utilizados y la suspensión bacteriana a titular. Luego se mezclaron cada una de las suspensiones con 20 μ L de la solución de trabajo de FDA (concentración final $2,5 \times 10^3$ ng/mL). Finalmente, se sembraron cada de las suspensiones en una microplaca negra de 96 pozos, realizando la lectura a una longitud de onda de excitación $\lambda=488$ nm y de emisión $\lambda=520$ nm. Finalmente, se realizó la metodología de siembra de placas de agar descrita anteriormente.

Análisis estadístico:

El análisis de ANOVA de tres vías se realizó utilizando el programa estadístico "Statística" versión 9. Adicionalmente, se realizó el test Duncan (prueba a posteriori) con la finalidad de estimar variaciones en los tratamientos. Se estimó el porcentaje de recuperación según la metodología empleada, de la siguiente manera:

a) Metodología de siembra en placas con agar:

Con el conteo bacteriano obtenido de cada dilución con los diferentes agentes descontaminantes se calculó el porcentaje relativo de recuperación de las micobacterias mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación en placas con agar} = \frac{\text{Recuento de colonias después de la descontaminación} \times 100}{\text{Recuento de colonias de la titulación}}$$

b) Metodología de estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría:

Con el conteo de unidades de fluorescencia relativa (UFR), obtenido posterior a un tiempo de incubación de 4 horas con los diferentes agentes descontaminantes se calculó el porcentaje relativo de recuperación de las micobacterias mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación Fluorimetría} = \frac{\text{UFR después de la descontaminación}}{\text{UFR de la titulación}} \times 100$$

c) Metodología de estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de citometría de flujo:

De la población seleccionada se estimó la región con fluorescencia positiva para la fluoresceína y se realizó el cálculo del porcentaje relativo de recuperación de las micobacterias utilizando la siguiente fórmula:

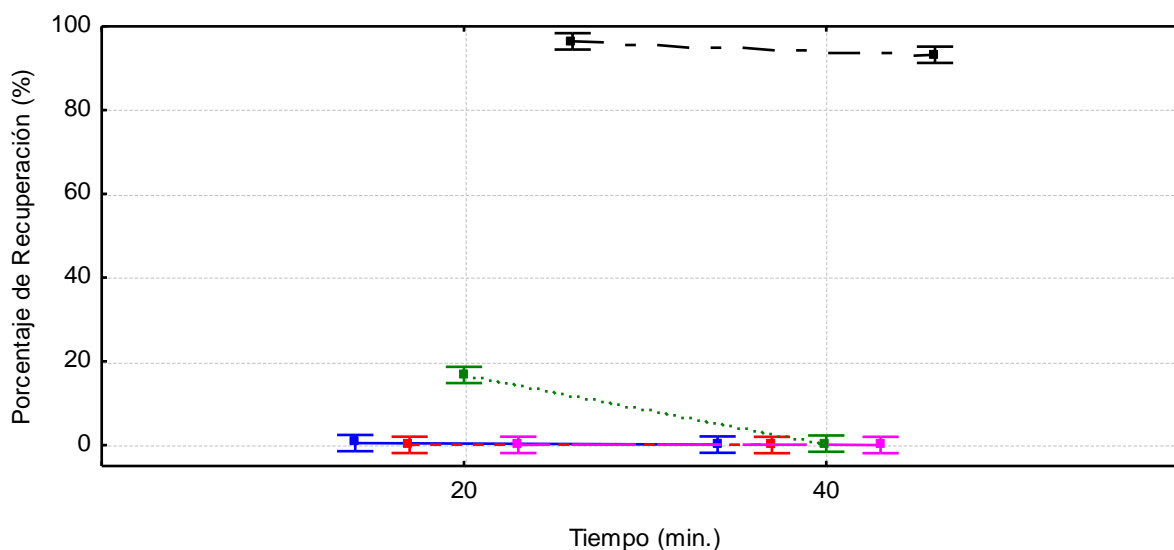
$$\% \text{ Recuperación Citometría de flujo} = \frac{\text{Valor medio de fluorescencia después de la descontaminación} \times 100}{\text{Valor medio de fluorescencia de la titulación}}$$

RESULTADOS

➤ Metodología de siembra en placas con agar.

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. abscessus*.

En la figura 2, se muestra la comparación de agentes químicos descontaminantes, evaluados por la metodología de siembra en placas con agar a distintos tiempos (20 y 40 min.), para la recuperación de *M. abscessus*.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%)	
	20 minutos	40 minutos
NaOH 2%	<1	<1
NaOH 4%	<1	<1
Ácido oxálico al 5%	13.5 ± 3.8	<1
Ac. Sulfúrico 6%	<1	<1
HPC 0.75%	97.7 ± 2.8	92.1 ± 2.9

Figura 2. Comparación de la recuperación de *M. abscessus* para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar. Para los tiempos 20 y 40 minutos.

Como se puede observar en la figura 2, al usar NaOH al 2 y al 4% como agente descontaminante, con un tiempo de incubación de 20 minutos, se observó que la recuperación de *M. abscessus* fue inferior al 1% para ambas concentraciones; mostrando que no existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de recuperación entre estas dos concentraciones ($p>0.05$). De igual modo, la recuperación obtenida para el tratamiento con ácido sulfúrico fue menor al 1% para este mismo tiempo de incubación.

Con HPC la recuperación fue de $97.7 \pm 2.8\%$ mientras que con el uso de ácido oxálico fue de $13.5 \pm 3.8\%$, indicando que son los agentes descontaminantes del estudio que ofrecen la mayor tasa de recuperación para *M. abscessus*, posterior a un tratamiento de 20 minutos ($p>0.05$) (Figura 2)

Al prolongar el tiempo de incubación a 40 minutos se obtuvo una recuperación para el NaOH al 2 y al 4%, menor al 1% para ambas concentraciones, de manera similar se encontró un porcentaje de recuperación inferior al 1% para el ácido sulfúrico y ácido oxálico. Por el contrario, el HPC mostró una recuperación de $92.1 \pm 2.9\%$. El porcentaje de recuperación obtenido para el HPC reveló diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás agentes químicos descontaminantes en estudio, para este tiempo de incubación ($p<0.05$). (Figura 2).

En relación al recuento de colonias, no hubo diferencia estadísticamente significativa a los 20 y 40 minutos con el uso de NaOH al 2 y al 4% como agente descontaminante ($p>0.05$), al igual que con el uso del HPC no hubo variaciones con relevancia estadística, para los tiempos en estudio ($p>0.05$). Por el contrario, se encontraron variaciones significativas con el uso de ácido oxálico al prolongar la incubación hasta 40 minutos ($p<0.05$). (Figura 2)

El Análisis de varianza determinó que el efecto causado por los distintos agentes descontaminantes presenta significancia estadística ($p<0.05$), adicionalmente existen cambios sobre la recuperación de *M. abscessus* en los

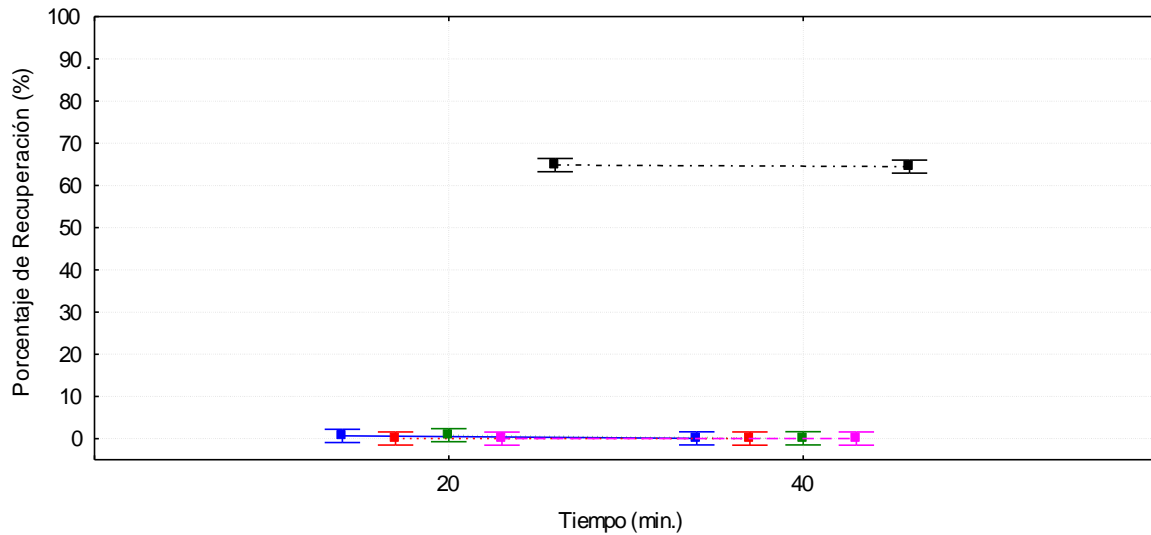
tiempos de incubación 20 y 40 minutos ($p < 0.05$), sumado a esto la interacción del tiempo de incubación y los distintos agentes descontaminantes son representativamente distintos ($p < 0.05$), lo que indica un efecto diferencial de los distintos agentes químicos en el tiempo, sobre el porcentaje de recuperación. (Tabla 4)

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de *Mycobacterium abscessus* estimado por la metodología de siembra en placas con agar. (SS) suma de cuadrado, (F) valor estadístico de contraste, (MS) Variaciones entre los niveles, (p) probabilidad.

	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Intercepto	12928.91	1	12928.91	4921.36	0.000000
TIEMPO	120,52	1	120.52	45.87	0.000001
TRATAMIENTO	41472.02	4	10368.01	3946.55	0.000000
TIEMPO-TRATAMIENTO	298.66	4	74.66	28.42	0.000000
Error	52.54	20	2.63		

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. chelonae*.

En la figura 3, se muestra el porcentaje de recuperación de *M. chelonae* cuando ha sido incubada con diferentes agentes químicos descontaminantes, para los tiempos 20 y 40 min., donde las estimaciones fueron realizadas empleado la metodología de siembra en placas con agar.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%)	Porcentaje de recuperación (%)
	20 minutos	40 minutos
NaOH 2%	<1	<1
NaOH 4%	<1	<1
Ácido oxálico al 5%	<1	<1
Ac. Sulfúrico 6%	<1	<1
HPC 0.75%	65.7 ± 6	64.5 ± 0.9

Figura 3. Comparación de la recuperación de *M. chelonae* para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar. Para los tiempos 20 y 40 minutos.

Como se observa en la figura 3, al usar NaOH al 2% y al 4% como agente descontaminante con un tiempo de incubación de 20 minutos se observó que la recuperación de *M. chelonae* fue inferior al 1% para ambas concentraciones, por lo tanto, no hubo diferencias estadísticamente significativas para estos tratamientos ($p > 0.05$). De igual modo, los tratamientos ácidos (ácido oxálico y ácido sulfúrico) presentaron una baja tasa de recuento de colonias en placas con agar, obteniéndose un valor inferior al 1%; no se observaron variaciones entre los descontaminantes con pH ácido en estudio para este tiempo incubación ($p > 0.05$). Con HPC el porcentaje de recuperación obtenido fue de $65.7 \pm 6\%$, siendo el

agente descontaminante que ofrece la mayor tasa de recuperación de colonias sobre los demás agentes en estudio ($p < 0.05$).

Cuando la incubación se prolongó hasta 40 minutos, la recuperación con NaOH al 2% y al 4% se mantuvo constante, con un valor inferior al 1%. De manera similar los resultados indican un valor de recuento de colonias en placas con agar menor al 1% con los descontaminantes ácido oxálico y ácido sulfúrico, mostrando similitud estadística ($p > 0.05$). Por último el HPC presentó una recuperación de $64.5 \pm 0.9\%$. (Figura 3)

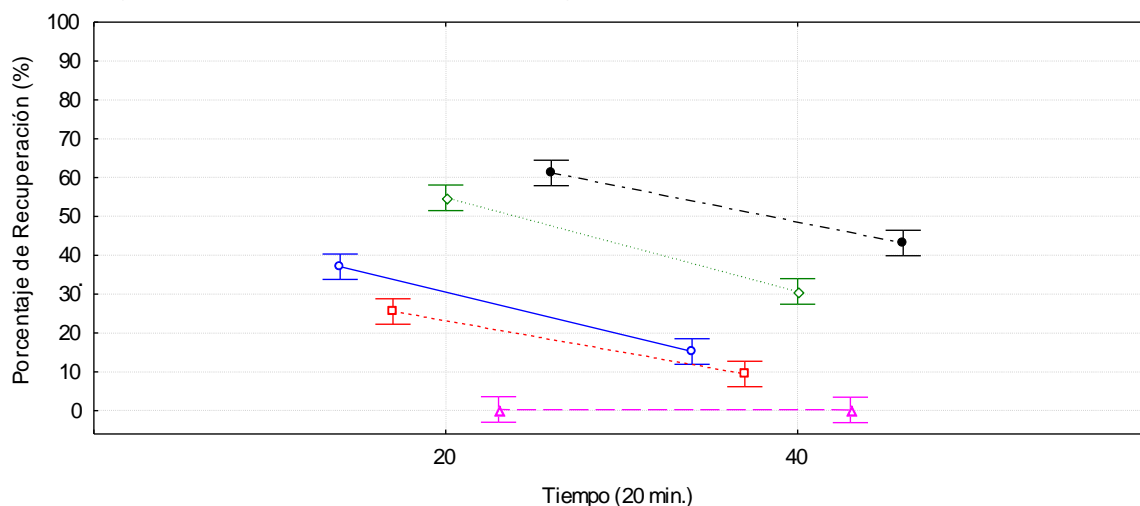
El análisis estadístico sugiere que el tiempo de incubación para *M. chelonae* con los agentes descontaminantes en estudio no es un parámetro crítico con significancia estadística ($p > 0.05$). Adicionalmente este análisis sugiere que el agente descontaminante empleado es significativamente determinante en la recuperación de esta especie ($p < 0.05$). Por último, la interacción de los agentes descontaminantes en estudio y los tiempos de incubación no presentaron relevancia estadística ($p > 0.05$), lo que indica que no existe un efecto diferencial de los distintos agentes químicos en el tiempo, sobre el porcentaje de recuperación. (Tabla 5)

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) de *Mycobacterium chelonae* estimado por la metodología de siembra en placas con agar. (SS) suma de cuadrado, (F) valor estadístico de contraste, (MS) Variaciones entre los niveles, (p) probabilidad.

	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Intercepto	5155.11	1	5155.11	3083.99	0.000000
TIEMPO	0.87	1	0.87	0.52	0.478042
TRATAMIENTO	19924.73	4	4981.18	2979.94	0.000000
TIEMPO-TRATAMIENTO	0.69	4	0.17	0.10	0.980265
Error	33.43	20	1.67		

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. fortuitum*.

En la figura 4, se muestra el porcentaje de recuperación de *M. fortuitum* cuando ha sido incubada con diferentes agentes químicos descontaminantes, para los tiempos 20 y 40 min., donde las estimaciones fueron realizadas empleado la metodología de siembra en placas con agar.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%)	
	20 minutos	40 minutos
NaOH 2%	33 ± 1.5	15 ± 2
NaOH 4%	26 ± 4	10 ± 2.5
Ácido oxálico al 5%	59 ± 1.1	31 ± 5.5
Ac. Sulfúrico 6%	<1	<1
HPC 0.75%	62 ± 8.4	45 ± 1.1

Figura 4. Comparación de la recuperación de *M. fortuitum* para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar. Para los tiempos 20 y 40 minutos.

Como se observa en la figura 4, la recuperación de *M. fortuitum* después del tratamiento con NaOH al 2% por 20 minutos fue de $33 \pm 1.5\%$, mientras que para el NaOH al 4%, se obtuvo un valor de $26 \pm 4\%$. Para el ácido oxálico y HPC

la recuperación fue de $59 \pm 1.1\%$ y $62 \pm 8.4\%$, respectivamente. Por último el recuento de colonias en placa arrojó un porcentaje de recuperación inferior al 1% para el ácido sulfúrico. Se observaron claras diferencias entre los diferentes agentes descontaminantes estudiados, siendo éstas estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Al prolongar la incubación por 40 minutos se observó que el porcentaje de recuperación con NaOH al 2% fue de $15 \pm 2\%$. Por otro lado, para la concentración de 4% se obtuvo un valor de $10 \pm 2.5\%$. Al emplear ácido oxálico como agente químico descontaminante la recuperación fue de $31 \pm 5.5\%$ y con el ácido sulfúrico la recuperación fue inferior al 1%. Por último, para el HPC, el porcentaje de recuperación fue de $45 \pm 1.1\%$. Se observaron diferencias significativas entre los diferentes agentes descontaminantes para este tiempo de incubación ($p < 0.05$). (Figura 4)

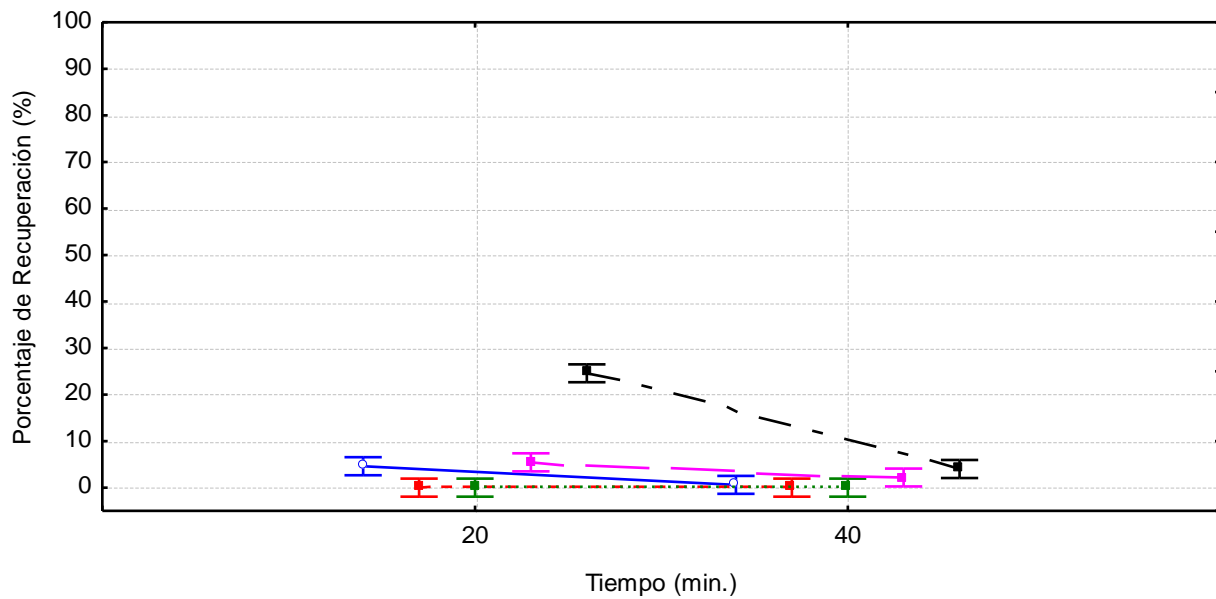
Se estimó estadísticamente que existe un efecto significativo sobre *M. fortuitum* con relación al tiempo de incubación ($p < 0.05$), adicionalmente se encontró que existe una significancia estadística en la recuperación determinada por el agente químico descontaminante empleado ($p < 0.05$), junto a esto la relación tiempo de incubación- agente descontaminante no es un rango constante para esta especie, debido que a no existe un disminución homogénea en el porcentaje de recuperación para los distintos agentes descontaminantes al aumentar el tiempo de incubación de 20 a 40 min. ($p < 0.05$). (Tabla 10)

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) de *M. fortuitum* estimado por la metodología de siembra en placas con agar. (SS) suma de cuadrado, (F) valor estadístico de contraste, (MS) Variaciones entre los niveles, (p) probabilidad.

	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Intercepto	39392.16	1	39392.16	7584.34	0.000000
TIEMPO	1533.53	1	1533.53	295.25	0.000000
TRATAMIENTO	29805.92	4	7451.48	1434.66	0.000000
TIEMPO-TRATAMIENTO	824.12	4	206.03	39.66	0.000000

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra.

En la figura 5, se muestra el porcentaje de recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra cuando ha sido incubada con diferentes agentes químicos descontaminantes, para los tiempos 20 y 40 min., donde las estimaciones fueron realizadas empleado la metodología de siembra en placas con agar.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%)	
	20 minutos	40 minutos
NaOH 2%	3.8 ± 0.3	<1
NaOH 4%	<1	0
Ácido oxálico al 5%	0	0
Ac. Sulfúrico 6%	5.4 ± 0.9	1.9 ± 0.8
HPC 0.75%	26.5 ± 1.4	4 ± 0.2

Figura 5. Comparación de la recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra para los diferentes agentes descontaminantes estimado por siembra en placas con agar. Para los tiempos 20 y 40 minutos.

Como se observa en la figura 5, al utilizar NaOH al 2% como agente descontaminante para un tiempo de incubación de 20 minutos se observó que la recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra fue de $3.8 \pm 0.3\%$; mientras que con el uso de NaOH al 4% fue inferior al 1%, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones en estudio ($p > 0.05$). Al emplear ácido oxálico no se obtuvo un recuento de colonias en placas de agar. En cuanto al ácido sulfúrico su valor se ubicó en un porcentaje de $5.4 \pm 0.9\%$. Por otro lado, al emplear HPC, el porcentaje de recuperación fue de $26.5 \pm 1.4\%$. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para los diferentes agentes descontaminantes ($p < 0.05$), siendo más eficiente el HPC con respecto al NaOH y ácido sulfúrico ($p < 0.05$).

Cuando la incubación se prolongó por 40 minutos el porcentaje de recuperación con NaOH al 2% fue de inferior al 1%, mientras que con el NaOH al 4% no se observaron colonias posterior a la siembra en placa con agar. Con el HPC se obtuvo un valor de $4 \pm 0.2\%$. Por último la descontaminación con ácido oxálico y ácido sulfúrico fue de 0% y $1.9 \pm 0.8\%$, respectivamente. Se observaron diferencias significativas para los diferentes agentes descontaminantes para este tiempo de incubación (40 minutos) ($p < 0.05$). (Figura 5)

El análisis de varianza refleja que existe un efecto del tiempo sobre la recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra ($p < 0.05$), aunado a esto, el agente descontaminante empleado es crítico para la recuperación de este microorganismo, lo que refleja que existen variaciones significativas en las medias calculadas para la recuperación ($p < 0.05$). (Tabla 12)

Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA) de *M. tuberculosis* H37Ra estimado por la metodología de siembra en placas con agar. (SS) suma de cuadrado, (F) valor estadístico de contraste, (MS) Variaciones entre los niveles, (p) probabilidad.

	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Intercepto	513.27	1	513.27	199.44	0.000000
TIEMPO	232.46	1	232.46	90.32	0.000000
TRATAMIENTO	837.95	4	209.48	81.40	0.000000
TIEMPO-TRATAMIENTO	442.06	4	110.51	42.94	0.000000
Error	51.47	20	2.57		

Metodología de estimación de la hidrólisis del compuesto FDA por análisis de fluorimetría.

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. abscessus*.

En la figura 6, se muestra la cinética bacteriana de *M. abscessus* generada por la incorporación del FDA hasta su hidrólisis a fluoresceína, posterior a la descontaminación y neutralización de los distintos agentes químicos empleados. La acción de esterasas metabólicamente activas, que están presentes en células viables de *M. abscessus*, genera en el tiempo un aumento de las UFR, como consecuencia de la acumulación intracelular de fluoresceína, como se puede observar en todas las curvas de color verde de la figura 6. Por otro lado, la cinética bacteriana de las muestras que han sido tratadas con los diferentes agentes descontaminantes, mostró en el tiempo una menor tasa de UFR, en relación a la cinética bacteriana de las muestras no tratadas con ningún descontaminante, siendo estadísticamente significativo el efecto negativo generado por los agentes descontaminantes en estudio ($p < 0.05$).

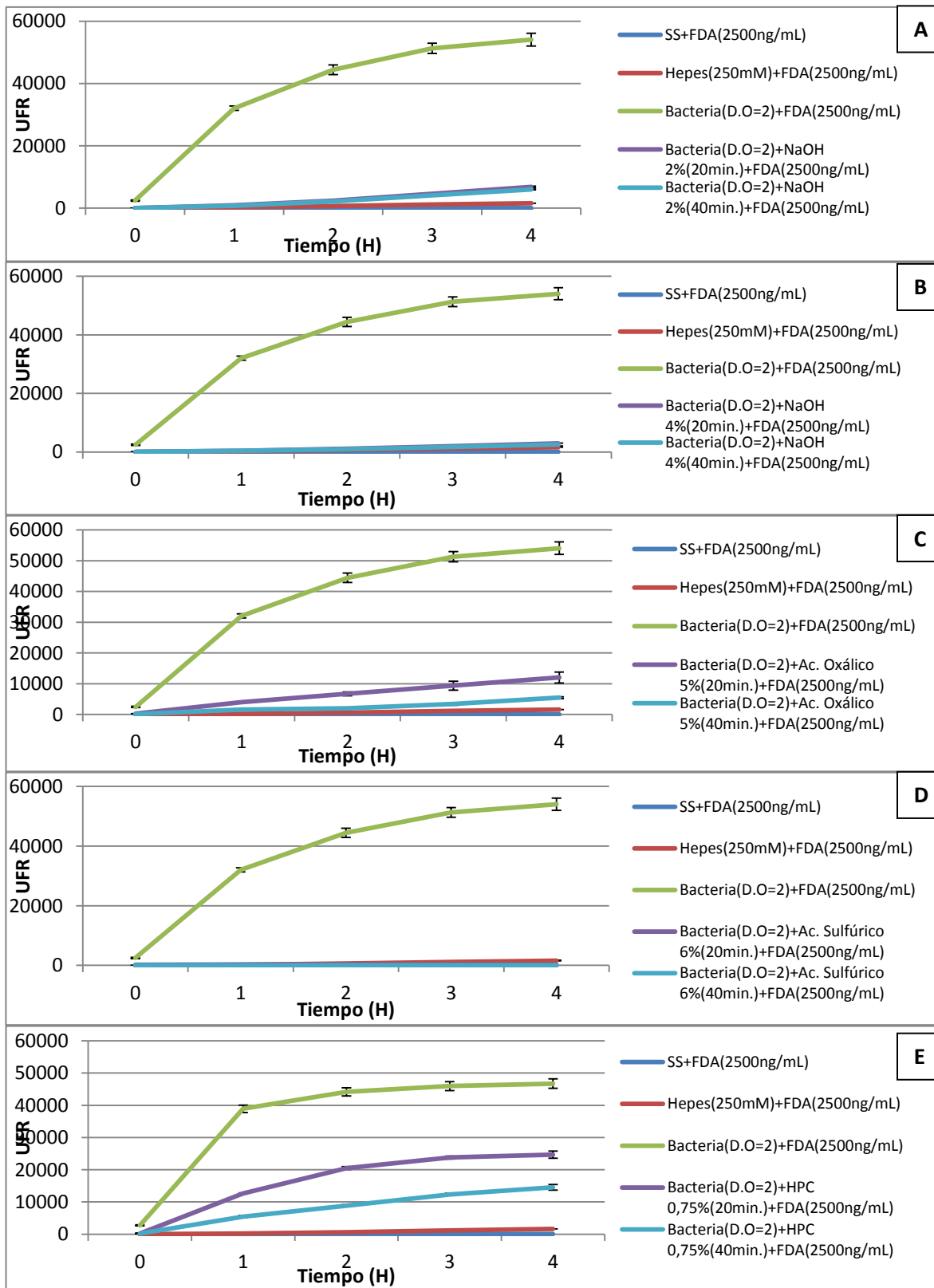
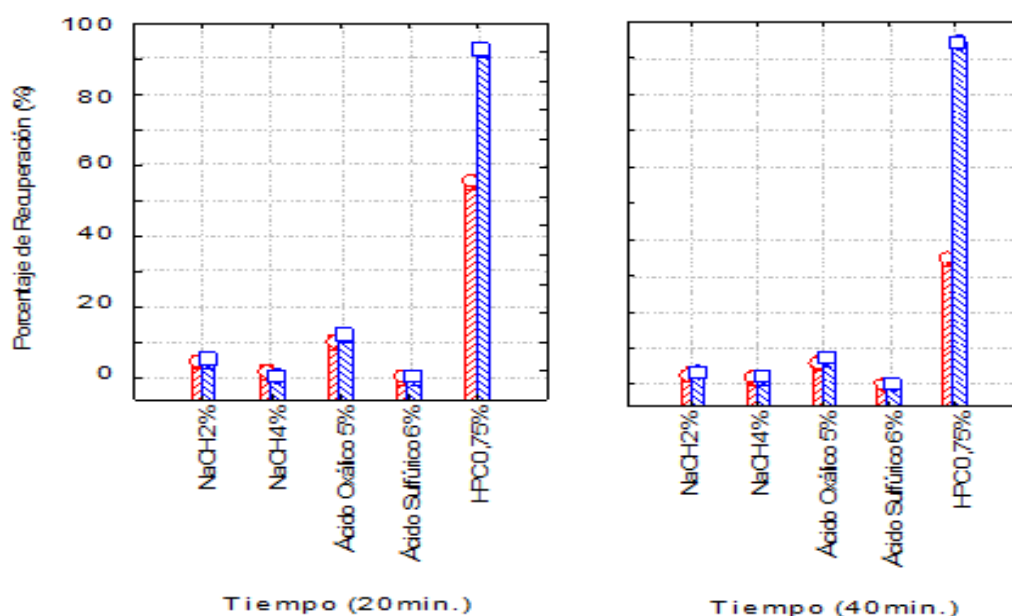


Figura 6. Cinética de incorporación del FDA para *M. abscessus* y el efecto de los agentes descontaminantes: (6.A)

NaOH 2%, (6.B) NaOH 4%, (6.C) Ácido Oxalico 5%, (6.D) Ácido sulfúrico 6%, (6.E) HPC 0,75%.

En la figura 7, se muestra la comparación de los porcentajes de recuperación de *M. abscessus*, empleando la metodología de siembra en agar (barras azules) y la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría (barras rojas), a los tiempos 20 y 40 min.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%) 20 minutos		Porcentaje de recuperación (%) 40 minutos	
	Siembra en placas con agar	Fluorimetría	Siembra en placas con agar	Fluorimetría
NaOH 2%	4.8 ± 0.4	4.5 ± 0.1	3 ± 0.5	2.5 ± 0.2
NaOH 4%	<1	1.5 ± 0.2	<1	1.6 ± 0.4
Ac. Oxálico 5%	12.2 ± 2.6	10 ± 0.6	6.9 ± 0.6	5.6 ± 0.5
Ac. Sulfúrico 6%	<1	<1	<1	<1
HPC 0.75%	86.2 ± 2.3	52.8 ± 0.4	79.3 ± 3.9	31.8 ± 0.9

Figura 7. Comparación del porcentaje de recuperación de *M. abscessus* estimadas en paralelo por análisis de fluorimetría y por recuento de colonias en placas de agar. Para los tiempos de incubación de 20 y 40 minutos

Como se muestra en la figura 7, al emplear NaOH al 2% para un tiempo de 20 minutos, se obtuvo un porcentaje de recuperación estimado por análisis de fluorimetría de $4.5 \pm 0.1\%$ mientras que por siembra en placas con agar el valor obtenido fue de $4.8 \pm 0.4\%$, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos por estas metodologías ($p > 0.05$). Por otro lado, cuando se empleó NaOH al 4%, se obtuvo por fluorimetría un porcentaje de células viables de $1.5 \pm 0.2\%$, en contraste al obtenido por siembra en placas con agar (valor inferior al 1%). Al comparar estadísticamente estos valores, no se obtuvieron en los resultados diferencias significativas ($p > 0.05$).

Por otro lado, al usar ácido oxálico durante 20 minutos como agente descontaminante, la viabilidad de las células estimada por fluorimetría y por siembra en placas con agar, no tuvo diferencias significativas ($p > 0.05$), pues los valores son muy similares ($10 \pm 0.6\%$ y $12.2 \pm 2.6\%$ respectivamente). Con respecto al empleo del ácido sulfúrico como agente descontaminante, éste mostró una tasa de recuperación similar por ambas técnicas, siendo el mencionado valor inferior al 1%. Por último, el HPC fue el único agente descontaminante que para el tiempo de 20 minutos presentó diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de recuperación con la técnica de fluorimetría al compararla con la siembra en placas con agar, siendo los valores de $52.8 \pm 0.4\%$ y $86.2 \pm 2.3\%$, respectivamente ($p < 0.05$). (Figura 7)

Al prolongar el tiempo de incubación por 40 minutos se observó que la recuperación con NaOH para las dos concentraciones en estudio no fueron significativamente diferentes a nivel estadístico ($p > 0.05$). Para el NaOH al 2% se obtuvo un valor de $2.5 \pm 0.2\%$ por análisis de fluorimetría en relación a la siembra en placas con agar donde se obtuvo un valor en $3 \pm 0.5\%$, el análisis estadístico indica que estos resultados no son significativamente distintos ($p > 0.05$). Por otro lado, para la concentración del NaOH al 4%, el recuento de colonias en placas con agar se ubicó en un valor inferior al 1% y no contrasta con el obtenido por fluorimetría cuyo valor fue de $1.6 \pm 0.4\%$ ($p > 0.05$). Para la descontaminación con

ácido sulfúrico durante 40 minutos, el valor mantuvo una relación similar para ambas técnicas ($p>0.05$), ubicándose la estimación en porcentajes inferiores al 1%. Por otro lado, con el ácido oxálico se obtuvo un valor de $6.9 \pm 0.6\%$ por la siembra en placa de agar y de $5.6 \pm 0.5\%$ por fluorimetría, siendo las medias estadísticamente similares ($p>0.05$). Por último, HPC fue el que presentó diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de recuperación con la técnica de fluorimetría al compararla con la siembra en placas con agar para este tiempo de incubación, siendo los valores de $31.8 \pm 0.9\%$ y $79.3 \pm 3.9\%$, respectivamente. (Figura 7)

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. chelonae*.

En la figura 8, se muestra la cinética bacteriana generada posterior a la descontaminación y neutralización de los distintos agentes químicos empleados. La cinética bacteriana de incorporación del FDA, mostró en el tiempo un aumento de las UFR como consecuencia de la acumulación intracelular de fluoresceína generada por la acción de esterasas metabólicamente activas presentes en células viables. Adicionalmente, se obtuvo una disminución de las UFR debido a efectos negativos sobre la viabilidad celular generado por la presencia de los diferentes agentes descontaminantes en estudio, causando diferencias estadísticamente significativas entre la cinética de las células no tratadas con ningún descontaminante, con respecto a la cinética de las bacterias que fueron sometidas a los agentes químicos descontaminantes ($p<0.05$).

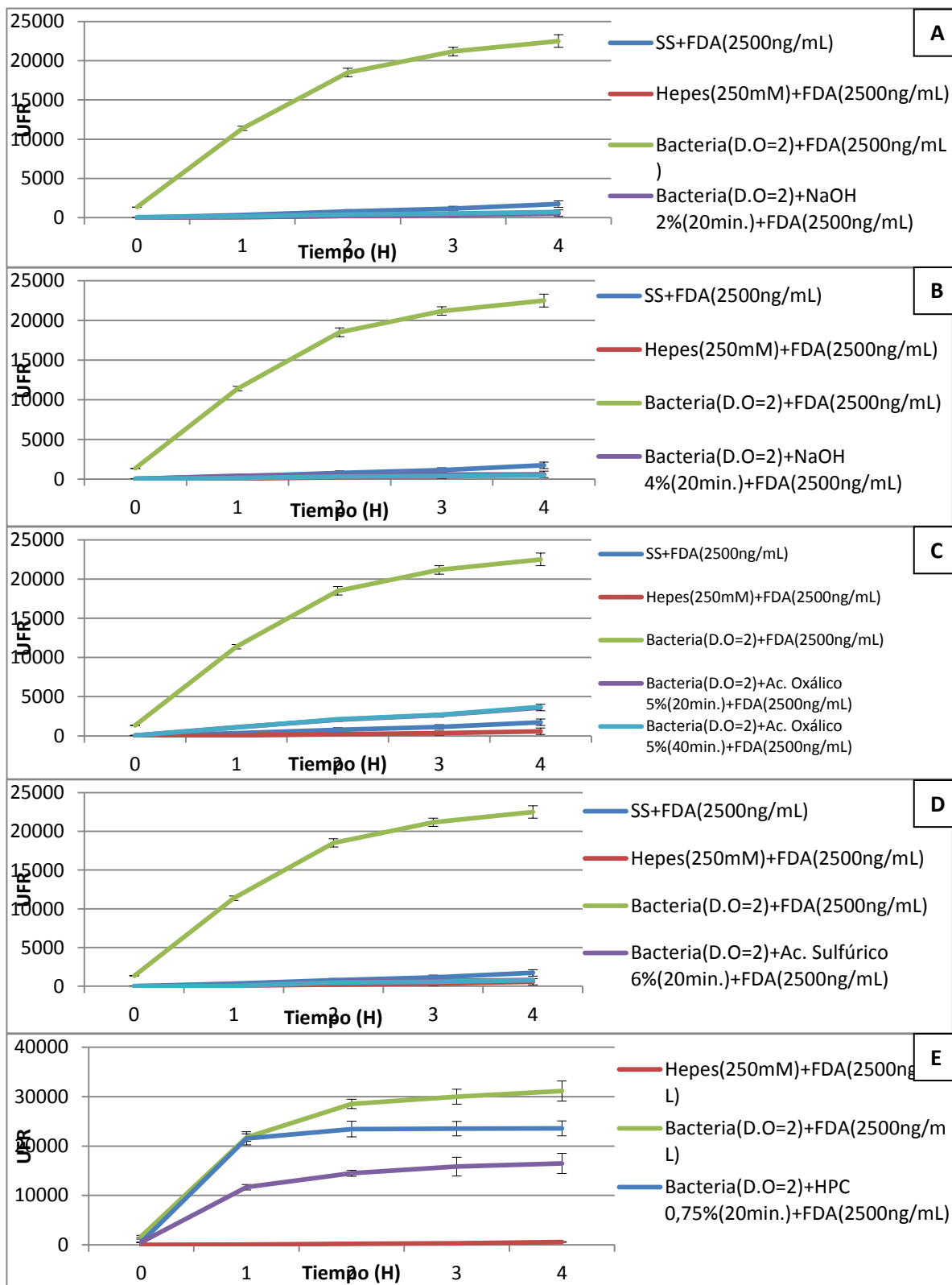
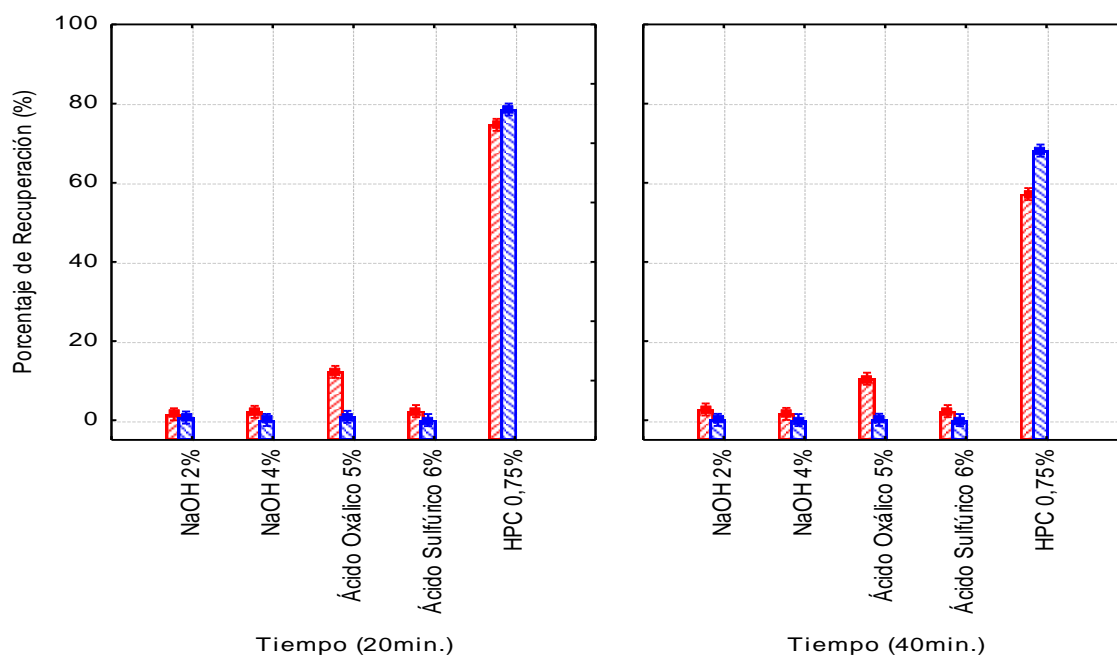


Figura 8. Cinética de incorporación del FDA para *M. chelonae* y el efecto de los agentes descontaminantes: (8.A) NaOH 2%, (8.B) NaOH 4%, (8.C) Ácido Oxálico 5%, (8.D) Ácido sulfúrico 6%, (8.E) HPC 0,75%.

En la figura 9 se muestra la comparación del porcentaje de recuperación de *M. chelonae*, empleando la metodología de siembra en agar (barras azules) y la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría (barras rojas), para los distintos agentes descontaminantes, evaluados a los tiempos 20 y 40 min.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%)		Porcentaje de recuperación (%)	
	20 minutos		40 minutos	
	Siembra en placas con agar	Fluorimetría	Siembra en placas con agar	Fluorimetría
NaOH 2%	<1	1.4 ± 0.2	<1	2.7 ± 0.6
NaOH 4%	<1	2 ± 0.4	<1	1.5 ± 0.5
Ac. Oxálico 5%	<1	12.1 ± 0.4	<1	10.4 ± 1.3
Ac. Sulfúrico 6%	<1	2.2 ± 0.5	<1	2.2 ± 0.2
HPC 0.75%	78.5 ± 1.5	74.6 ± 1.2	68.1 ± 1.1	57.1 ± 3.6

Figura 9. Comparación del porcentaje de recuperación de *M. chelonae* estimadas en paralelo por análisis de fluorimetría y por recuento de colonias en placas de agar. Para los tiempos de incubación de 20 y 40 minutos

Como se observó en la figura 9, al emplear NaOH al 2% con un tiempo de incubación de 20 minutos, se obtuvo una recuperación estimada por fluorimetría de $1.4 \pm 0.2\%$, mientras que por siembra en placas con agar fue inferior al 1%, por lo que no se encontraron variaciones estadísticas entre los valores obtenidos ($p > 0.05$). Por otro lado, al emplear NaOH al 4% no se observaron diferencias significativas entre el análisis de fluorimetría y la siembra en placas con agar siendo los valores obtenidos; $2 \pm 0.4\%$ y menor al 1% respectivamente ($p > 0.05$).

Para la descontaminación con soluciones a pH ácido para un tiempo de 20 minutos se observó un rango constante en la recuperación de colonias en placas de agar para *M. chelonae* ubicándose en un valor inferior al 1% tanto para el ácido oxálico como para el ácido sulfúrico, mientras que los valores obtenidos por el fluorímetro no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al patrón de placa obtenido al emplear ácido sulfúrico como agente descontaminante, siendo el valor obtenido de $2.2 \pm 0.5\%$, por el contrario se encontraron variaciones estadísticas significantes para el ácido oxálico donde la recuperación fue de $12.1 \pm 0.4\%$ ($p < 0.05$). Para el HPC a un tiempo de 20 minutos el porcentaje de recuperación mostró una similitud entre sus medias, indicando que no existen variaciones en la estimación del porcentaje de recuperación por ambas técnicas, siendo el porcentaje obtenido por siembra en placas con agar de $78.5 \pm 1.5\%$ y $74.6 \pm 1.2\%$ por fluorimetría ($p > 0.05$). (Figura 9)

Al prolongar el tiempo de incubación hasta 40 minutos se observó que para la concentración de NaOH al 2 y al 4%, la recuperación por siembra en placa fue inferior al 1% para ambas concentraciones, no siendo significativamente distintos a los valores obtenidos por análisis de fluorescencia, los cuales se ubicaron en $2.7 \pm 0.6\%$ para la concentración de 2% y $1.5 \pm 0.5\%$ cuando se empleó el NaOH al 4% ($p > 0.05$). Con el uso de ácido oxálico y ácido sulfúrico, la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría dieron valores de $10.4 \pm 1.3\%$ y $2.2 \pm 0.2\%$, respectivamente, de los cuales el ácido oxálico para este tiempo es el agente químico que muestra diferencias significativas respecto a la siembra en

placas con agar ($p < 0.05$). Con el HPC a los 40 minutos la estimación de la viabilidad celular para *M. chelonae*, se ubicó en $68.1 \pm 1.1\%$, siendo significativamente parecido al obtenido por siembra en placas con agar donde el valor fue de $57.1 \pm 3.6\%$ ($p > 0.05$). (Figura 9)

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. fortuitum*.

En la figura 10, se muestra la cinética bacteriana de *M. fortuitum* generada por la incorporación del FDA hasta su hidrólisis a fluoresceína, posterior a la descontaminación y neutralización de los distintos agentes químicos empleados. La acción de esterasas metabólicamente activas presentes en células viables de *M. fortuitum*, genera en el tiempo un aumento de las UFR, hasta llegar a una tasa de saturación a las 4 h de seguimiento, como consecuencia de la acumulación intracelular de fluoresceína (curvas de color verde en la figura). Por otro lado, la cinética de incorporación del FDA y su transformación a fluoresceína en las muestras tratadas con los diferentes agentes descontaminantes, mostró en el tiempo una menor tasa de UFR, en relación a la cinética de las muestras que no fueron tratadas con ningún descontaminante, siendo estadísticamente significativo el efecto negativo generado por los agentes descontaminantes en estudio ($p < 0.05$).

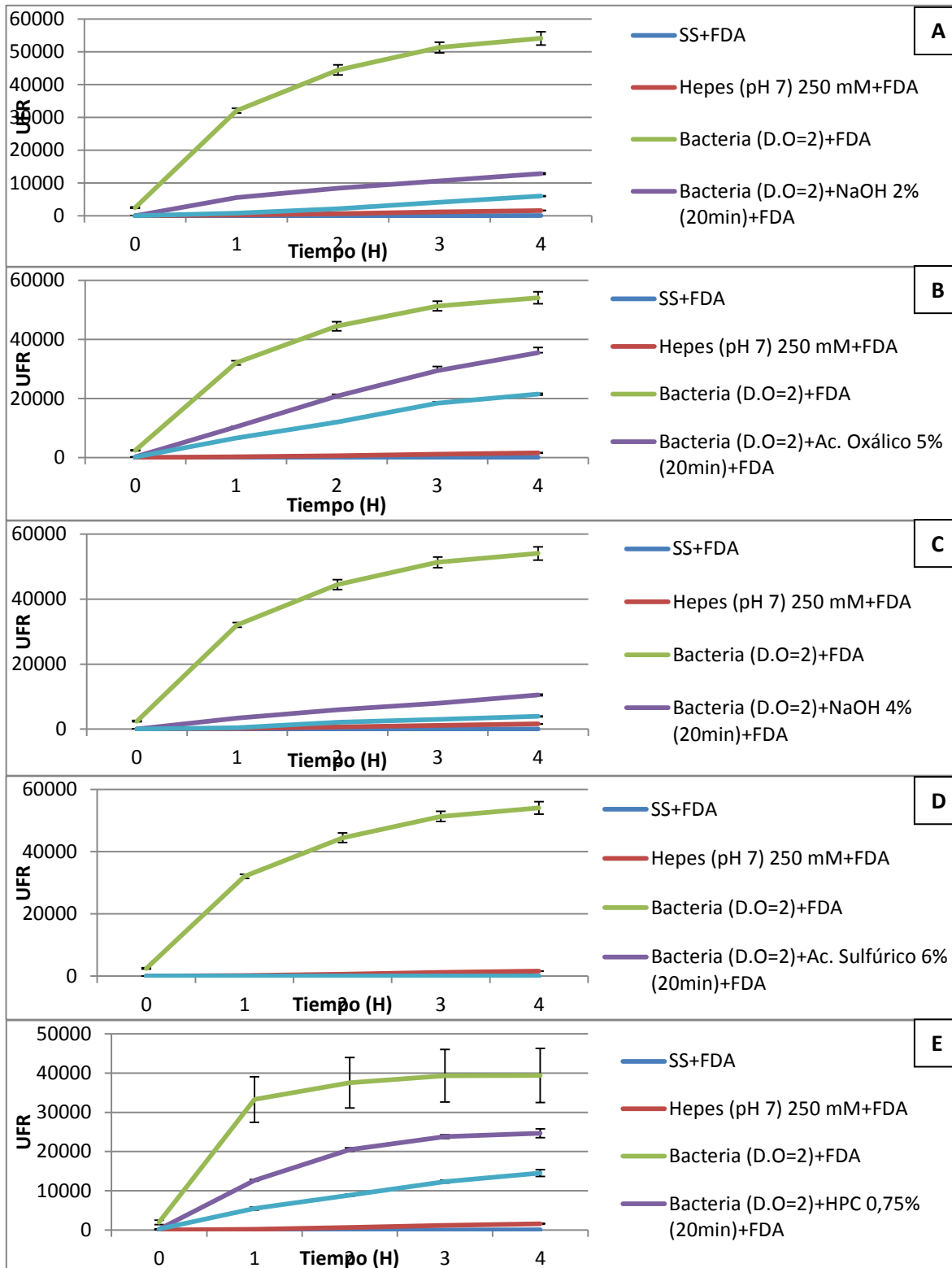
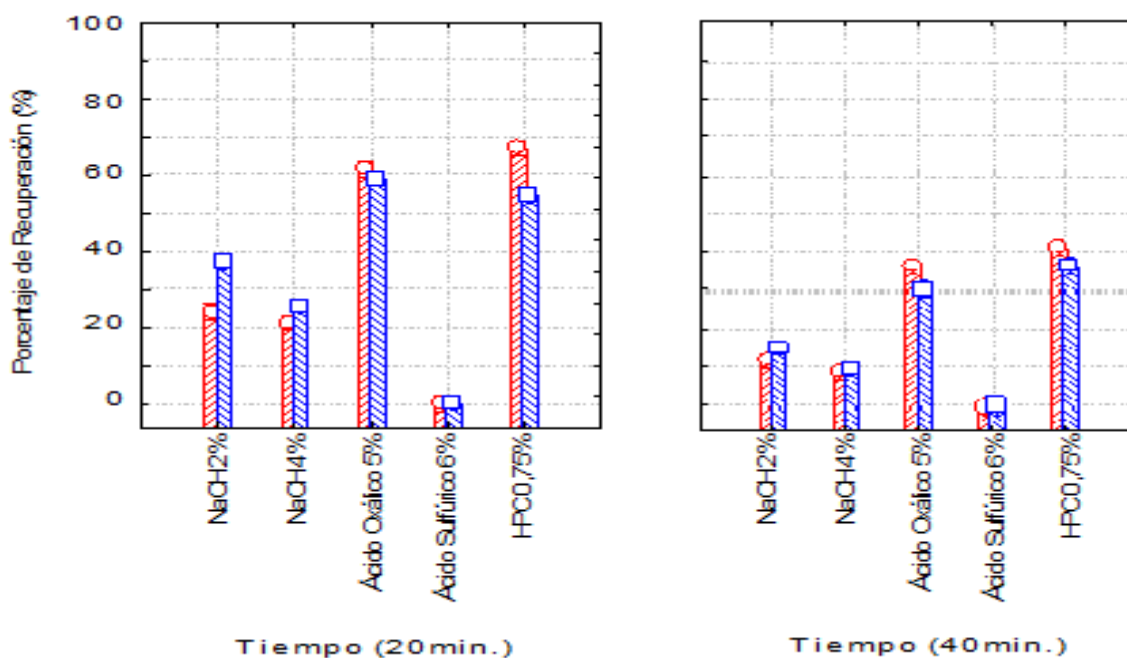


Figura 10. Cinética de incorporación del FDA para *M. fortuitum* y el efecto de los agentes descontaminantes: (10.A) NaOH 2%, (10.B) NaOH 4%, (10.C) Ácido Oxálico 5%, (10.D) Ácido sulfúrico 6%, (10.E) HPC 0,75%.

En la figura 11, se muestra la comparación del porcentaje de recuperación de *M. fortuitum*, empleando la metodología de siembra en agar (barras azules) y la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría (barras rojas), a los tiempos 20 y 40 min.



Agente	Porcentaje de recuperación (%)		Porcentaje de recuperación (%)	
	20 minutos		40 minutos	
descontaminante	Siembra en placas con agar	Fluorimetría	Siembra en placas con agar	Fluorimetría
NaOH 2%	37 ± 3.1	24.2 ± 0.4	15.2 ± 1.9	11.5 ± 0.7
NaOH 4%	25.3 ± 4.5	21.3 ± 2.7	9.4 ± 0.8	8.4 ± 1
Ac. Oxálico 5%	59.2 ± 0.9	61.6 ± 3.5	30.7 ± 1.7	36.1 ± 3.3
Ac. Sulfúrico 6%	<1	<1	<1	<1
HPCO 0.75%	54.8 ± 0.6	67 ± 3.8	36.1 ± 2.2	41.01 ± 5.3

Figura 11. Comparación del porcentaje de recuperación de *M. fortuitum* estimadas en paralelo por análisis de fluorimetría y por recuento de colonias en placas de agar. Para los tiempos de incubación de 20 y 40 minutos

Como se observa en la figura 11, al comparar estadísticamente la siembra en placa con la fluorimetría, sobre cada uno de los tiempos de exposición a los distintos agentes descontaminantes, no se observan diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, cuando se comparan los porcentajes de recuperación obtenidos con el HPC para los tiempos 20 y 40 minutos, se observa un mayor porcentaje de recuperación a un menor tiempo de incubación, siendo significativamente estadístico el cambio ($p < 0.05$).

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra.

En la figura 12, se muestra la cinética de hidrólisis del FDA generada por células viables posterior a la descontaminación y neutralización de los distintos agentes químicos empleados, mostrando en el tiempo un aumento de las UFR como consecuencia de la acumulación intracelular de fluoresceína generada por la acción de esterasas metabólicamente activas presentes en células viables. En contraste, se obtuvo una disminución de las UFR debido a efectos negativos sobre la viabilidad celular generado por la presencia de los diferentes agentes descontaminantes en estudio, causando diferencias estadísticamente significativas entre la cinética de las células no tratadas con ningún descontaminante, con respecto a la cinética de incorporación del FDA por *M. tuberculosis* H37Ra, cuando fueron sometidas a los agentes químicos descontaminantes ($p < 0.05$).

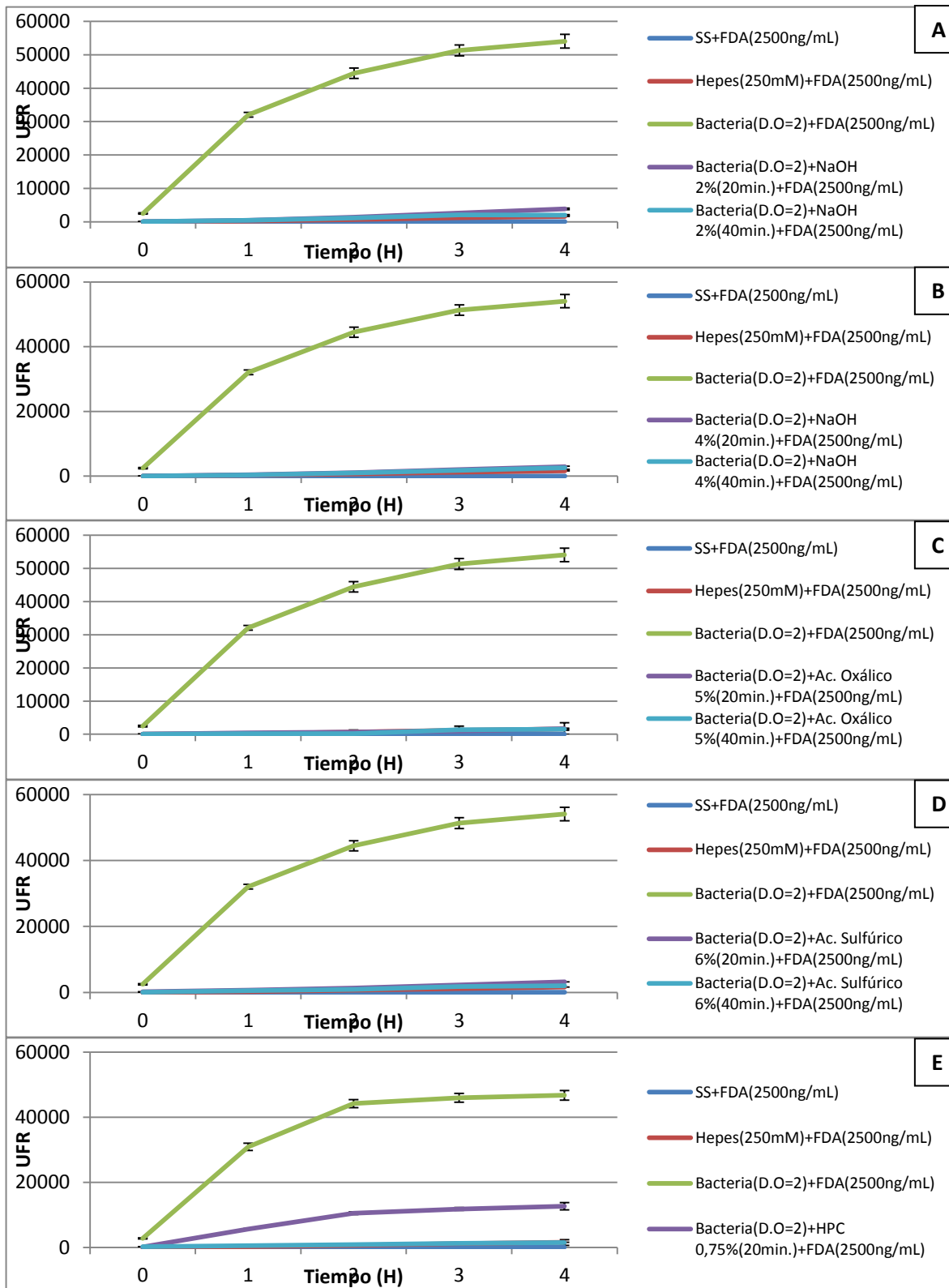
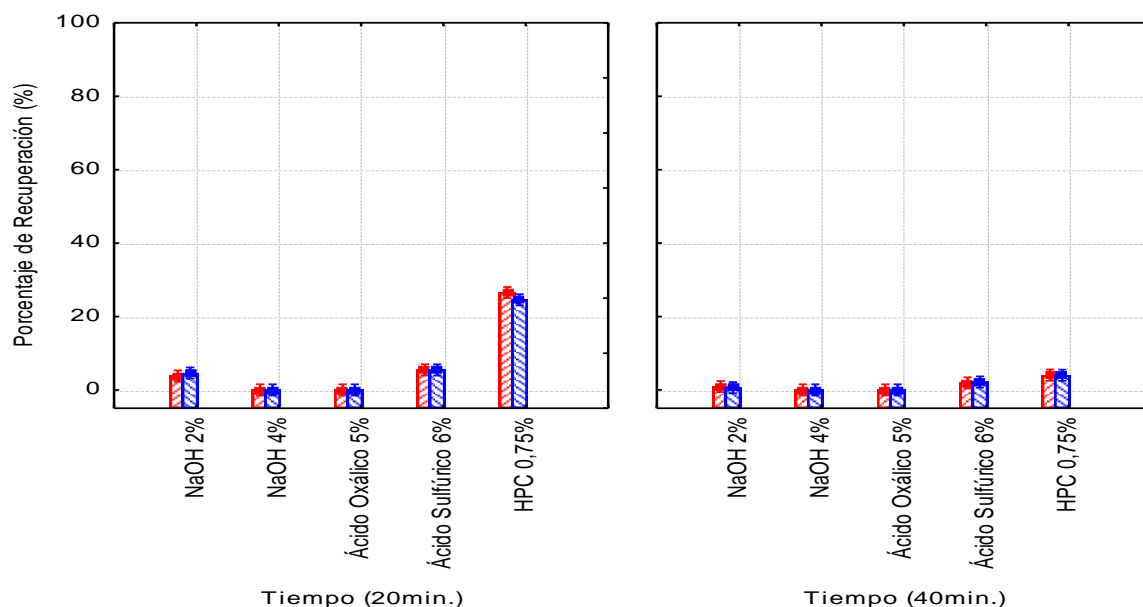


Figura 12. Cinética de incorporación del FDA para *M. tuberculosis* H37Ra y el efecto de los agentes descontaminantes: (12.A) NaOH 2%, (12.B) NaOH 4%, (12.C) Ácido Oxálico 5%, (12.D) Ácido sulfúrico 6%, (12.E) HPC 0,75%.

En la figura 13, se muestra la comparación del porcentaje de recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra, para los distintos agentes descontaminantes, empleando la metodología de siembra en agar (barras azules) en paralelo a la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría (barras rojas).



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%) 20 minutos		Porcentaje de recuperación (%) 40 minutos	
	Siembra en placas con agar	Fluorimetría	Siembra en placas con agar	Fluorimetría
NaOH 2%	4.6 ± 1.3	3.8 ± 0.3	<1	<1
NaOH 4%	<1	<1	<1	<1
Ac. Oxálico 5%	<1	<1	<1	<1
Ac. Sulfúrico 6%	5.4 ± 1.9	5.4 ± 0.9	2.1 ± 0.8	1.9 ± 0.8
HPC 0.75%	24.5 ± 4.2	26.5 ± 1.4	4 ± 0.6	4 ± 0.2

Figura 13. Comparación del porcentaje de recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra estimadas en paralelo por análisis de fluorimetría y por recuento de colonias en placas de agar. Para los tiempos de incubación de 20 y 40 minutos

Como se observa en la figura 13, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra cuando se comparan la siembra en placa y la fluorimetría, cuando las bacterias estuvieron expuestas por 20 minutos a todos los agentes descontaminantes ($p>0.05$). De igual manera sucede al prolongar el tiempo de exposición a los descontaminantes por 40 minutos; las diferencias entre ambas metodologías no son significativas ($p>0.05$). Por el contrario, cuando se comparan los tiempos de exposición de 20 y 40 minutos al descontaminante HPC, la recuperación es significativamente mayor a los 20 minutos que la recuperación a los 40 minutos ($p<0.05$) y este resultado sólo se observa con este agente químico.

➤ **Metodología de estimación de la hidrólisis del compuesto FDA por análisis de citometría de flujo.**

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. abscessus*.

En la figura 14 se muestran las diferentes representaciones obtenidas por análisis de citometría de flujo, para las células no marcadas, es decir, representan al control negativo de éste experimento. En el eje X está representada la intensidad de fluorescencia para la fluoresceína y el eje Y la granularidad bacteriana, ambas escalas están expresadas en unidades logarítmicas. En la figura 14.A está reflejada la población seleccionada de las células no marcadas, mientras que la figura 14.B representa la región que no posee fluorescencia (cuadrante inferior izquierdo). Por otro lado, la figura 14.C es la representación del histograma de la intensidad de fluorescencia, donde M1 es la región de fluorescencia para la fluoresceína, dado que las células no están marcadas su media de fluorescencia no se encuentra en esta región.

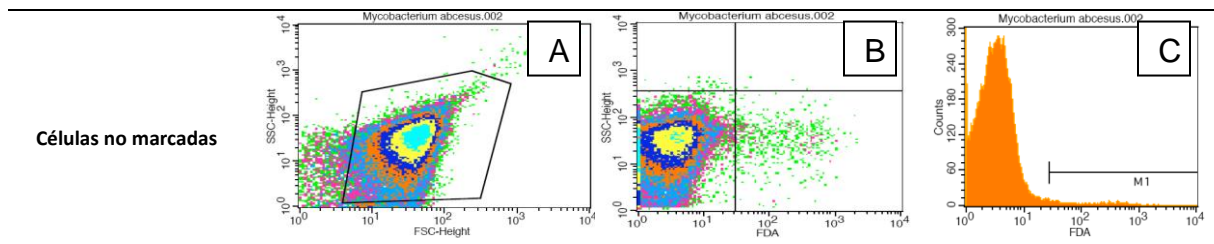


Figura 14. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo).

En la figura 15, están representadas las células vivas marcadas con FDA (control positivo) y sin exposición a ningún agente descontaminante, en la cual las figuras 15.B y 15.C, indican que existe un efecto significativo sobre la lectura como consecuencia de la incorporación y posterior hidrólisis del FDA ($p < 0.05$), dado que los eventos obtenidos para las células vivas, se encontraron en la región de fluorescencia para la fluoresceína (cuadrante inferior derecho, en la figura 15.B, y rango M1, en la figura 15.C).

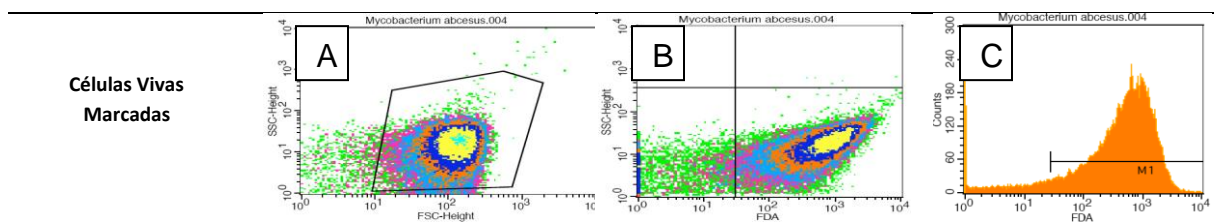


Figura 15. Análisis de citometría de flujo para las células vivas marcadas con FDA (control positivo).

En la figura 16, se observa la estimación de la viabilidad celular de *M. abscessus* empleando la metodología de citometría de flujo, donde las lecturas demuestran que existe un efecto negativo sobre la supervivencia de ésta micobacteria posterior a un tratamiento con NaOH al 2% y 4%, debido a que se observó una disminución progresiva en la media de fluorescencia respecto a las células vivas marcadas en su totalidad ($p < 0.05$).

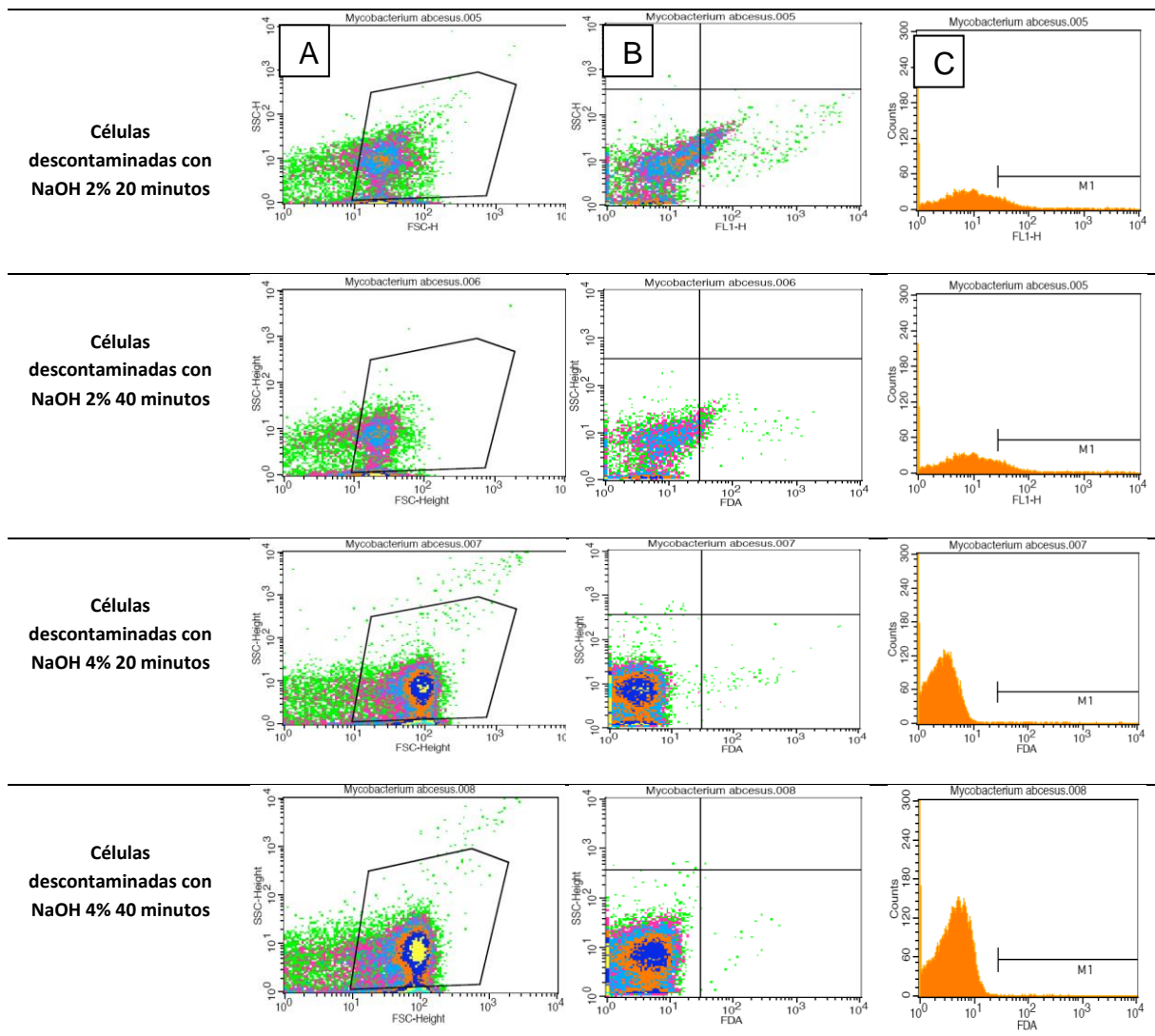


Figura 16. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. abscessus*. Empleando como agente descontaminante NaOH al 2% y 4%.

En la figura 17, está representada la estimación de la viabilidad celular para *M. abscessus*, empleando la metodología de citometría de flujo para los agentes descontaminantes HPC, ácido oxálico y ácido sulfúrico, siendo los tiempos de incubación empleados 20 y 40 minutos, con los distintos agentes descontaminantes. En este caso se obtuvo una disminución de la media de fluorescencia con significancia estadística ($p < 0.05$), como consecuencia de la incubación de este microorganismo con los diferentes agentes descontaminantes. Nuevamente la viabilidad de las células se puede observar en el cuadrante inferior

derecho de la figura 17.B y en el rango M1 de la figura 17.C, debido a la fluoresceína incorporada en las células con integridad de membrana.

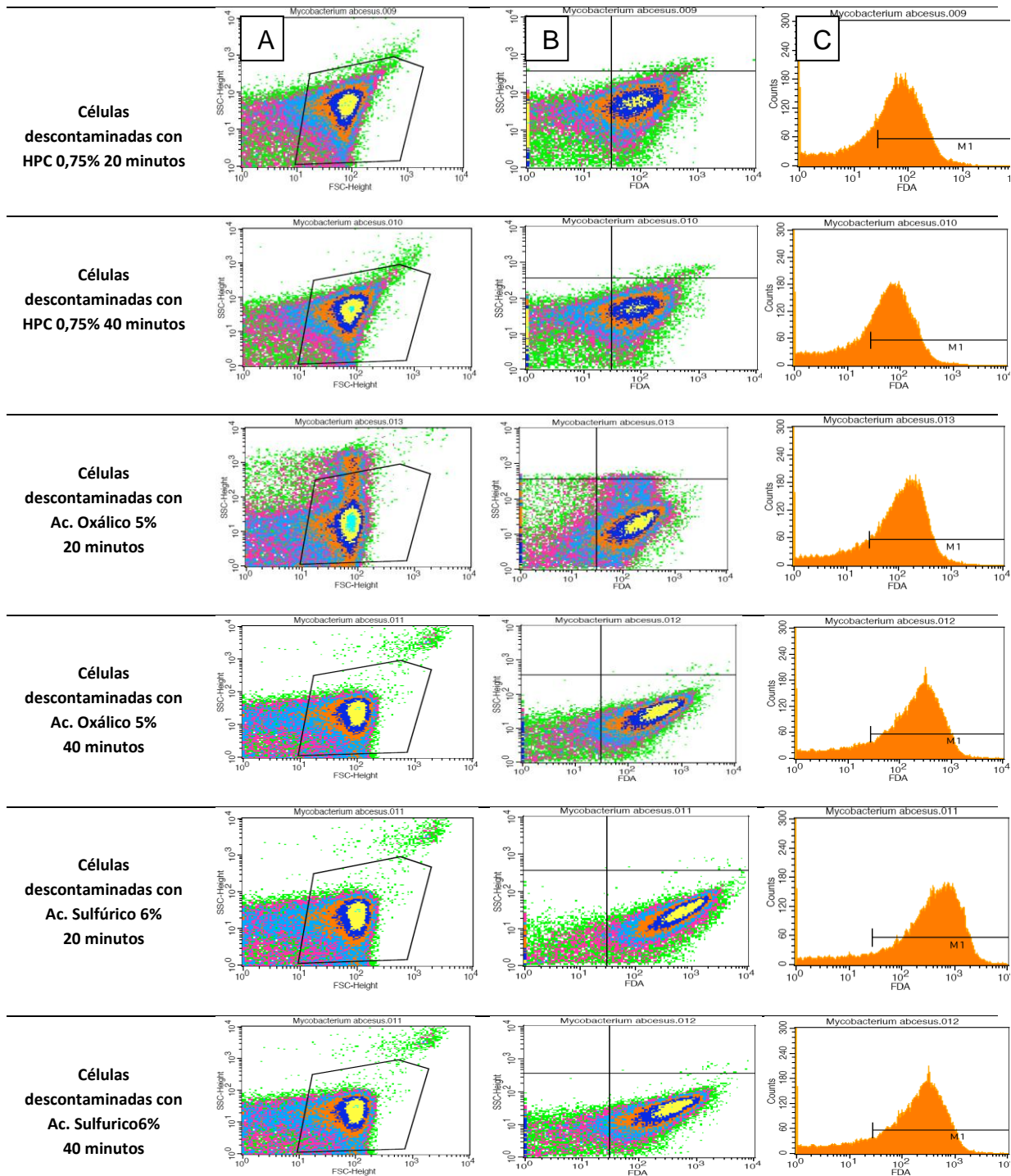
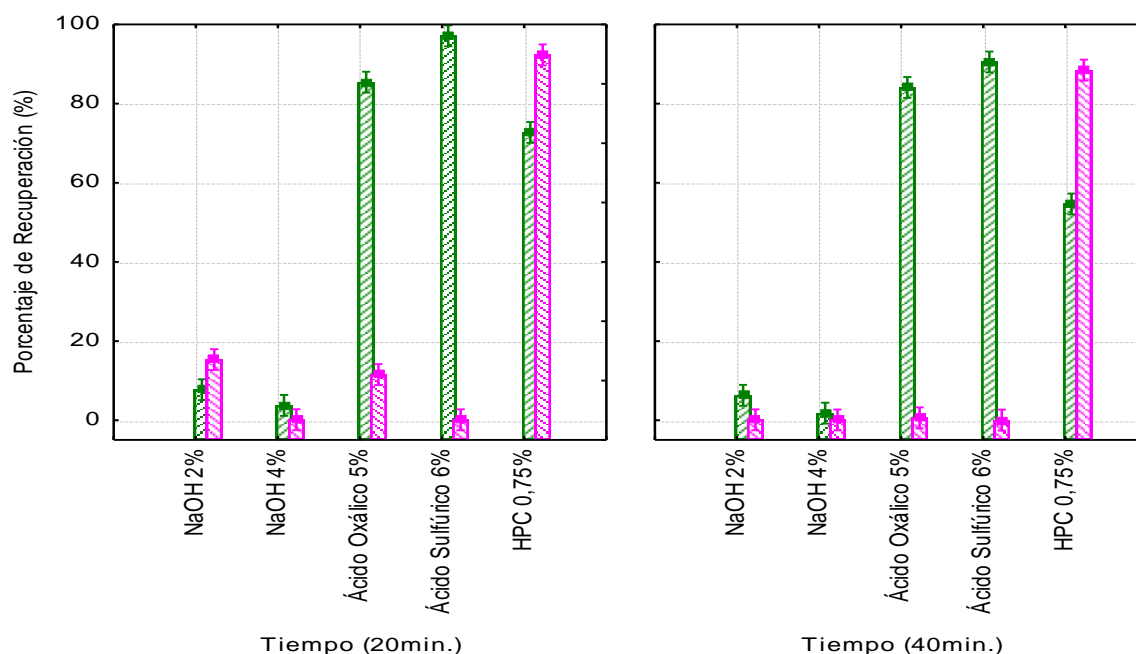


Figura 17. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. abscessus*. Empleando como agente descontaminante HPC, ácido oxálico y ácido sulfúrico

En la figura 18, se muestra la comparación del porcentaje de recuperación de *M. abscessus* empleando la metodología de siembra en agar (barras fucsias) en paralelo a la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de citometría de flujo (barras verdes), para los distintos agentes descontaminantes.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%) 20 minutos		Porcentaje de recuperación (%) 40 minutos	
	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo
NaOH 2%	18.69	15.31	<1	6.27
NaOH 4%	<1	3.73	<1	1.76
Ac. Oxálico 5%	11.53	85.42	<1	84.08
Ac. Sulfúrico 6%	<1	97.12	<1	90.53
HPC 0.75%	92.30	72.73	88.46	54.64

Figura 18. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para *M. abscessus* por siembra en placa de agar y citometría de flujo. Para los tiempos: (16.A) 20 min., (16.B) 40 min.

Como se observa en la figura 18, el único agente químico que mostró similitud en cuanto a la recuperación de *M. abscessus* cuando se comparan la

siembra en placa y la citometría de flujo, fue el NaOH al 4% ($p>0.05$). El resto de los agentes descontaminantes muestran diferencias significativas en la recuperación de la micobacteria durante los dos tiempos evaluados ($p<0.05$). Cabe destacar que la siembra en placa arrojó valores mucho menores que la citometría en casi todos los agente descontaminantes probados, a excepción del HPC, donde la recuperación en placa fue mayor que por citometría de flujo.

Como se observa en la figura 18, al emplear NaOH al 2%, con un tiempo de incubación de 20 minutos, se obtuvo un valor estimado por análisis de citometría de 15.31%, mientras que por siembra en placas, el valor obtenido se ubicó en 18.69%, observándose diferencias significativas entre las medias ($p<0.05$). Para la concentración de NaOH al 4% se obtuvo un porcentaje de células viables de 3.73%, utilizando la metodología de citometría de flujo, no siendo estadísticamente significativa la diferencia obtenida por la metodología de siembra en placas, la cual se ubicó en un valor inferior al 1% ($p>0.05$).

Al realizar una descontaminación durante 20 minutos empleando ácido oxálico como agente descontaminante por la metodología de citometría de flujo y siembra en placas, se obtuvo un valor de 85.42% y 11.53% respectivamente, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). Por otro lado, el ácido sulfúrico mostró una tasa de recuperación significativamente distinta para ambas técnicas con un valor inferior al 1% para siembra en placas y de 97.12% determinado por citometría de flujo ($p<0.05$). Por último, el HPC presentó variaciones en el valor de recuperación para la técnica de citometría de flujo ($52.8 \pm 0.4\%$) respecto a la siembra en placas ($86.2 \pm 2.3\%$) ($p<0.05$). (Figura 18)

Al prolongar el tiempo de incubación por 40 minutos con el NaOH al 2% se obtuvo, por análisis de citometría de flujo, un valor de 6.27% siendo significativamente distinto al obtenido por siembra en placas con agar, ubicándose en un valor inferior al 1% ($p<0.05$). Por otro lado, para la concentración de NaOH al 4%, el recuento de colonias en placas se ubicó en un valor inferior al 1%; este valor es comparable con el valor obtenido por citometría de flujo (3.73%), lo que

reflejó una variación, estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Para la descontaminación con ácido sulfúrico, el valor no mantuvo una relación similar para ambas técnicas ($p > 0.05$), ubicándose la estimación en un porcentaje inferior al 1% para el recuento de colonias y de 90.53% por análisis de citometría de flujo. Por otro lado, con el ácido oxálico se obtuvo un valor de siembra en placa de agar inferior al 1% y de 84.08% por citometría de flujo, siendo las medias estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). (Figura 18)

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. chelonae*.

En la figura 19, se observa los controles bacterianos empleado en la metodología de citometría de flujo para de *M. chelonae*, descritos anteriormente de forma similar para *M. abscessus*.

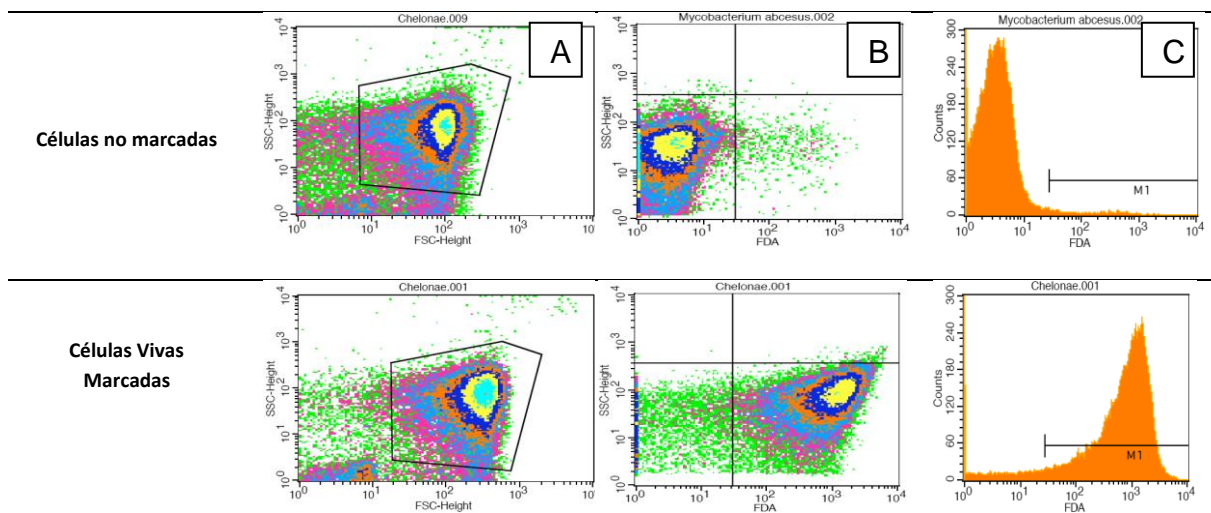


Figura 19. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo) y células vivas marcadas con FDA (control positivo).

La figura 20, muestra que existe un efecto negativo sobre la supervivencia de éste microorganismo posterior a un tratamiento con NaOH al 2 y al 4%, debido a que se observó una disminución progresiva en la media de fluorescencia respecto a las células vivas marcadas en su totalidad ($p < 0.05$).

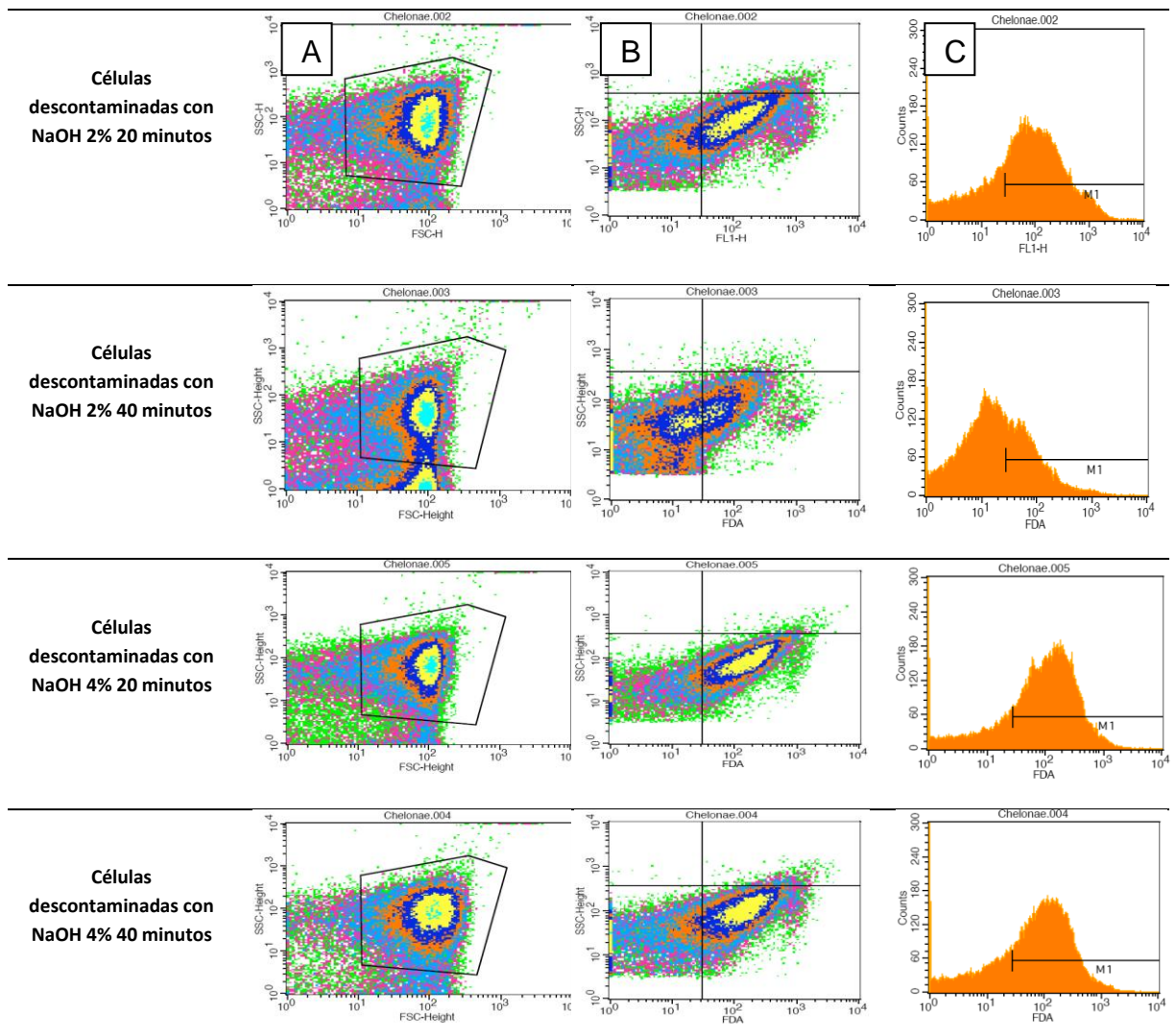


Figura 20. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. chelonae*, empleando el agente descontaminante NaOH al 2% y 4%.

En la figura 21, está representada la estimación de la viabilidad celular para *M. chelonae*, empleando la metodología de citometría de flujo para los agentes descontaminantes HPC, ácido oxálico y ácido sulfúrico. Por otro lado, se obtuvo una disminución de la media de fluorescencia con significancia estadística ($p < 0.05$), como consecuencia de la incubación de este microorganismo con los agentes descontaminantes.

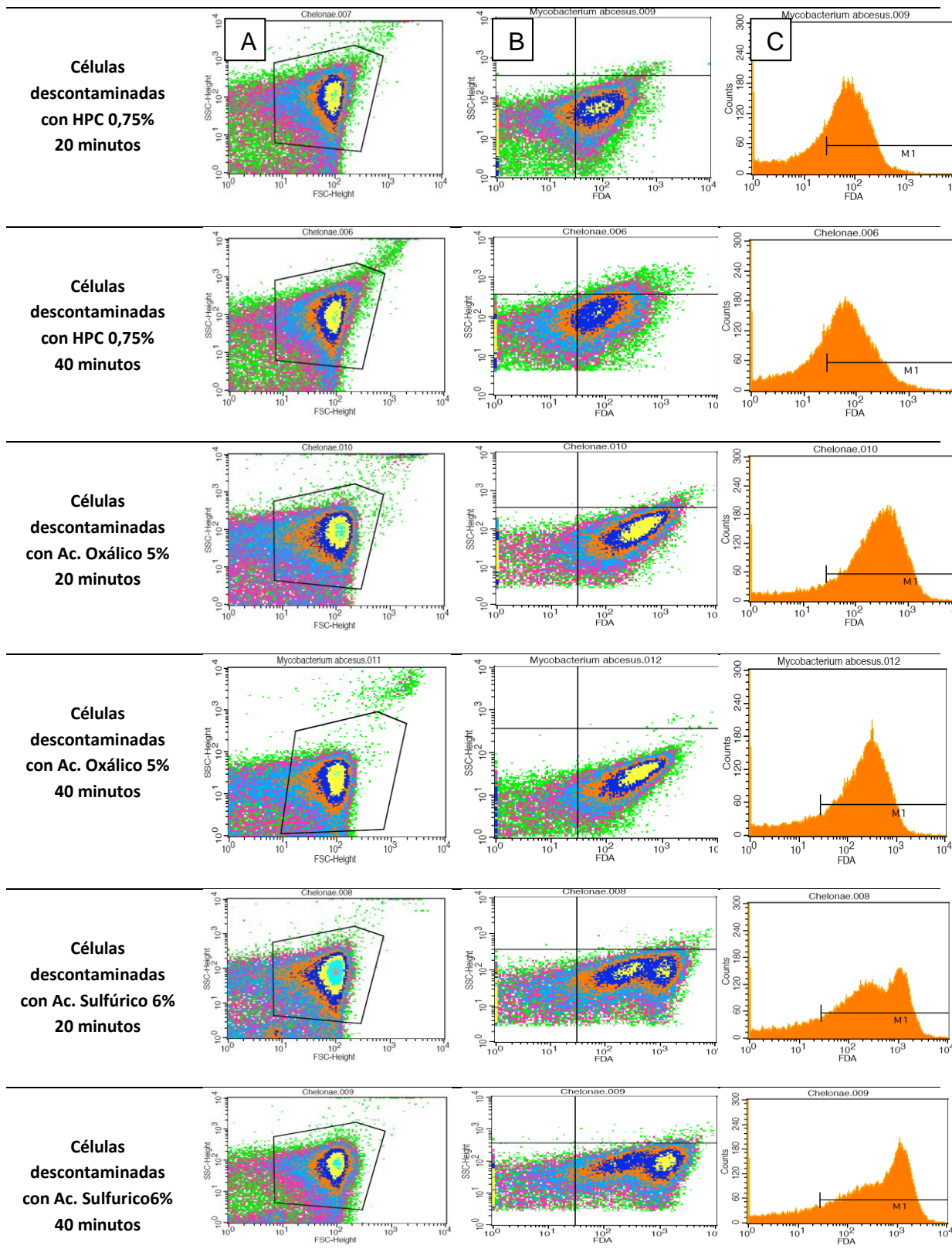
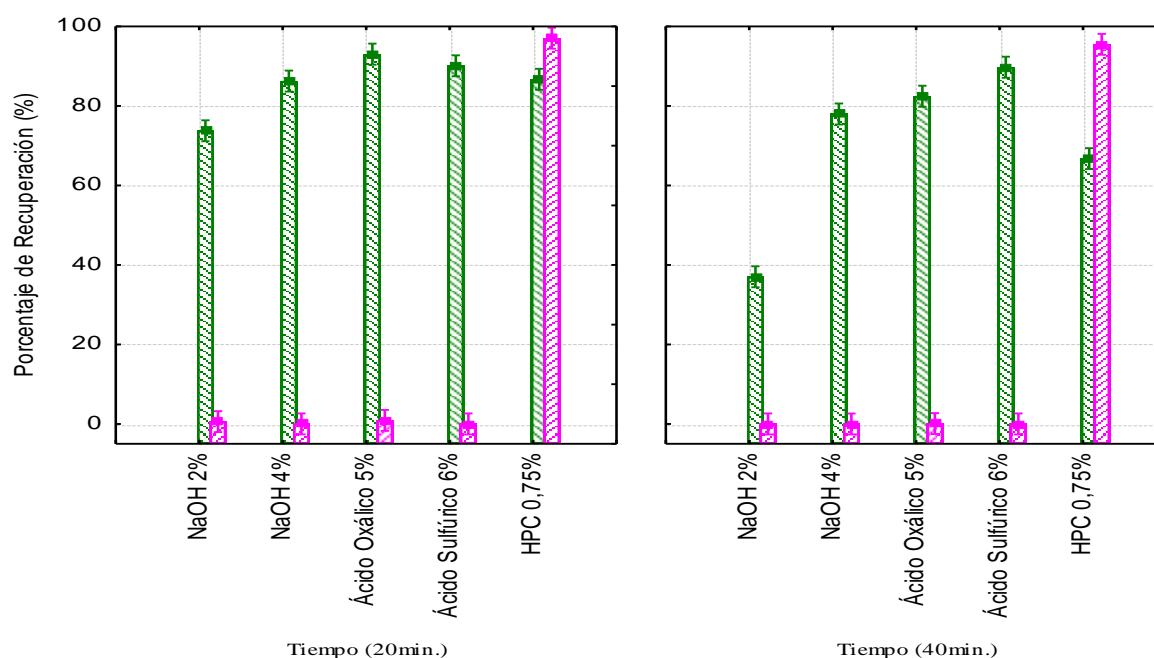


Figura 21. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. chelonae*, empleando los agentes químicos HPC 0,75%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico al 6%.

En la figura 22, se muestra la comparación del porcentaje de recuperación de *M. chelonae*, para los distintos agentes descontaminantes, empleando la metodología de siembra en agar (barras fucsias) en paralelo a la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de citometría de flujo (barras Verdes).



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%) 20 minutos		Porcentaje de recuperación (%) 40 minutos	
	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo
NaOH 2%	<1	73.76	<1	37.04
NaOH 4%	<1	86.26	<1	77.98
Ac. Oxálico 5%	<1	93,04	<1	82.44
Ac. Sulfúrico 6%	<1	90.1	<1	89.74
HPC 0.75%	97.05	86.71	95.5	66.75

Figura 22. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para *M. chelonae* por siembra en placa de agar y citometría de flujo. Para los tiempos: (22.A) 20 min., (22.B) 40 min.

Como se observó en la figura 22, al emplear NaOH al 2%, con un tiempo de incubación de 20 minutos, se obtuvo una recuperación estimada por citometría de

flujo de 73.76%, mientras que por siembra en placa fue inferior al 1%. Por otro lado, con el uso de NaOH al 4%, se obtuvo un porcentaje de supervivencia de 86.26% estimado por citometría de flujo, mientras que el recuento de colonias en placa obtenido fue menor al 1%.

Para la descontaminación con soluciones a pH ácido, para un tiempo de 20 minutos, se observó un rango constante en la recuperación de colonias en placas de agar para *M. chelonae* ubicándose en un valor inferior al 1% tanto para el ácido oxálico como para el ácido sulfúrico, mientras que la lectura realizada por citometría de flujo para la descontaminación con ácido oxálico se obtuvo un valor de 93.04% y para el ácido sulfúrico fue de 90.1%. Para el HPC los valores estimados por hidrólisis del FDA se ubicaron en 86.71% y para la siembra en placa de agar fue de 97.05%. (Figura 22)

Al prolongar el tiempo de incubación hasta 40 minutos se observó que para la concentración de NaOH al 2 y al 4%, la recuperación por siembra en placa fue inferior al 1% para ambas concentraciones, siendo significativamente distintos a los obtenidos por análisis de citometría de flujo donde los valores se ubicaron en 37.04% para la concentración de 2% y 77.98% cuando se empleó el NaOH al 4%. Con el uso de ácido oxálico y ácido sulfúrico se obtuvieron los siguientes valores 82.44% y 89.74% respectivamente, para la estimación de la hidrólisis del FDA por citometría de flujo. Con respecto al HPC a los 40 minutos la estimación de la viabilidad se ubicó en 66.75%, siendo significativamente distinto al obtenido por siembra en placas con agar donde el valor fue de 95.5% ($p < 0.05$). (Figura 22)

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. fortuitum*

En la figura 23, se observa los controles bacterianos empleado en la metodología de citometría de flujo para de *M. fortuitum*, descritos anteriormente de forma similar para *M. abscessus*.

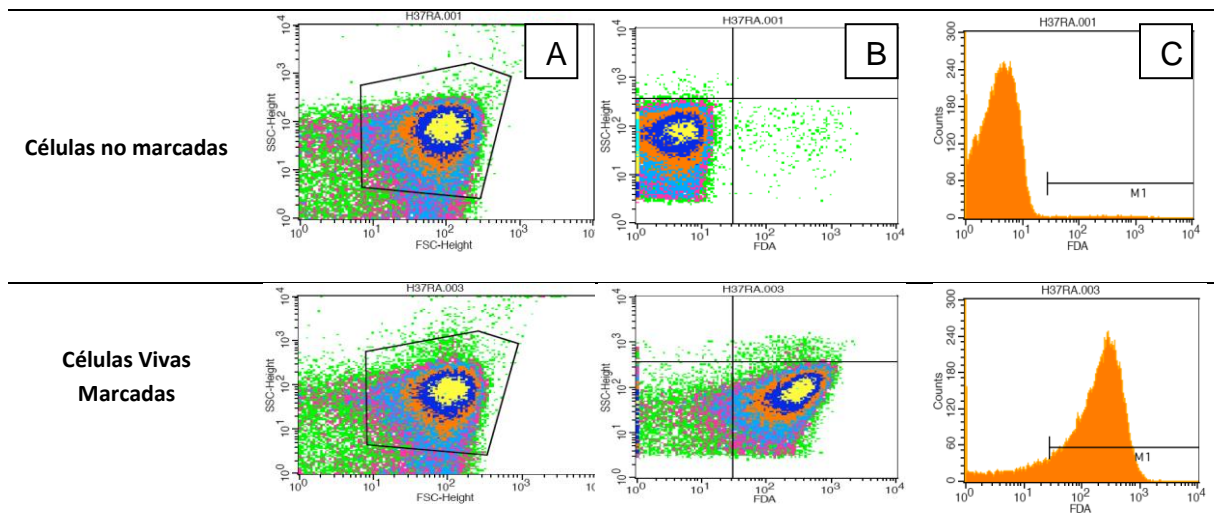


Figura 23. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo) y células vivas marcadas con FDA (control positivo).

La figura 24, muestra que existe un efecto negativo sobre la supervivencia de éste microorganismo posterior a un tratamiento con NaOH al 2% y 4%, debido a que se observó una disminución progresiva en la media de fluorescencia respecto a las células vivas marcadas en su totalidad ($p < 0.05$).

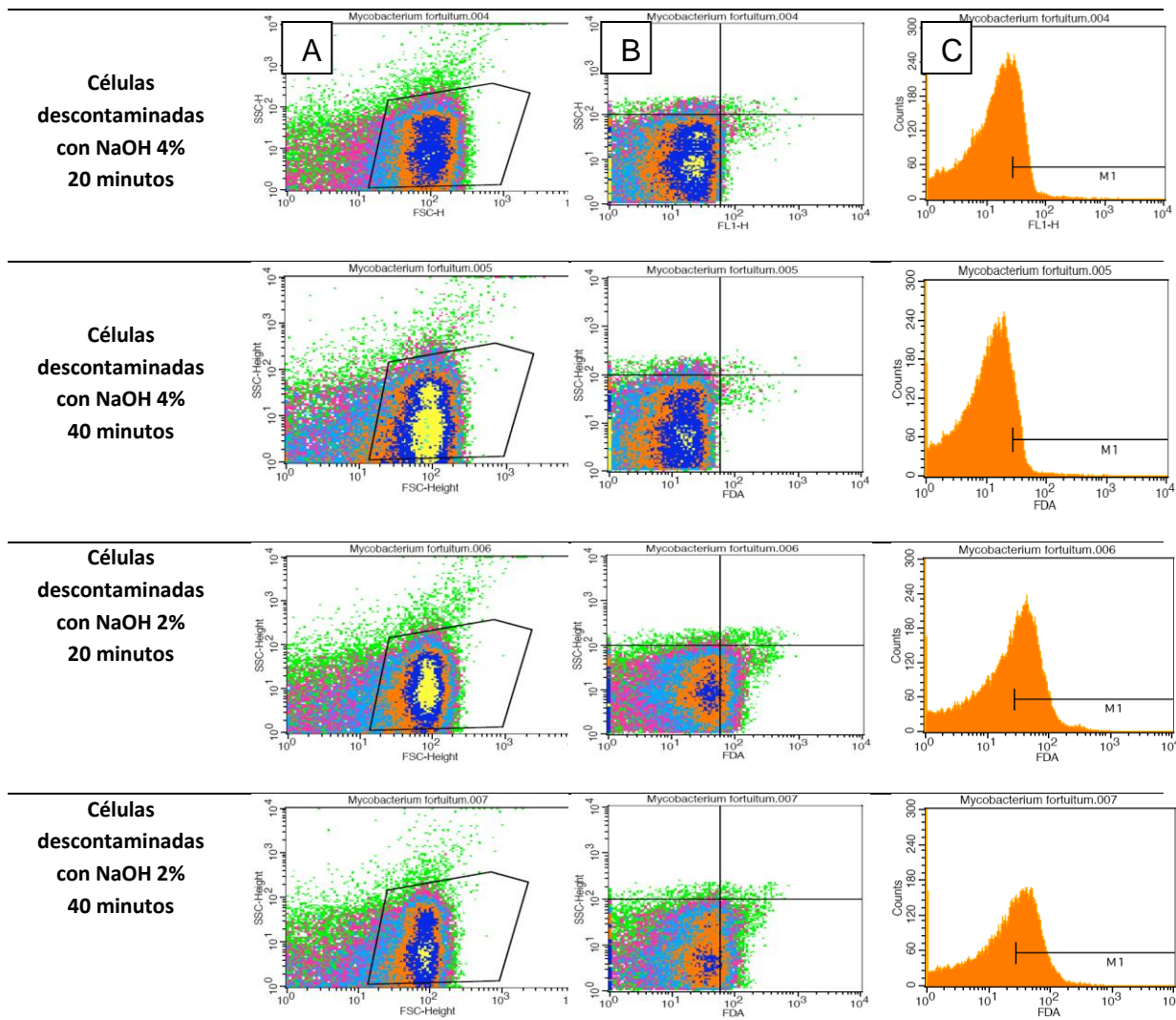


Figura 24. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. fortuitum*, empleando el agente descontaminante NaOH al 2% y 4%.

En la figura 25, está representada la estimación de la viabilidad celular para *M. fortuitum*, empleando la metodología de citometría de flujo para los agentes descontaminantes HPC, ácido oxálico y ácido sulfúrico. Por otro lado, se obtuvo una disminución de la media de fluorescencia con significancia estadística ($p < 0.05$), como consecuencia de la incubación de este microorganismo con los agentes descontaminantes.

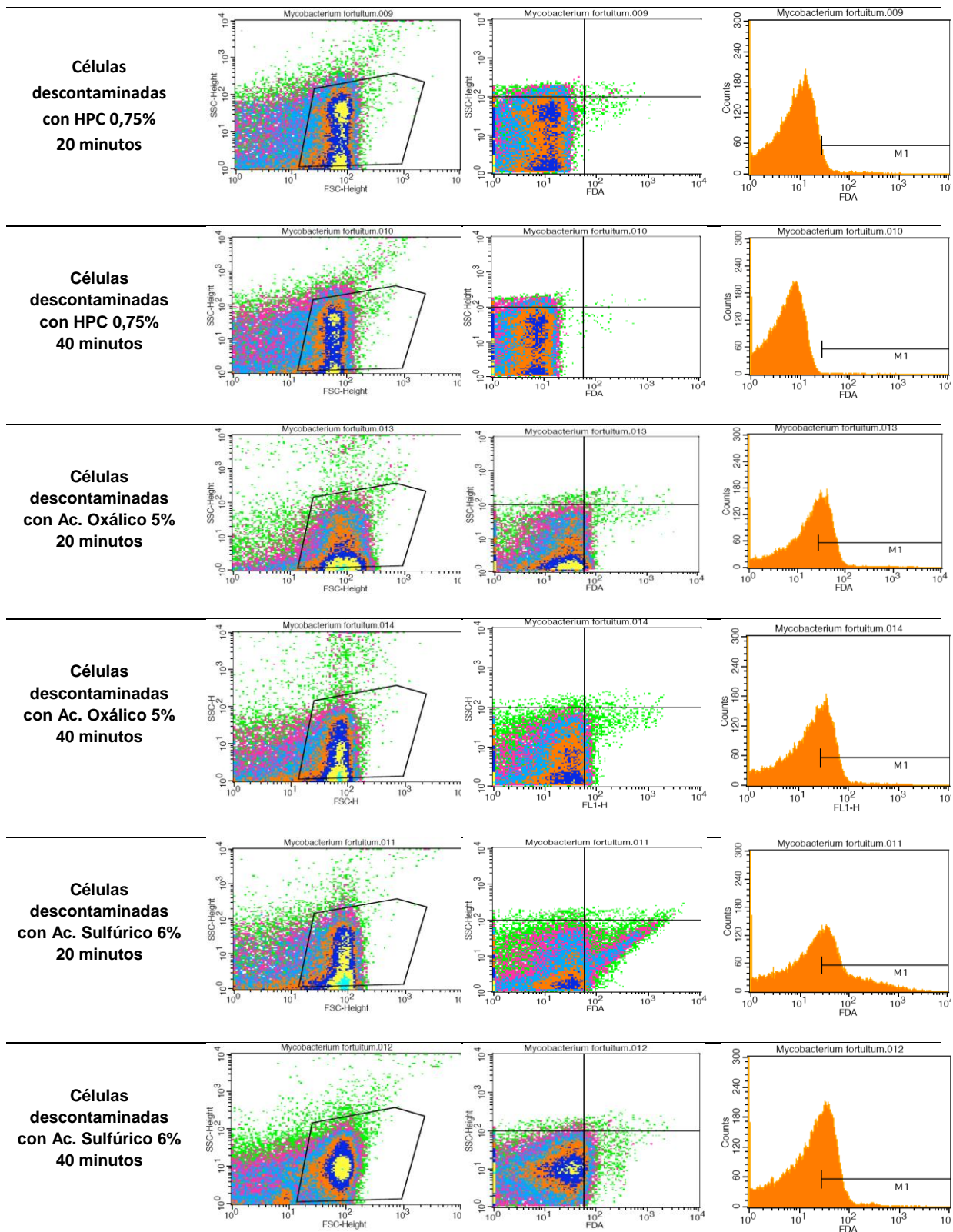
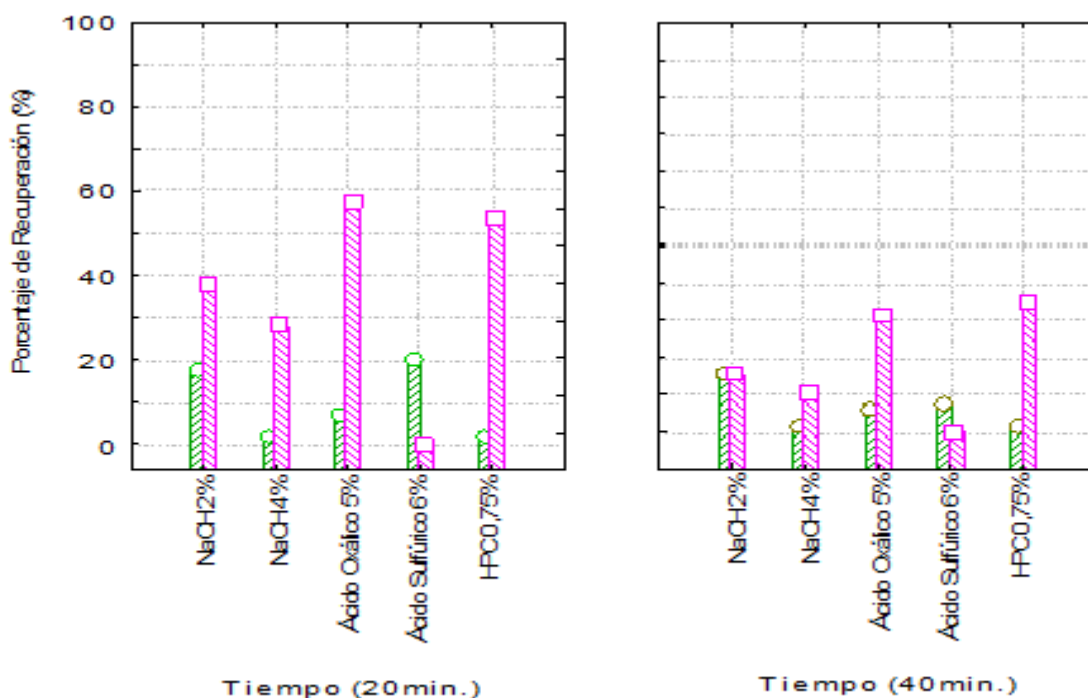


Figura 25. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. fortuitum*, empleando los agentes químicos HPC 0,75%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico al 6%.

En la figura 26, se muestra la comparación del porcentaje de recuperación de *M. fortuitum* empleando la metodología de siembra en agar (barras fucsias), en paralelo a la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de citometría de flujo (barras verdes), para los distintos agentes descontaminantes.



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%) 20 minutos		Porcentaje de recuperación (%) 40 minutos	
	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo
NaOH 2%	37,34	19,15	15,21	17,19
NaOH 4%	28,11	<1	9,95	<1
Ac. Oxálico 5%	56,9	8,52	30,69	7,22
Ac. Sulfúrico 6%	<1	20,7	<1	8,22
HPCO 0.75%	53,47	1,96	34,78	1,91

Figura 26. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para *M. fortuitum* por siembra en placa de agar y citometría de flujo. Para los tiempos: (26.A) 20 min., (26.B) 40 min.

Como se observó en la figura 26, al emplear NaOH al 2%, como agente químico descontaminante para un tiempo de 20 minutos se obtuvo un porcentaje de recuperación de 37.34% por la metodología de recuento en placas; siendo significativamente diferente al obtenido por el análisis de citometría de flujo donde el valor obtenido fue de 19.15% ($p < 0.05$). De igual manera, hubo variaciones estadísticamente significativas entre las dos técnicas comparadas para la concentración de NaOH al 4% ($p < 0.05$), siendo los mencionados 28,11% para la siembra en placas con agar e fue inferior al 1% el determinado por citometría de flujo.

Al realizar la descontaminación química con soluciones a pH ácido para el tiempo de incubación de 20 minutos, se observaron variaciones estadísticamente significativas entre la metodología de siembra en placa y la estimación de la hidrólisis del FDA realizada a través de análisis de citometría de flujo ($p < 0.05$), siendo el valor obtenido para el ácido oxálico de 56.9%, estimado por análisis de siembra en placas con agar y 8.52% para el análisis de citometría de flujo. Empleando ácido sulfúrico se obtuvo un porcentaje de recuperación inferior al 1% por recuento de colonias en placas y 20.7% para la estimación de la hidrólisis del FDA empleando el citómetro. Por último, el HPC no mostró cambios significativos en la estimación de la recuperación de *M. fortuitum* por siembra en placas con agar y citometría de flujo, siendo los valores obtenidos 53.47% y 1.96% respectivamente ($p > 0.05$). (Figura 26)

Al prolongar la incubación por 40 minutos con cada uno de los descontaminantes, se observó que para el NaOH al 2% existen diferencias entre las medias determinadas por siembra en placa y citometría de flujo siendo los porcentajes obtenidos 15.21% y 17.19% respectivamente ($p < 0.05$). Para la concentración de NaOH al 4%, se obtuvo un porcentaje de 9,95% por siembra en placa e inferior al 1% estimado por la hidrólisis del FDA, siendo las diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos ($p < 0.05$). (Figura 26)

Para la descontaminación con HPC durante 40 minutos los porcentajes obtenidos por siembra en placa (34.78%) y por citometría de flujo (1.91%) mostraron ser significativamente distintos ($p < 0.05$). En cuanto al ácido sulfúrico, se encontró que el porcentaje presenta variaciones significativas para las dos técnicas en estudio siendo el valor obtenido por recuento en placa inferior al 1% y de 8.22% cuando el análisis se realizó por citometría de flujo, para el agente químico ácido oxálico el porcentaje obtenido por siembra en placa de agar fue de 30,69% y por citometría de flujo fue 7.22%; no mostrando similitud estadística ($p < 0.05$). (Figura 26)

Comparación de agentes químicos descontaminantes para la recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra.

En la figura 27, se observa los controles bacterianos empleado en la metodología de citometría de flujo para de *M. tuberculosis* H37Ra, descritos anteriormente de forma similar para *M. abscessus*.

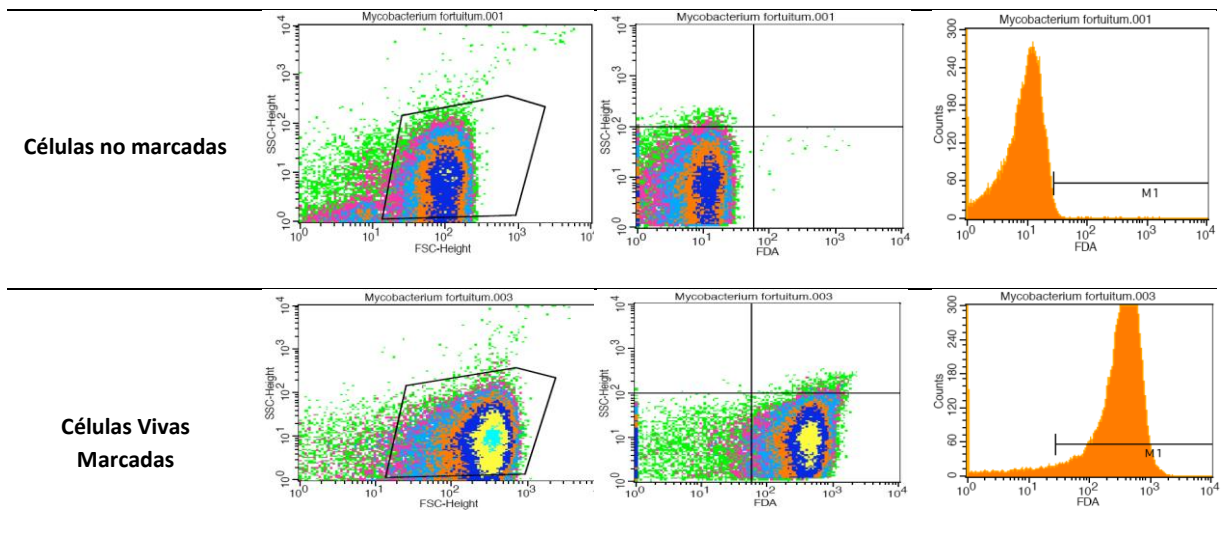


Figura 27. Análisis de citometría de flujo para las células vivas no marcadas (control negativo) y células vivas marcadas con FDA (control positivo).

La figura 28, muestra que existe un efecto negativo sobre la supervivencia de éste microorganismo posterior a un tratamiento con NaOH al 2% y 4%, debido a que se observó una disminución progresiva en la media de fluorescencia respecto a las células vivas marcadas en su totalidad ($p < 0.05$).

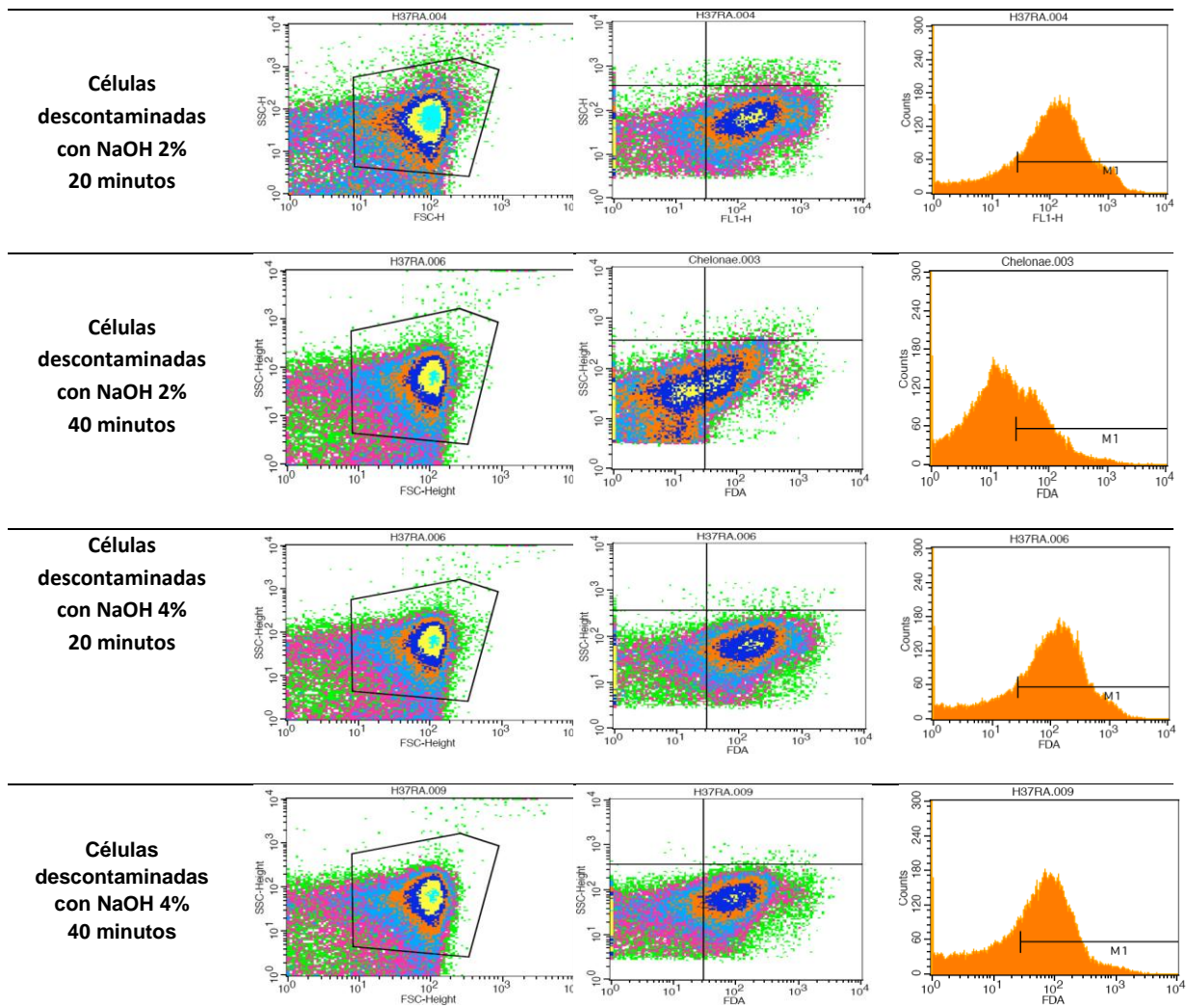


Figura 28. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. chelonae*, empleando el agente descontaminante NaOH al 2% y 4%.

En la figura 29, está representada la estimación de la viabilidad celular para *M. tuberculosis* H37Ra, empleando la metodología de citometría de flujo para los agentes descontaminantes HPC, ácido oxálico y ácido sulfúrico. Por otro lado, se obtuvo una disminución de la media de fluorescencia con significancia estadística ($p < 0.05$), como consecuencia de la incubación de este microorganismo con los agentes descontaminantes.

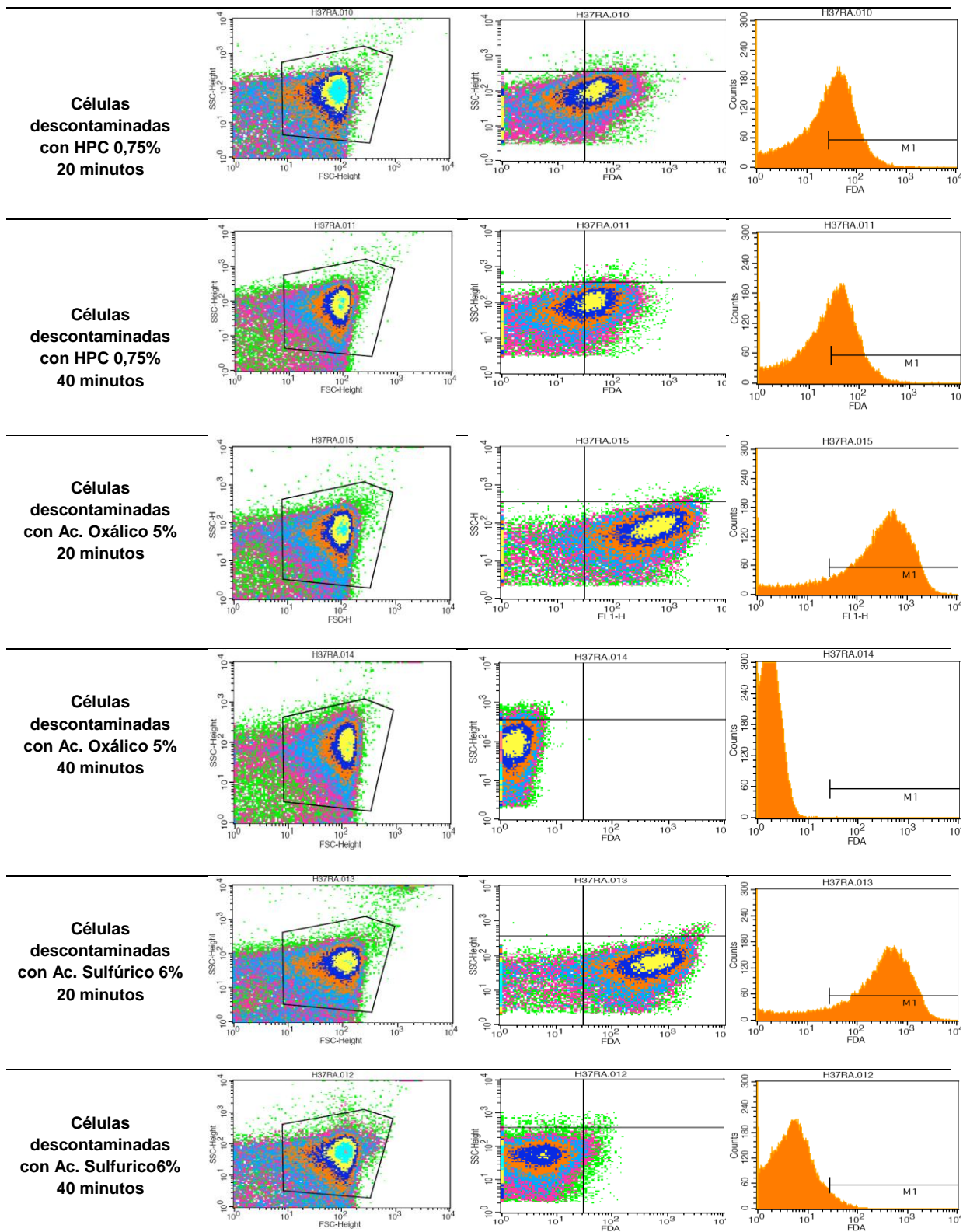
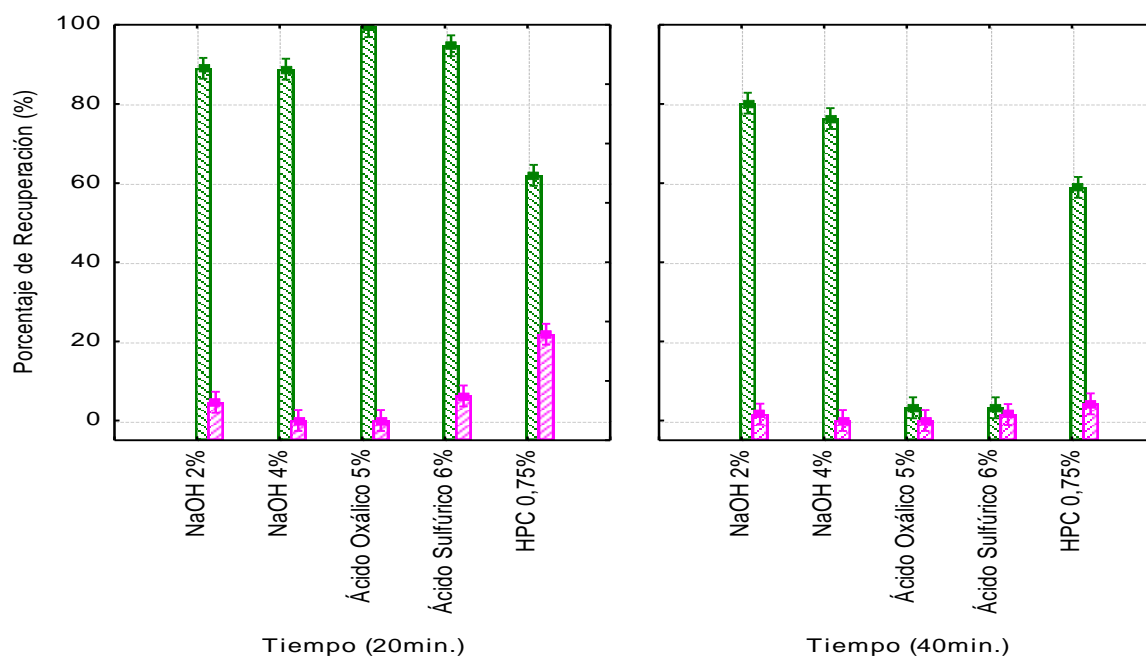


Figura 29. Análisis de citometría de flujo para la estimación del porcentaje de recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra, empleando los agentes químicos HPC 0,75%, ácido oxálico al 5% y ácido sulfúrico al 6%.

En la figura 30, se muestra la comparación del porcentaje de recuperación de *M. tuberculosis* H37Ra, para los distintos agentes descontaminantes, empleando la metodología de siembra en agar (barras fucsias), en paralelo a la estimación de la hidrólisis del FDA por análisis de citometría de flujo (barras verdes).



Agente descontaminante	Porcentaje de recuperación (%) 20 minutos		Porcentaje de recuperación (%) 40 minutos	
	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo	Siembra en placas con agar	Citometría de flujo
NaOH 2%	<1	89	<1	80,19
NaOH 4%	<1	88,77	<1	76,3
Ac. Oxálico 5%	<1	99,52	<1	<1
Ac. Sulfúrico 6%	<1	94,7	<1	3,22
HPC 0.75%	34.4	61,96	17.4	58,91

Figura 30. Comparación del porcentaje de recuperación obtenido para *M. tuberculosis* H37Ra por siembra en placa de agar y citometría de flujo. Para los tiempos: (30.A) 20 min., (30.B) 40 min.

Como se observó en la figura 30, al usar NaOH al 2 y al 4% como agente descontaminante para un tiempo de incubación de 20 minutos se observó que la recuperación en porcentaje de *M. tuberculosis* H37Ra fue inferior al 1% para la metodología siembra en placas con agar y mientras que por citometría de flujo se obtuvo un valor de 89%, estimado para una concentración de NaOH al 2%, mientras que para la concentración de NaOH al 4% el valor obtenido se ubicó en 88.77%; observándose diferencias estadísticamente significativas entre las metodologías en estudio ($p < 0.05$). Al emplear ácido oxálico y ácido sulfúrico se obtuvo un recuento de colonias en placas inferior al 1%, siendo estas variaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$), dado que el porcentaje obtenido por citometría de flujo fue de 94,7% para el ácido sulfúrico y de 61,96% para el ácido oxálico. Por otro lado, al emplear HPC el porcentaje de recuperación fue de 34.4% (siembra en placas con agar) y para el análisis de citometría 61,96%. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos metodologías empleadas para este agente químico ($p < 0.05$).

Cuando la incubación se prolongó por 40 minutos el porcentaje de recuperación con NaOH (al 2% y al 4%) fue inferior al 1% para la metodología de siembra en placas con agar, siendo estas variaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$), dado que el valor obtenido por citometría de flujo se ubicó en 80,19% para el NaOH al 2% y 76,3% para la concentración de NaOH al 4%. Para el ácido oxálico para las dos metodologías comparadas (siembra en placas y citometría de flujo) el porcentaje estimado se ubicó en un valor inferior al 1%. Con el HPC se obtuvo por recuento de colonias en placas de agar un valor de 17.4% siendo diferente estadísticamente al obtenido por citometría flujo ($p < 0.05$), donde el porcentaje mostrado fue inferior al 58,91%. (Figura 30)

DISCUSIÓN

Tradicionalmente, la susceptibilidad de las micobacterias a desinfectantes y antisépticos ha sido objeto de estudio con base en su estructura celular, composición y fisiología. Bello y col. (2004), esto demuestra el efecto diferencial de los agentes descontaminantes sobre la actividad micobactericida, caracterizándose principalmente por un menor efecto sobre las micobacterias cuando se emplean compuestos de amonio cuaternario.

Por medio de la metodología de siembra en placas con agar se lograron observar marcadas diferencias entre los distintos agentes químicos empleados, siendo el NaOH al 2 y al 4%, uno de los agentes descontaminante que reportó el menor porcentaje de recuperación para las micobacterias en estudio, donde *M. fortuitum* fue la especie más resistente ante este agente químico (figura 4), seguido de *M. tuberculosis* H37Ra (figura 5), por último, se encontró que las especies más sensibles ante este agente químico fueron *M. abscessus* y *M. chelonae* (figura 3). Los resultados mostrados para el NaOH son similares a los reportados por Buijtels y Petit (2005) que concluyeron que el tratamiento con NaOH afectaba negativamente la recuperación de micobacterias y por ende la solución descontaminante que se empleaba para el tratamiento de las muestras era un factor decisivo en la recuperación de micobacterias en el cultivo. Ratnam y col. (1987) también observaron que la tolerancia al álcali no era un rasgo constante entre todas las especies de micobacterias. Igualmente, Sisco y col. (2006), demuestran que el NaOH compromete seriamente la recuperación de micobacterias de crecimiento rápido.

En la actualidad se conocen pocos estudios sobre el mecanismo de acción diferencial del NaOH sobre las micobacterias, pero posiblemente se deba a un efecto similar al descrito por Iañéz (1998), donde la saponificación de los lípidos de la envoltura externa de las micobacterias, ocurría por interacción de los iones OH^- , como sucede con otras bacterias y virus con envoltura, originando la

destrucción de la membrana celular como consecuencia de la desorganización de la estructura del peptidoglicano, ocasionando un desequilibrio osmótico.

Otro de los agentes descontaminantes en estudio fue el ácido oxálico al 5%, el cual por medio de la metodología de siembra en placa reportó una recuperación significativamente mayor a la obtenida con el uso de NaOH para la mayoría de las especies de micobacterias en estudio, siendo *M. chelonae* y *M. tuberculosis* H37Ra las más sensibles ante el ácido oxálico. Estos resultados guardan relación a los reportados por Yeboah – Manu, Bodmer y col. (2004), quienes ensayaron el uso del ácido oxálico como agente descontaminante y lo compararon con NaOH mediante los métodos de Petroff y N- acetil-L cisteína- NaOH para el aislamiento de *M. ulcerans*, obteniendo como resultado una mayor recuperación con el ácido oxálico en relación a aquellos métodos que emplean NaOH.

Por otro lado, el uso de ácido sulfúrico al 6% como agente descontaminante obtuvo la menor recuperación en placas con agar en relación al resto de los descontaminantes, en cada una de las tres especies de micobacterias atípicas ensayadas (*M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*), mientras que *M. tuberculosis* H37Ra demostró ser la especie en estudio más resistente al efecto de este agente descontaminante. Estos resultados no guardan relación con los reportados por Buijtel y Petit (2005) que concluyeron que el tratamiento con ácido sulfúrico no muestra diferencias significativas sobre la recuperación de *M. tuberculosis* en relación a las micobacterias atípicas.

Pese a que los agentes químicos ácido oxálico y ácido sulfúrico presentan mecanismos de acción similares, fundamentados en la desnaturalización o al menos inhibición de la actividad de enzimas y moléculas ácido-lábiles presentes en la membrana, los resultados obtenidos en este estudio sugieren, que el efecto micobactericida de la solución de ácido sulfúrico en relación al ácido oxálico, es mucho más pronunciado en micobacterias atípicas en comparación a *M. tuberculosis* H37Ra, tal vez esto podría estar relacionado a una concentración mínima bactericida (CMB) diferencial entre estos dos agentes descontaminantes.

El HPC es el agente descontaminante que ofreció el mayor porcentaje de recuperación de micobacterias por siembra en placa. Varias han sido las investigaciones que describen este hecho, como es el caso de Thornton y col. (1998), donde demuestran que es posible una mayor recuperación de *M. tuberculosis* y micobacterias atípicas empleando compuestos de amonio cuaternario en relación al uso de NaOH como agente descontaminante. Los resultados obtenidos reflejan que las micobacterias atípicas estudiadas no presentan efecto negativo por el aumento en el tiempo de incubación con HPC guardando concordancia por lo descrito por Smithwick y col. (1975) donde el aumento en la incubación con compuestos de amonio cuaternario hace posible la recuperación de micobacterias atípicas posterior a un lapso de 24 horas. La única excepción a lo planteado fue observada en *M. tuberculosis* H37Ra, donde los resultados indican que el HPC afecta negativamente a esta micobacteria al prolongar su exposición al amonio cuaternario.

Diversas investigaciones han estudiado el mecanismo de resistencia de las micobacterias a los compuestos de amonio cuaternario. Johnston y col. (2000) describieron que durante el curso de acción de estos agentes ocurre un fenómeno llamado "self quenching" en el cual la inactivación del agente ocurre debido a una saturación del mismo por parte de las propias bacterias. Esta inactivación puede ser de origen físico o químico. Una vez que ocurre la lisis del microorganismo por el agente químico, varios componentes emulsificantes de la membrana y la célula, como fosfatidiletanolamina y triacilglicéridos, son liberados y saturan al agente reduciendo su actividad micobactericida. Esta teoría explica la resistencia de las micobacterias a los compuestos de amonio cuaternario, ya que si bien una parte de la población micobacteriana muere, la liberación de estos compuestos emulsificantes inactivan el agente químico permitiendo la sobrevivencia de la mayoría de las micobacterias. Levy (2002) propuso otro mecanismo llamado "active efflux", en el cual una o varias proteínas de la membrana plasmática actúan como bombas para la expulsión de los agentes químicos hacia el exterior de la célula bacteriana. Este tipo de bombas dependientes de protones se han descrito

en *M. smegmatis* y parecen mediar no sólo la resistencia a detergentes sino también parecen estar implicadas en la resistencia a antibióticos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la sensibilidad de algunas especies estudiadas se ve determinada principalmente por la relación del tiempo de incubación y el agente químico descontaminante empleado. Este comportamiento podría deberse a la compleja composición de la pared celular de las micobacterias y su relación con la CMB, donde de acuerdo al descontaminante empleado sobre la bacteria le confiere mayor o menor resistencia a los agentes químicos descontaminantes.

Se pudo determinar que el medio tripticasa de soya, pese a ser un medio rico en nutrientes que permite el crecimiento de micobacterias atípicas, no es apto para el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra, indicando la ausencia de un suplemento nutricional necesario para el crecimiento de esta micobacteria. Los resultados encontrados sugieren que este factor esencial está presente en el medio Lowestein-jensen y que posiblemente puede tratarse de la albumina, el cual es uno de los componentes de éste medio de cultivo, por tanto, se propone que la adición del suplemento nutricional OAD (ácido oleico, albumina y dextrosa), en el medio tripticasa de soya puede favorecer el crecimiento del *M. tuberculosis*.

Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes recuentos de colonias en placas con agar, realizados de forma independiente y en paralelo con las metodologías de citometría de flujo y fluorimetría. Cabe destacar, que las pequeñas variaciones observadas se encontraron dentro de la desviación estándar propia de la metodología de siembra en placas con agar, lo que refleja su alta reproducibilidad.

Los valores obtenidos en la metodología de fluorimetría y siembra en placas mostraron diferencias significativas cuando se realizó la descontaminación con ácido oxálico para *M. chelonae*, este efecto podría ser atribuible a la generación de una subpoblación no cultivable en medio tripticasa de soya pero con una

condición metabólicamente activa, capaz de hidrolizar el FDA a fluoresceína posterior a la descontaminación. Adicionalmente, la metodología de recuento colonias en placas con agar, mostró discrepancia con la metodología de fluorimetría cuando se empleó el HPC como agente químico sobre *M. abscessus*, este efecto puede estar relacionado al apantallamiento generado por bajas concentraciones de HPC sobre la señal de fluoresceína.

Entre las metodologías usadas para comparar el porcentaje de recuperación de las micobacterias, la citometría de flujo fue la técnica que reveló la mayor discrepancia, dado que se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación por esta metodología en relación a los resultados expuestos por siembra placas con agar, para *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. tuberculosis* H37Ra, por el contrario, se obtuvo un menor porcentaje de recuperación para *M. fortuitum* en comparación al recuento de colonias en placas con agar. Estos resultados no guardan relación con los reportados en las investigaciones realizadas por Bownds y col. (1996) quienes plantearon que el uso de la citometría de flujo y la tinción con FDA constituye un método rápido de estimación de la viabilidad celular en micobacterias. El porcentaje de recuperación obtenido por la técnica de citometría de flujo sugiere que algunas bacterias a pesar de ser afectadas por el agente descontaminante, sus esteras se encuentran metabólicamente activas, por lo que no guarda concordancia a los descrito por Burdz y col. (2003), ya que ellos afirman que la hidrólisis del FDA en micobacterias se ve inhibida por la presencia de agentes antimicrobianos.

Otra posible causa a la discrepancia obtenida en los resultados de las metodología de siembra en placas con agar y la citometría de flujo, podría deberse a una mayor sensibilidad en la lectura por partícula que se realiza en los citómetros de flujo, por otro lado, el solapamiento de las colonias como consecuencia del crecimiento bacteriano podría estar generando una subestimación del porcentaje de recuperación para *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. tuberculosis* H37Ra; sin embargo, para *M. fortuitum* no encontramos una

explicación factible para la discordancia obtenida en los porcentajes de recuperación. A través este estudio se pudo constatar que en Venezuela, no hay mucha experiencia en la utilización del citómetro de flujo para el conteo de poblaciones bacterianas, lo que dificulta la interpretación de los resultados experimentales obtenidos. Esta observación, lejos de ser desalentadora, permite el diseño de nuevos estudios para la estandarización de la metodología.

Actualmente, la siembra en placas con agar es considerada el estándar de oro empleado para la determinación del título bacteriano en micobacterias, teniendo como ventaja la observación de la morfología de las colonias bacterianas presentes en una determinada muestra. Sin embargo, presenta la desventaja de requerir un período prolongado de tiempo, que va de 7 a 12 días, para emitir un resultado. En la presente investigación, los valores obtenidos a través del análisis de fluorimetría demuestran que la estimación de la viabilidad celular para las micobacterias en estudio, puede obtenerse en un lapso de 4 horas después que han sido sometidas al agente descontaminante, sustentado en la alta similitud mostrada con la metodología de siembra en placas con agar.

En el presente estudio se obtuvo el porcentaje de recuperación de micobacterias con los diferentes agentes descontaminantes y se reportaron resultados preliminares que permitirán continuar esta investigación, mediante el ensayo de otras cepas del género *Mycobacterium* y el uso de otros agentes descontaminantes reportados en la literatura. Adicionalmente, la estandarización de la hidrólisis del FDA por análisis de fluorimetría abre la posibilidad a la aplicación de ésta técnica para ser utilizada en pruebas resistencia, acortando el tiempo para la obtención de los resultados.

CONCLUSIONES

Una vez comparado el efecto de los agentes químicos descontaminantes se observó que el NaOH y ácido sulfúrico tiene un efecto negativo sobre la recuperación de micobacterias, confirmando la alta sensibilidad de estas especies a dichos agentes descontaminantes, y en base a esto no son recomendados para ser utilizados en muestras con sospecha de infección por micobacterias.

El HPC fue el agente descontaminante que permitió la mayor tasa de recuperación de micobacterias, en este orden de ideas se considera que la adaptación de este agente químico a protocolos de aislamiento de micobacterias podría traer grandes beneficios en el diagnóstico de infecciones producidas por las mismas.

El tiempo de incubación de la muestra con el agente descontaminante debe ser estrictamente regulado, por cuanto la recuperación de micobacterias muestra una significativa reducción en el porcentaje de recuperación al prolongar el tiempo de exposición al NaOH, ácido sulfúrico y en menor proporción el ácido oxálico. El HPC fue el agente químico que no produjo una reducción significativa en la recuperación de micobacterias al prolongar el tiempo de exposición, por lo que su uso como agente descontaminante permite que el tiempo de incubación pueda ser ajustado de forma menos estricta.

La metodología de fluorimetría, fundamentada en la hidrólisis del FDA, para la estimación de viabilidad celular se presenta como una alternativa rápida para tal fin, ya que permite reducir el tiempo necesario a tan sólo 4 horas para obtener un resultado, con una alta similitud referente a los valores obtenidos por siembra en placas con agar. En contraste, la citometría de flujo reveló grandes discrepancias cuando se comparó con la siembra en placas con agar, por lo que no se presenta como una herramienta útil para la estimación de viabilidad celular.

RECOMENDACIONES

- Debido al efecto negativo que presentan el NaOH y ácido sulfúrico sobre las micobacterias, no deben ser utilizados como agentes descontaminantes sobre muestras clínicas con sospecha de la presencia de micobacterias.
- Es importante regular el tiempo de incubación con los diferentes agentes descontaminantes, ya que es un factor crítico en la recuperación de la micobacterias.
- Se recomienda realizar las lecturas con FDA en solución tampón a pH 7 y sobre medios que no sean nutritivos debido a que la estabilidad del compuesto es baja y se podría originar un efecto de autohidrólisis.
- Es necesaria la neutralización, bien sea química o por dilución, de los agentes químicos descontaminantes antes de estimar el porcentaje de recuperación, con la finalidad de atenuar el efecto residual sobre las bacterias.

BIBLIOGRAFIA

Ahlstrom, B., Thompson, R. y Edebo, L., 1999. Loss of bactericidal capacity of long- chain quaternary ammonium compounds with protein at lowered temperature. *APMIS*, **107**: 606-614.

Alexander, K., Laver P., Michel A., Williams, M, van Helden, P., Warren, R., Gey van Pittius C., 2010. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis.* **16(12)**:2024.

Bello, T., Bandes, M., De Waard, J. y Rivera, I. 2004. Actividad micobacteriana de un grupo de desinfectantes utilizados en la clínica y el Laboratorio. Laboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina. Caracas- Venezuela. Pp. 90.

Bownds, S., Kurzynski, T., Norden, M., Dufek, J. y Schell, R., 1996. Rapid Susceptibility Testing for Nontuberculosis Mycobacteria Using Flow Cytometry. *J Clin Microbiol*, **34(6)**:1386-90.

Bownds, S., Kurzynski, T., Norden, M., Dufek, J. y Schell, R. 1996. Rapid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) by flow cytometry. *J Clin Microbiol*, **33(5)**:1231-1237.

Brown, M.H. y Mayes, T. 1980 The Growth of microbes at low pH values. En: Microbial growth and survival in extremes of environment. Gould, G.W. y Corry, J.E.L. Ed. Academic Press. Estados Unidos. 71-98 pp.

Buijtels P. y 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.

Burdz T.V.N., Wolfe J., Kabani A. 2003. Evaluation of sputum decontamination methods for *Mycobacterium tuberculosis* using viable colony counts and flow cytometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **47**: 503-509.

Casal, M. y Casal, M. 2000. Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. *Enf. Emerg.*, **2 (4)**: 220-230.

Casal M., Guerrero A., Martín N, Moreno S. y Nogales M., 1999. Procedimientos en microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España.

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 (6)**: 296-298.

Detección e Identificación de Micobacterias de Importancia Médica. Manual de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Brasil; 2004.

Fernández, F., Esteban, J., González, J. y Palacios, J. 1999. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España.

Jhonston, E., Simons, A., Lambert, R., 2000. One Explanation for the variability of bacterial suspension test. *Journal of Applied Microbiology*. **88**: 237-242

Konemam, e., Allen, S., Janda, W., Scherckenberger, P., 1999. Diagnostico Microbiológico. Texto y Atlas color. 5ta Edición. Argentina: Editorial Panamericana.

Kleeberg, H., Koornhof, H: y Palmhert, H., 1980, Laboratory Manual of Tuberculosis Methods. Tuberculosis Research Institute of their South African Medical Research Council. Preteria.

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

Levy, S., 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, **92**:65-71.

Liu, J., Glifton, E., Barry, I. y Nikaido. 1999. Cell wall: Physical Structure and permability. Pp. 220- 238.

Mcbain, A., Ledder, R., Moore, L., Catrenich, C. y Gilbert, P. 2004. Effects of quaternary-ammonium based bacterial community dynamics and suspctibility. *Appl Environ Microbiol.* **70(6)**: 3449-3456.

Narváez I., Jae Kim S., Frieden T., Laszlo A. y col. Laboratory Services in Tuberculosis Control. Organización Mundial de la Salud 1998; 37-54.

Pumarola, M., Microbiología y Parasitología Médica, 2005. Editorial Elsevier, Segunda Edición. España.

Ratnam, S., Stead, F. y Howes, M. 1987. Simplified Acetylcistein – Alkali Digestion – Descontamination Procedure for Isolation of Mycobacteria from Clinical specimens. *J. Microbiol.* 25(8):1428-1432.

Sisco, M., Bello, T., De Waard, J. 2006. Evaluacion de tres agentes químicos descontaminantes para la recuperacion de micobacterias no tuberculosas. Laboratorio de tuberculosis. Instituto de Biomedicina. Caracas

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

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

Smithwick, R., Stratigos, C. y David, H. 1975. Use of Cetylpiridinum Cloride and Sodium Chloride for the Decontamination of Sputum Specimens that are transported to the Laboratory for de Isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* **1(5)**: 411-413.

Thornton, C., MacLellan, K., Brink, T., Passen, S. 1998. In vitro comparison of NALC-NaOH, Tween 80 and C18-Carboxypropylbetaine for Processing of specimens for Recovery of Mycobacteria. *J. Microbiol.*; **36(12)**: 3558-3566.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, 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

Wolinsky, E., Davis, B., Dublecco, R., Eisen, H. y Ginsberg, H. 1990. Mycobacterium. En: Tratado de microbiología. Tercera edición. México. Salvat.: 589-604.

Yeboah-Manu, D., Bodmer, T., Mensah-Quainoo, E., Owusu, D. y col. 2004. Evaluation of Decontamination Methods and Growth Media for Primary Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from Surgical Specimens. *J. Microbiol Methods.*, **42 (12)**: 5875-5876.

Consulta en línea

<http://www.cat.cc.md.us/bio14/lecguides/unit/prostruct/u1fi11.html>. Consultada: 24 de septiembre de 2009.

<http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/>. Consultada: 28 de octubre de 2008.

<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>. Consultada: 01 de octubre de 2010.

lañéz, E. 1998. Acciones de los agentes químicos sobre las bacterias (http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-iañez/17_micro.html. Consulta: 18 de septiembre de 2010).