

# **Susceptibilidad de *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium kansasii* frente a tres soluciones germicidas**

ORIANI, D.S.<sup>1</sup> . SAGARDOY, M.A.<sup>2</sup>

## **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad *in vitro* de nueve micobacterias no tuberculosas frente a tres agentes antimicrobianos de amplio uso. Las micobacterias fueron aisladas de muestras de suelos de la provincia de La Pampa (Argentina). Se utilizaron tres especies ambientales (*Mycobacterium fortuitum*, *M. phlei* y *M. kansasii*), tres agentes químicos (formaldehído 2% y 4 %, fenol 3% y 5% y alcohol 70%) y dos tiempos de exposición (25 min y 45 min). Las micobacterias eran sólo resistentes al formaldehído 2% después de 25 min de exposición. Los valores de reducción decimal (D) calculados con ese tratamiento mostraron que las cepas tenían grandes diferencias de susceptibilidad al formaldehído 2%. Sin embargo, todas las micobacterias fueron eliminadas cuando se usó formaldehído 4%, fenol 3% y 5 % y alcohol 70% (25 min). Es necesario continuar valorando otros agentes germicidas y sus efectos frente a *Mycobacterium bovis* con el objeto de encontrar desinfectantes efectivos para instalaciones y aguadas, contribuyendo de esta forma en el control de la tuberculosis de los rodeos.

*Palabras clave:* (micobacterias atípicas), (agentes antimicrobianos).

<sup>1</sup>Departamento de Epizootiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Pampa, <sup>2</sup>Departamento de Agronomía . Universidad Nacional del Sur.

Recibido: septiembre 2004 - Aceptado: mayo 2005 - Versión on line: mayo 2005

## SUMMARY

### **Susceptibility of *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium kansasii* to three different germicide solutions**

An investigation was carried out to measure the *in vitro* susceptibility of opportunistic mycobacteria to three antimicrobial agents. Field strains of nontuberculous mycobacteria were obtained of soil samples from La Pampa province (Argentina). Strains of the following species were tested: *Mycobacterium fortuitum*, *M. phlei* and *M. kansasii*. The antimicrobial agents were: 2% and 4% formaldehyde solutions, 3% and 5% phenol solutions and 70% alcohol solution. At 20°C, suspensions of the test strains were exposed to the germicides and samples were taken at defined intervals (25 min and 45 min) to determine the concentration of survivors. From these data, the decimal reduction times (D) were calculated for each test strain. The results obtained indicated that the nontuberculous mycobacteria were resistant to formaldehyde 2% during 25 min. The D values found revealed considerable differences in the chemical susceptibilities of the test strains. However, all the tested strains were susceptible to formaldehyde 4%, phenol solutions, and alcohol solution 70%. It is necessary to continue evaluating other germicide agents and their effects on *Mycobacterium bovis* in order to find effective disinfectants for animal waters and field facilities, thus contributing to the control of tuberculosis in cattle.

*Key words:* (atypical mycobacteria), (antimicrobial agents).

## INTRODUCCIÓN

Las micobacterias que provocan tuberculosis en el hombre y en el ganado integran el complejo tuberculosis, siendo el agente más perjudicial para la salud humana el *M. tuberculosis*. Esa bacteria tiene un efecto devastador en el mundo en desarrollo, que es donde se producen el 95% de los casos de tuberculosis humana<sup>17</sup>. Las micobacterias que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis* son reconocidas como micobacterias no tuberculosas (MNT) o micobacterias atípicas; dentro de ese grupo existen especies oportunistas que pueden causar una enfermedad similar a la tuberculosis en personas y animales inmunosuprimidos<sup>7</sup>. Las infecciones por MNT no se transmiten comúnmente por contacto entre personas, sino que los huéspedes susceptibles la adquieren por

ingestión, inhalación e inoculación a partir del ambiente<sup>6</sup>. La tasa de aislamientos de MNT en pacientes humanos se incrementó en la década pasada<sup>8</sup>, siendo el grupo de mayor riesgo los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana<sup>19</sup>. Las micobacterias atípicas son agentes responsables de infecciones nosocomiales, actuando como reservorio de las mismas las fuentes de aguas hospitalarias o municipales<sup>18</sup>. La importancia de las micobacterias ambientales en medicina veterinaria radica en que las mismas pueden ser aisladas a partir de secreciones del tracto respiratorio y de órganos internos con lesiones granulomatosas compatibles con tuberculosis, pudiendo, además, desencadenar respuesta paraespecífica en el diagnóstico de la tuberculosis por intradermorreacción.<sup>9</sup> Estas situaciones motivan a las autoridades sanitarias a prestar una

mayor atención a este grupo de patógenos oportunistas, presentes en el medio ambiente, y a renovar el interés por estudiar su ecología, elucidando el mecanismo de infección a partir de fuentes ambientales <sup>4</sup> y los posibles agentes químicos, que pueden ser usados con éxito en la desinfección de instrumental hospitalario<sup>10</sup>.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto germicida de tres compuestos químicos sobre micobacterias ambientales que fueron aisladas de suelos de la provincia de La Pampa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Micobacterias no tuberculosas y suelos.** El trabajo se realizó con nueve cepas de MNT

(cuatro *M. fortuitum*, tres *M. phlei* y dos *M. kansasii*) aisladas de distintos suelos de la provincia de La Pampa. Las técnicas utilizadas para aislar las micobacterias de los suelos y caracterizarlas fueron descritas en un trabajo anterior <sup>14</sup>. En el Cuadro 1 se presentan las micobacterias estudiadas y algunas propiedades de los suelos a partir de las cuales fueron aisladas. Los suelos tenían una textura entre arenosa y arenoso franco con un amplio contenido de carbono (rango = 2,78-16,45 g kg<sup>-1</sup>) y materia orgánica (rango = 0,19-1,20 g kg<sup>-1</sup>). El pH de los suelos osciló entre 7,0-8,9.

**Preparación de las suspensiones celulares.** Las micobacterias fueron inicialmente cultivadas en el medio de Löwenstein-Jensen (LJ) a 37°C

Cuadro 1. Micobacterias no tuberculosas y propiedades de los suelos a partir de los cuales fueron aisladas (La Pampa, Argentina)\*.

MNT (Lugar del aislamiento)	Textura del suelo	C g kg <sup>-1</sup>	Nt g kg <sup>-1</sup>	C/Nt	pH	Pe g kg <sup>-1</sup>	CE DS m <sup>-1</sup>
<i>M. fortuitum</i> 2 (Agustoni)	AF	14,45	1,18	12,20	7,0	50,40	2,03
<i>M. fortuitum</i> 28 (Salitral Negro)	AF	12,94	1,01	12,80	8,0	31,20	1,67
<i>M. fortuitum</i> 35 (Chical-Có)	A	3,12	0,22	14,18	8,9	7,90	0,48
<i>M. fortuitum</i> 39 (Jaguel del Monte)	A	5,77	0,59	9,78	7,0	43,80	0,55
<i>M. phlei</i> 6 (Jacinto Arauz)	FA	16,45	1,20	13,70	8,1	17,80	0,88
<i>M. phlei</i> 36 (Casa de Piedra)	A	3,00	0,20	15,00	8,4	9,40	2,55
<i>M. phlei</i> 42 (Limay Mahida)	A	2,78	0,19	14,63	8,5	16,10	0,49
<i>M. kansasii</i> 15 (Puelches)	FA	8,97	0,70	12,81	7,9	24,90	2,49
<i>M. kansasii</i> 34 (Agua de Torres)	A	5,34	0,44	12,14	8,5	11,30	5,46

\* AF: arenoso franco; A: arenoso; FA: franco arenoso; C: carbono orgánico; Nt: nitrógeno total; Pe: fósforo extractable; CE: conductividad eléctrica.

durante 15 días <sup>12</sup>. A continuación el cultivo era homogeneizado en agua destilada estéril (ADE) (10 mg/ml) durante 1 min. Las células eran centrifugadas, lavadas tres veces con ADE, resuspendidas, y diluídas con ADE hasta tener una concentración, de acuerdo con la escala de McFarland, próxima a 10<sup>9</sup> micobacterias/ml. Esa suspensión bacteriana era utilizada para preparar diluciones decimales, y usada para determinar el número de células viables/ml.

**Crecimiento y estudios de resistencia a germicidas.** Para determinar los modelos de resistencia de las micobacterias a tres germicidas (formaldehído 2% y 4%; fenol al 3% y 5% y alcohol 70%), se utilizaron tubos de centrifuga plásticos estériles con tapa rosca. Para ello, se colocaron 5 ml de la solución del germicida conjuntamente con 5 ml de una suspensión de 10<sup>9</sup> micobacterias ml<sup>-1</sup>. Los tubos eran incubados a 20°C, utilizando dos tiempos de exposición para cada agente químico estudiado: 25 min y 45 min. A continuación, cada tubo se centrifugó a 3500rpm durante 15 min; el sedimento se lavó tres veces con ADE, se resuspendió y se sembró en Agar Mueller Hinton para determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC ml<sup>-1</sup>) sobrevivientes a la acción de cada agente químico estudiado. Para ello se utilizó el método de las diluciones decimales con diseminación en superficie, sembrando cuatro placas/dilución (0,1 ml placa<sup>-1</sup>). Las placas se incubaron a 37°C durante 15 días. Todos los estudios se realizaron por triplicado y utilizando, para cada cepa investigada, un cultivo de la micobacteria donde no se agregaba el germicida (testigo). Para cuantificar la sensibilidad de cada micobacteria a los germicidas estudiados se calculó el tiempo de reducción decimal (D) o sea el tiempo necesario para reducir diez veces la población de cada micobacteria a una temperatura determinada <sup>1</sup>.

## RESULTADOS

Todas las MNT eran sensibles a la acción microbicida del fenol 3% y 5%, formaldehído 4% y alcohol 70% después de 25 min de exposición. La supervivencia de las micobacterias en presencia de formaldehído 2% fue diferente. En la Figura 1 se presentan los modelos de resistencia de las nueve micobacterias atípicas, aisladas de suelos pampeanos, después de 45min de exposición al formaldehído 2%. Siete de las nueve MNT fueron eliminadas en ese tiempo de contacto con el germicida, y las cuatro cepas de *M. fortuitum* no desarrollaron en el medio Mueller-Hinton luego de estar en contacto con el germicida. Las MNT resistentes al formaldehído 2% desarrollaron colonias de menor tamaño que las no tratadas con dicho agente, desconociéndose las causas de estos cambios fenotípicos.

En el Cuadro 2 se presentan los valores de reducción decimal (D) de las MNT tratadas con formaldehído 2% a 20°C durante 25 min. Los valores de D para *M. phlei* 36 y *M. kansasii* 34 no fueron determinados, debido a que no se observó una clara reducción en el número de UFC después de 25 min de exposición al formaldehído 2%. En dos cepas, *M. fortuitum* 28 y *M. kansasii* 15, se produjo una disminución de 5,77 y 5,0 unidades log, respectivamente, y en otras dos micobacterias, *M. phlei* 36 y *M. kansasii* 34, no se detectaron cambios significativos en el número de UFC ml<sup>-1</sup>, o sea que esas dos micobacterias fueron las más tolerantes al formaldehído 2%. Además, tres cepas sufrieron reducciones superiores a 100 veces en su concentración (*M. phlei* 42; *M. fortuitum* 28 y *M. kansasii* 15), dos cepas superiores a 10 veces (*M. fortuitum* 2 y *M. fortuitum* 35) y dos cepas reducciones inferiores a 10 veces (*M. phlei* 6 y *M. fortuitum* 39). Finalmente, si la inversa de D nos indica la

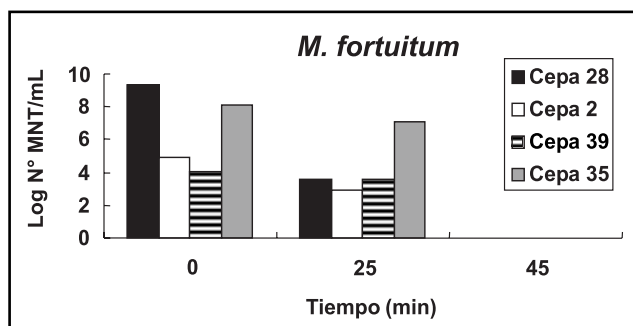
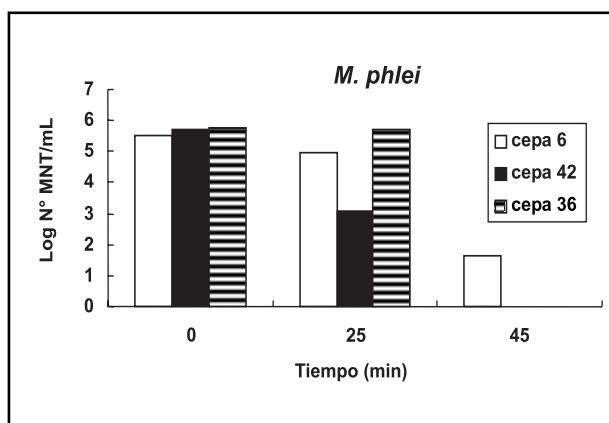
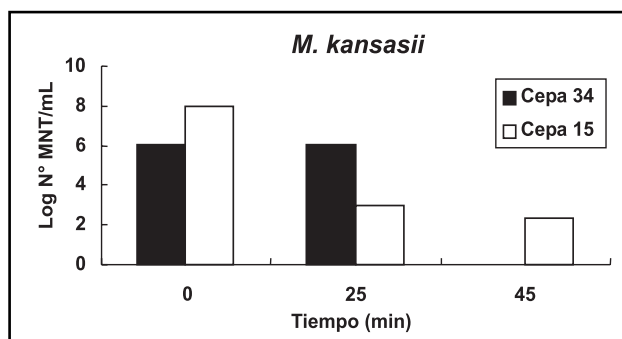


Figura 1. Supervivencia de micobacterias ambientales en presencia de formaldehído 2%.

sensibilidad directa de las cepas al formaldehído 2%<sup>16</sup>, se puede construir un gradiente de susceptibilidad que va desde una cepa muy sensible (*M. fortuitum* cepa 28 =0,23 min<sup>-1</sup>) a cepas muy resistentes al formaldehído 2% (*M. phlei* 36 y *M. kansasii* 34) después de 25 min de tratamiento (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

Las micobacterias atípicas difieren de las micobacterias tuberculosas porque la mayoría de ellas son ubicuas y saprofitas<sup>3</sup>. Unas pocas especies son consideradas potencialmente patógenas para los seres humanos y entre ellas se reconocen a *M. kansasii* y *M. fortuitum*<sup>5</sup>. Esas micobacterias atípicas integran un grupo muy interesante desde el punto de vista ecológico puesto que: a) crecen dentro de un rango amplio de temperatura, b) tienen rápida adaptación a nuevos sustratos y c) demuestran capacidad para aumentar su velocidad de desarrollo en un medio de cultivo sintético<sup>13</sup>. Carson y col.<sup>2</sup> demostraron que cepas de *M.*

*chelonae*, provenientes de agua destilada comercial, podían sobrevivir hasta 24 h en soluciones acuosas que contenían 2% de formaldehído; comprobándose una reducción en el número de micobacterias, bajo esas condiciones de trabajo, igual a 2 unidades log. En contraposición, cepas de *M. chelonae* y *M. fortuitum* obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) eran rápidamente inactivadas, no sobreviviendo al formaldehído 2% después de 2 h de exposición y soportando 15 min cuando el germicida fue aplicado al 8%. Más recientemente, Nomura y col.<sup>11</sup> comprobaron la efectividad de etanol 70% para eliminar *M. chelonae* de las máquinas de desinfección de broncoscopios, mientras que no obtuvieron los mismos resultados usando glutaraldehído 2%.

En la práctica, el formaldehído y el glutaraldehído se utilizan para esterilizaciones en frío de equipamiento hospitalario. Wallace y col.<sup>18</sup> probaron que micobacterias de crecimiento lento como *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae* eran resistentes al formaldehído 2% después de 10 min de exposición. En el Cuadro 2 se observa

Cuadro 2. Tiempo de reducción decimal de nueve micobacterias no tuberculosas (MNT) en presencia de formaldehído 2%\*.

MNT	Log10 N° MNT ml <sup>-1</sup>		Disminución en Unidades Log <sub>10</sub>	D (min)	1/D (min-1)
	0 min	25 min			
<i>M. phlei</i> 6	5,50	4,95	0,55	45,45	0,02
<i>M. phlei</i> 42	5,69	3,06	2,63	9,50	0,10
<i>M. phlei</i> 36	5,74	5,69	0,05	ND	ND
<i>M. fortuitum</i> 28	9,37	3,60	5,77	4,33	0,23
<i>M. fortuitum</i> 2	4,86	2,90	1,96	12,76	0,08
<i>M. fortuitum</i> 39	4,09	3,63	0,46	54,80	0,02
<i>M. fortuitum</i> 35	8,08	7,04	1,04	24,03	0,04
<i>M. kansasii</i> 34	6,06	6,05	0,01	ND	ND
<i>M. kansasii</i> 15	8,02	3,02	5,00	5,00	0,20

\*D= Tiempo de reducción decimal después de 25 min de exposición a 20°C; ND= No determinado.

que micobacterias de crecimiento rápido (*M. fortuitum* y *M. phlei*) y de crecimiento lento (*M. kansasii*), aisladas de suelos pampeanos, eran resistentes al formaldehído 2% después de 25 min de tratamiento, comprobándose que la resistencia al formaldehído 2% no dependía de la velocidad de crecimiento de las micobacterias ambientales estudiadas. Resultados similares obtuvieron Schulze-Robbecke y col.<sup>15</sup> trabajando con micobacterias aisladas de muestras de agua de bebida que eran tratadas con formaldehído en tres concentraciones (0,1, 0,5 y 1,0%). Los resultados de este estudio demostraron que los tiempos de reducción decimal, obtenidos con las tres cepas de *M. phlei* fueron muy diferentes a pesar de utilizar valores iniciales de UFC prácticamente idénticos (Cuadro 2). En consecuencia, podemos afirmar que la muerte de las micobacterias atípicas aisladas de suelos e investigadas a 20°C, en presencia de formaldehído 2%, dependía en mayor medida de las propiedades intrínsecas de cada micobacteria investigada que del número inicial de células utilizado para realizar cada estudio de sensibilidad. Finalmente, los datos indican, bajo las condiciones en que se realizó este estudio, que el fenol 3%, formaldehído 4% y el alcohol 70% podrían actuar como desinfectantes, de ambientes inanimados contaminados con cepas ambientales pertenecientes a *M. fortuitum*, *M. phlei* y *M. kansasii*.

### BIBLIOGRAFÍA

1. BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. Biología de los microorganismos. Sexta edición. Prentice Hall, México, 1991.
2. CARSON, L.A., PETERSEN, N.J., FAVERO, M.S., AGÜERO, S.M. 1978. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance disinfectants. Appl. Environ. Microbiol. 36: 839-846.
3. DAILLOUX, M., LAURAIN, C., WEBER, M., HARTEMANN, Ph. 1999. Water and nontuberculous mycobacteria. Wat. Res. 33: 2219-2228.
4. FUJIMORA LEITE, C., FERRACINI, R., FALCAO, P., DAVID, H., LÉVY PRÉBAULT, V. 1989. Prevalencia e distribucao de micobacterias nas aguas de algunas regioes do estado de Sao Paulo-Brasil. Rev. Microbiol., Sao Paulo 20: 432-441.
5. HOLLAND, S.M. 2001. Nontuberculous mycobacteria. Am. J. Med. Sci., 321: 49-55.
6. Iivanainen, E. 1995. Isolation of mycobacteria from acidic forest soil samples: comparison of culture methods. J. Appl. Bacteriol., 78: 663-668.
7. IIVANAINEN, E.K., MARTIKAINEN, P.J., VÄÄNÄNEN, P.K., KATILA, M.L. 1993. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. Appl. Environ. Microbiol. 59: 398-404.
8. KATILA, M.L., IIVANAINEN, E.K., TORKKO, P., KAUPPINEN, J., MARTIKAINEN, P., VÄÄNÄNEN, P.K. 1995. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria in the Finnish environment. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 98: 9-11.
9. KANTOR, I.N.; ALMARAZ, S.; ODEÓN, A.C.; STEFFAN, P.E.; AUZA, N.J.; MADRID, C.R. 1983. Las micobacterias no tuberculosas y su importancia relativa en la sensibilización tuberculínica de los bovinos en la Argentina. Rev. Med. Vet. 5/6: 340-344.
10. MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. Brock Biología de los Microorganismos. Octava Edición, Prentice Hall, Madrid, 1997.
11. NOMURA, K., OGAWA, M., CHANG, B., MIYAMOTO, H., TANABE, T., TANIGUCHI, H., MATSUMOTO, T. 2000. Contamination of bronchial fiberscope by mycobacteria linked to an automated bronchoscope disinfection machine. JUOE 22: 159-165.
12. OPS y OMS (Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud). Bacteriología de la Tuberculosis. Cultivo de *M.*

- tuberculosis*. Nota Técnica No 27, CEPANZO, PAHO/WHO, Martinez, Argentina, 1985.
13. ORIANI, D.S. 2001. Tesis de Magister. Micobacterias no tuberculosas aisladas de suelos de la Provincia de La Pampa, su comportamiento frente a agentes químicos y en modelos animales. Bahía Blanca, Universidad Nacional del Sur, Departamento de Agronomía, 162 p.
  14. ORIANI, D.S., SAGARDOY, M.A. 2002. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa Province (Argentina). *Rev. Arg. Microbiol.*, 34: 132-137.
  15. SCHULZE-RÖBBECKE, R., WEBER, A., FISCHEDER, R. 1991. Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples. *J. Microbiol. Meth.*, 14: 177-183.
  16. SCHULZE-RÖBBECKE, R., BUCHHOLTZ, K. 1992. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1869-1873.
  17. SNIDER, D.E., RAVIGLIONE, M., KOCHI, A. Global Burden of Tuberculosis. En: *Tuberculosis Protection, and Control*. Bloom, B.R. (Ed). American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994 , Chapter 1, p. 3-11.
  18. WALLACE, R., BROWN, B. , GRIFFITH, D. 1998. Nosocomial outbreak/pseudo outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 453-490
  19. YAIKO, D., CHIN, D, GONZALEZ, P., NASSOS P, HOPEWELL, P, REINGOLDA, HORSBURGH, R., YAKRUS, M., OSTROFF, S., HADLEY, W. 1995. *Mycobacterium avium* complex in water, food and soil samples collected from environment of HIV-infected individuals. *J Acq. Imm. Defic. Syn. Hum. Retrov.* 9: 176-182.