



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

**ESTUDIO DE MICOBACTERIAS  
ATÍPICAS Y SU RELACIÓN CON LA  
SUSCEPTIBILIDAD A LOS  
DESINFECTANTES DERIVADOS DE  
AMONIO CUATERNARIO**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad de Venezuela, por la bachiller Yarcely Alexandria Rodríguez Lucart como requisito parcial para optar el título de Licenciado en Biología

CARACAS, VENEZUELA  
MAYO 2011

## RESUMEN

Las micobacterias atípicas son todas aquellas que no pertenecen al *Complejo M. tuberculosis* o *M. leprae*. Estas micobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, fundamentalmente en el agua y la tierra, por lo tanto pueden llegar a ser causantes de infecciones oportunistas asociados principalmente a pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Las micobacterias son reconocidas por su alta resistencia a la desinfección, siendo esta propiedad consecuencia de la presencia de una pared celular compuesta por un alto contenido lipídico y de ácidos micólicos que actúan como barrera de protección frente a agentes químicos. Diferentes publicaciones indican que una desinfección inefectiva o el uso de desinfectantes inadecuados pueden ser una posible explicación para infecciones producidas por micobacterias en procedimientos quirúrgicos o cosméticos, debido al uso común de estos en hospitales y consultorios en Venezuela para la desinfección de materiales, ya que se encuentran registrados como productos esterilizantes y/o tuberculicidas.

Debido a que las micobacterias ocasionan un verdadero problema de salud pública, este trabajo tuvo como objetivos la confirmación de las identidades de las micobacterias atípicas: *M. simiae*, *M. abscessus* C, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. mucogenicum*, *M. cosmeticum*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. lentiflavum*, *M. flavescens*, *M. massiliense*, *M. intracellulare*, *M. sherrisii*, *M. marinum*, *M. bovis* BCG y *M. abscessus*, mediante la técnica de PRA *hsp65*. Los resultados obtenidos indican que con esta técnica de identificación no fue posible confirmar las identidades de las muestras suministradas por el Laboratorio de Tuberculosis de Biomedicina, debido a las diferencias entre los patrones de restricción obtenidos y los asignados a esas especies en la base de datos del PRASite, razón por la cual se procedió a la secuenciación de los genes 16S ARNr y *rpoB*.

Por otro lado, se determinó la frecuencia de selección de sobrevivientes a dos compuestos de amonio cuaternario (BLDBA y CTAB) a través del método de dilución – neutralización. Los resultados indican que las especies pertenecientes al complejo *M. abscessus* – *chelonae*, resultaron tener una alta frecuencia de selección de sobrevivientes al estar en contacto con estos compuestos. También se obtuvo una alta frecuencia de selección de sobrevivientes en las siguientes especies de micobacterias: *M. timonense* (colonia resistente 1 y 2), *M. senegalense*, *M. abscessus* C, *M. massiliense*, *M. marinum*, *M. abscessus* (colonia resistente 1 y 2), *M. bovis* BCG, a los 20 minutos y a las 1 hora de exposición, sin encontrar algún sobreviviente después de 24 horas de exposición a excepción de *M. bovis* BCG. Estos resultados señalan que la susceptibilidad de las micobacterias atípicas a los compuestos de amonio cuaternario BLDBA y CTAP varía entre especies, así como también dentro de la misma especie.

## ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas.....	i
Índice de figuras.....	ii
Índice de Anexos.....	iv
Abreviaturas.....	ix
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Identificación de micobacterias atípicas.....	15
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>13</b>
2.1. Antecedentes nacionales.....	19
2.2. Antecedentes internacionales.....	21
<b>3. Justificación.....</b>	<b>23</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>24</b>
4.1. Objetivo general.....	24
4.2. Objetivos Específicos.....	24
<b>5. Materiales y métodos.....</b>	<b>25</b>
5.1. Material.....	25
5.1.1. Especies micobacterianas.....	25
5.1.2. Reactivos.....	26
5.1.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para micobacterias.....	26
5.1.3.1. Medio líquido Middlebrook 7H9.....	26
5.1.3.2. Medio sólido Middlebrook 7H10.....	26
5.1.3.3. Suplemento OAD (Oleico-Albúmina-Dextrosa).....	27
5.1.3.4. Medio Ogawa – Kudoh.....	27
5.1.3.5. Composición de medios.....	27
5.2. Metodologías.....	28
5.2.1. Tinción Ziehl Neelsen.....	28
5.2.2. Método de descontaminación Ogawa - Kudoh.....	29
5.2.3. Identificación de las especies micobacterianas.....	29
5.2.3.1. Aislamiento de ADN.....	29
5.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	30
5.2.3.3. Visualización del producto de PCR.....	31

5.2.3.4. Digestión del producto de PCR de <i>hsp65</i> .....	32
5.2.3.5. Análisis de los patrones de restricción generados por PRA <i>hsp65</i> .....	32
5.2.4. Secuenciación del ADN .....	33
5.2.5. Ensayo de valoración del desinfectante de amonio cuaternario BLDBA y CTAP por el método de dilución – neutralización.....	33
5.2.6. Árboles filogenéticos.....	36
<b>6. Resultados</b> .....	<b>37</b>
6.1. Tinción de Ziehl – Neelsen.....	37
6.2. Descontaminación.....	38
6.3. Identificación de las especies micobacterianas a través de PRA <i>hsp65</i> .....	40
6.3.1. Análisis de los geles de agarosa con el software Gel Pro Analyzer 3.1.....	43
6.2.3. Confirmación de la identidad de las especies incluidas en el estudio.....	44
6.4. Secuenciación del gen 16S ARNr.....	46
6.5. Secuenciación del gen <i>rpoB</i> .....	48
6.6. Ensayos de dilución – neutralización.....	50
6.6.1. Ensayo de dilución – neutralización de <i>M. smegmatis</i> (muestra # 0).....	51
6.6.2. Ensayo de dilución – neutralización de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	53
6.6.2.1. Colonia resistente 1 de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	56
6.6.2.2. Colonia resistente 2 de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	59
<b>7. Discusión</b> .....	<b>68</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>78</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>79</b>
<b>10. Anexos</b> .....	<b>85</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación modificada de la original de Runyon que incluye los miembros del género <i>Mycobacterium</i> de importancia humana .....	2
<b>Tabla 2.</b> Bombas de eflujo micobacterianas asociadas con la reducción de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos.....	12
<b>Tabla 3.</b> Micobacterias atípicas empleadas durante la realización de este estudio.....	25
<b>Tabla 4.</b> Composición de los medios de cultivo.....	27
<b>Tabla 5.</b> Preparación de la mezcla madre para la PCR.....	30
<b>Tabla 6.</b> Ciclaje para PCR del gen <i>hsp65</i> .....	30
<b>Tabla 7.</b> Ciclaje para PCR del 16S ARNr.....	30
<b>Tabla 8.</b> Ciclaje para PCR del gen <i>rpoB</i> .....	31
<b>Tabla 9.</b> Digestión del producto de PCR de <i>hsp65</i> .....	32
<b>Tabla 10.</b> Tamaños de los fragmentos de la digestión de la proteína <i>hsp65</i> , obtenidos mediante el análisis de los geles con el software Gel Pro Analyzer 3.1.....	44
<b>Tabla 11.</b> Comparación de los resultados obtenidos para la identificación de las micobacterias utilizadas en el estudio.....	49
<b>Tabla 12.</b> Ensayo dilución – neutralizante de <i>M. smegmatis</i> (muestra # 0).....	51
<b>Tabla 13.</b> Ensayo dilución – neutralizante de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	53
<b>Tabla 14.</b> Ensayo dilución – neutralizante de la colonia 1 resistente de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	57
<b>Tabla 15.</b> Ensayo dilución – neutralizante de la colonia 2 resistente de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	59
<b>Tabla 16.</b> Comparación de las frecuencias de aparición de resistentes de todas las especies micobacterianas incluidas en el estudio.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la pared celular de las micobacterias.....	6
<b>Figura 2.</b> Estructuras de los compuestos amonio cuaternarios.....	9
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de los compuestos de amonio cuaternario (QACs).....	11
<b>Figura 3.</b> Ensayo de dilución – neutralización.....	27
<b>Figura 4.</b> Controles del Ensayo de dilución – neutralización.....	34
<b>Figura 5.</b> Ensayo de dilución – neutralización, con BLDBA como desinfectante.....	35
<b>Figura 6.</b> Ensayo de dilución – neutralización, con CTAP como desinfectante.....	36
<b>Figura 7.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de cultivo contaminado.....	37
<b>Figura 8.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de un cultivo puro.....	38
<b>Figura 9.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. smegmatis</i> .....	39
<b>Figura 10.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. simiae</i> .....	39
<b>Figura 11.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. abscessus</i> .....	39
<b>Figura 12.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. chelonae</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. fortuitum</i> .....	39
<b>Figura 14.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. kansasii</i> .....	39
<b>Figura 15.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. gordonae</i> .....	39
<b>Figura 16.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. mucogenicum</i> .....	39
<b>Figura 17.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. cosmeticum</i> .....	39
<b>Figura 18.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. scrofulaceum</i> .....	39
<b>Figura 19.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. peregrinum</i> .....	39
<b>Figura 20.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. phlei</i> .....	39
<b>Figura 21.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. lentiflavum</i> .....	40
<b>Figura 22.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. flavescens</i> .....	40
<b>Figura 23.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. massiliense</i> .....	40
<b>Figura 24.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. intracellulare</i> .....	40
<b>Figura 25.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. marinum</i> .....	40
<b>Figura 26.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. bovis</i> BCG.....	40
<b>Figura 27.</b> Tinción Ziehl – Neelsen de <i>M. abscessus</i> C.....	40
<b>Figura 28.</b> Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la amplificación del PRA - <i>hsp65</i> .....	41

<b>Figura 29.</b> Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los patrones de PRA obtenidos de los aislados estudiados.....	42
<b>Figura 30.</b> Análisis de la digestión del producto de PRA <i>hsp65</i> realizado con el software Gel Pro Analyzer 3.1.....	43
<b>Figura 31.</b> Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la amplificación del gen 16S ARNr.....	47
<b>Figura 32.</b> Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la amplificación del gen <i>rpoB</i> .....	48
<b>Figura 33.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de <i>M. smegmatis</i> (muestra # 0).....	53
<b>Figura 34.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	56
<b>Figura 35.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de la colonia 1 resistente de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	58
<b>Figura 36.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de la colonia 2 resistente de <i>M. abscessus</i> C (muestra # 20).....	61
<b>Figura 37.</b> Árbol filogenético del gen 16S ARNr de las especies micobacterias estudiadas.....	64
<b>Figura 38.</b> Árbol filogenético del gen <i>rpoB</i> (secuencias forward) de las especies de micobacterias estudiadas.....	66
<b>Figura 39.</b> Árbol filogenético del gen <i>rpoB</i> (secuencias reverse) de las especies de micobacterias estudiadas.....	67

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 1 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	86
<b>Anexo 2.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 2 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	86
<b>Anexo 3.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 3 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	87
<b>Anexo 4.</b> Secuencia nucleotídica de la muestra 4 obtenida por secuenciación.....	87
<b>Anexo 5.</b> . Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 5 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	88
<b>Anexo 6.</b> Secuencia nucleotídica de la muestra 6 obtenida por secuenciación.....	88
<b>Anexo 7.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 7 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	89
<b>Anexo 8.</b> Secuencia nucleotídica de la muestra 8 obtenida por secuenciación.....	89
<b>Anexo 9.</b> . Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 9 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	90
<b>Anexo 10.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 12 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	90
<b>Anexo 11.</b> . Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 13 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	91
<b>Anexo 12.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 14 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	91
<b>Anexo 13.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 15 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	92
<b>Anexo 14.</b> Secuencia nucleotídica de la muestra 16 obtenida por secuenciación.....	92
<b>Anexo 15.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 17 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	93
<b>Anexo 16.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 18 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	93



<b>Anexo 17.</b> Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 19 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	94
<b>Anexo 18.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 1 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	94
<b>Anexo 19.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 2 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	95
<b>Anexo 20.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 3 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	95
<b>Anexo 21.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 4 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	96
<b>Anexo 22.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 5 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	96
<b>Anexo 23.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 6 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	97
<b>Anexo 24.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 7 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	97
<b>Anexo 25.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 8 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	98
<b>Anexo 26.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 9 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	98
<b>Anexo 27.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 11 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	99
<b>Anexo 28.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 15 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	99
<b>Anexo 29.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 16 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	100
<b>Anexo 30.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 17 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	100
<b>Anexo 31.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 18 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	101

<b>Anexo 32.</b> Análisis de la secuencia del gen <i>rpoB</i> de la muestra 19 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.....	101
<b>Anexo 33.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. abscessus</i> (muestra # 2).....	102
<b>Anexo 34.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. abscessus</i> (muestra # 2).....	102
<b>Anexo 35.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. abscessus</i> (muestra # 2).....	103
<b>Anexo 36.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. abscessus</i> (muestra # 2).....	103
<b>Anexo 37.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. abscessus</i> (muestra # 2).....	104
<b>Anexo 38.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. abscessus</i> (muestra # 2).....	104
<b>Anexo 39.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. senegalense</i> (muestra # 4)....	105
<b>Anexo 40.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. senegalense</i> (muestra # 4).....	105
<b>Anexo 41.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. senegalense</i> (muestra # 6).....	106
<b>Anexo 42.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. senegalense</i> (muestra # 6).....	106
<b>Anexo 43.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. senegalense</i> (muestra # 6).....	107
<b>Anexo 44.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. senegalense</i> (muestra # 6).....	107
<b>Anexo 45.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 de <i>M. senegalense</i> (muestra # 6).....	108
<b>Anexo 46.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. senegalense</i> (muestra # 6).....	108
<b>Anexo 47.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. cosmeticum</i> (muestra # 7).....	109
<b>Anexo 48.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. cosmeticum</i> (muestra # 7).....	109

<b>Anexo 49.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. porcinum</i> (muestra # 8).....	110
<b>Anexo 50.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. porcinum</i> (muestra # 8) .....	110
<b>Anexo 51.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. porcinum</i> (muestra # 11).....	111
<b>Anexo 52.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. porcinum</i> (muestra # 11).....	111
<b>Anexo 53.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. porcinum</i> (muestra # 11).....	112
<b>Anexo 54.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. porcinum</i> (muestra # 11).....	112
<b>Anexo 55.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. porcinum</i> (muestra # 11).....	113
<b>Anexo 56.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. porcinum</i> (muestra # 11).....	113
<b>Anexo 57.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. phlei</i> (muestra # 12).....	114
<b>Anexo 58.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. phlei</i> (muestra # 12).....	114
<b>Anexo 59.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. massiliense</i> (muestra # 15).....	115
<b>Anexo 60.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. massiliense</i> (muestra # 15).....	115
<b>Anexo 61.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. timonense</i> (muestra # 16).....	116
<b>Anexo 62.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. timonense</i> (muestra # 16).....	116
<b>Anexo 63.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. timonense</i> (muestra # 16).....	117
<b>Anexo 64.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. timonense</i> (muestra # 16).....	117
<b>Anexo 65.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. timonense</i> (muestra # 16).....	118

<b>Anexo 66.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. timonense</i> (muestra # 16).....	118
<b>Anexo 67.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. marinum</i> (muestra # 18).....	119
<b>Anexo 68.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. marinum</i> (muestra # 18).....	119
<b>Anexo 69.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. marinum</i> (muestra # 18).....	120
<b>Anexo 70.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de <i>M. marinum</i> (muestra # 18).....	120
<b>Anexo 71.</b> Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. marinum</i> (muestra # 18).....	121
<b>Anexo 72.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de <i>M. marinum</i> (muestra # 18).....	121
<b>Anexo 73.</b> Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. bovis</i> BCG (muestra # 19).....	122
<b>Anexo 74.</b> Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de <i>M. bovis</i> BCG (muestra # 19).....	122

## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**AG:** Arabinogalactanos  
**AraLAMs:** Lipoarabinomanano desprovisto de fosfatidilinositol  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ATP:** Adenosin trifosfato  
**BLDBA:** Bromuro de lauril dimetil bencil amonio  
**BSA:** Suero albúmina bovino  
**CMI:** concentración mínima inhibitoria.  
**CTAP** bromuro de hexadeciltrimetilamonio  
**DMSO:** Dimétil sulfóxido  
**dNTPs:** Deoxirribonucleótidos trifosfato  
**DO:** Densidad óptica  
**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético  
**GFP:** Proteína Verde Fluorescente  
**HAART:** Highly Active Antiretroviral Therapy o Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad  
**IL:** Interleucina  
**IVIC:** Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas  
**LAM:** Lipoarabinomanano  
**LfrA:** Low Fluoroquinolone Resistance o Resistencia Baja a Fluoroquinolonas  
**MA:** Ácidos micólicos  
**ManLAMs:** Lipoarabinomanano limitados al residuo terminal  $\beta$ -Arabinosa con residuos de manosa  
**MFS:** Major Facilitator Superfamily o Superfamilia de los Facilitares Principales  
**NaOH:** Hidróxido de sodio  
**OAD:** Ácido oleico, albúmina, glucosa, cloruro de sodio.  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa  
**PG:** Peptidoglicanos  
**PILAMs:** Lipoarabinomanano que tienen en extremo fosfatidilinositol  
**PRA:** PCR Restriction Enzyme analysis o Análisis de Restricción de productos de PCR  
**QACs:** Compuestos de Amonio Cuaternario  
**RND:** Resistance Nodulation cell division o Resistencia a la nodulación y división celular  
**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida  
**SMR:** Small Multidrug Resistance o de Resistencia a pequeñas drogas  
**TBE:** Tris, ácido bórico, EDTA  
**TE:** Tris-EDTA.  
**Tet(v):** Bomba de eflujo de tetraciclina  
**Th:** Linfocitos T colaboradores  
**TNF:** Factor de necrosis tumoral  
**UEGF:** Unidad de Estudios Genéticos y Forenses

**UV:** Luz ultravioleta

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## 1. INTRODUCCIÓN

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica ya que existen muchas especies que son agentes causales de diversas infecciones humanas con una importante morbilidad y mortalidad. Algunas enfermedades, tales como la tuberculosis y la lepra, han acompañado al hombre a lo largo de su historia. A pesar de los esfuerzos realizados para su control, en la actualidad constituyen unos de los problemas sanitarios de mayor gravedad a nivel mundial (Alcaide y col., 2009). La OMS reporta que *M. tuberculosis* causa aproximadamente dos millones de muertes cada año y que una tercera parte de la población mundial tiene una infección latente (Hett y Rubin, 2008).

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos o curvos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud, en forma de bastón, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, no poseen flagelos ni cápsula y tienen como característica una resistencia mayor a la tinción por los colorantes aplicados para la tinción Gram. Sin embargo, una vez que se aplica la tinción Ziehl – Neelsen, son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido (Rodríguez, 2009). Este género es el único que pertenece a la Familia *Mycobacteriaceae*, Orden *Actinomycetales* y las especies que lo componen presentan un elevado contenido de G+C (61-71%) en su ADN (Alcaide y col., 2009). El metabolismo de las micobacterias es muy variable, encontrándose micobacterias de crecimiento rápido, las cuales crecen en un período menor de tres días; micobacterias que crecen lentamente (3 a 5 semanas) que necesitan medios más ricos y micobacterias como *M. leprae*, que aún no ha podido ser cultivada en medios libres de células (Rodríguez, 2009).

En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil para el género *Mycobacterium* dividiéndolos en cuatro grupos, basados en la velocidad de crecimiento (rápido o lento), producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno y no cromógeno) (Tabla 1) y características de las colonias (Rodríguez, 2009).





Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos, la mayoría de las micobacterias son aerobios estrictos, excepto *M. bovis* que es microaerófilo (su crecimiento se ve favorecido con una atmósfera de 5 - 10% de CO<sub>2</sub>) (Rodríguez, 2009). La temperatura óptima de crecimiento es variable, con un rango entre 30°C y 42°C (Rodríguez, 2009), mientras que *M. thermoresistibile* tiene una temperatura óptima de crecimiento a 52°C (Alcaide y col., 2005). Las micobacterias son altamente resistentes a la desecación y permanecen viables en el esputo desecado durante un periodo de 6 a 8 meses, cuando están protegidas de la luz solar directa. Son más resistentes a agentes desinfectantes que otras formas vegetativas de otras bacterias, pero son destruidos por procedimientos de altas temperatura como la pasteurización (Rodríguez, 2009).

La existencia de las micobacterias no tuberculosas se advirtió poco después que Koch en 1882, describiera el bacilo tuberculoso denominándolos como “micobacterias atípicas” para diferenciarlas de *M. tuberculosis*. No obstante, eran típicos bacilos ácido - alcohol resistente, inicialmente considerados como contaminantes ambientales o simples colonizantes. A partir de 1950, se reconocieron como patógenos potenciales y al objetarse el nombre de atípicas propuesto por Timpe & Runyon, se adoptó entonces el término de “micobacterias no tuberculosas”, aunque la literatura ha utilizado uno u otro sin un consenso general (Crespo y Corral, 1997).

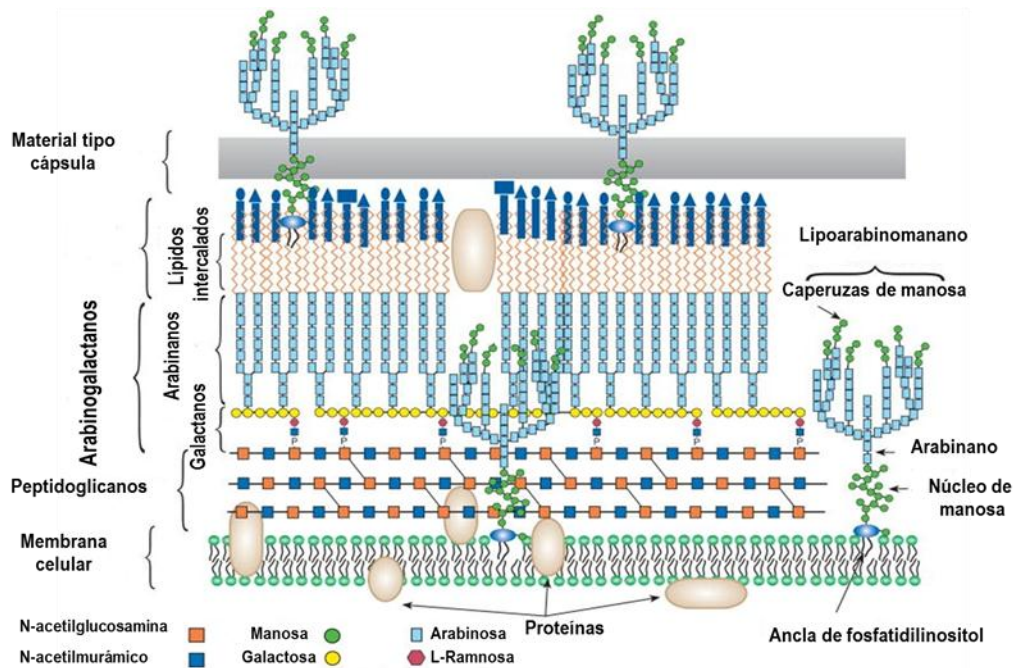
Las micobacterias atípicas o ambientales se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, fundamentalmente en el agua y en la tierra, los cuales son sus principales reservorios. Las micobacterias del complejo *M. avium* y *M. kansasii* han sido aisladas de forma repetida en sistemas de conducción de agua y grifos. *M. xenopi*, al necesitar temperaturas superiores a 28°C para su crecimiento, se aísla casi exclusivamente del agua caliente o sus sistemas de conducción, hecho que puede producir casos de infección intrahospitalarias. *M. marinum* tiene su reservorio y se transmite a través de agua salada, pescado fresco, embalses de agua y piscinas, mientras que las micobacterias atípicas de crecimiento rápido como *M. fortuitum*, *M.*

*chelonae* y *M. abscessus*, se pueden aislar de la tierra y del agua, aunque la causa más común de enfermedad se produce por transmisión nosocomial (Caminero, 2009). Otras micobacterias de importancia clínica son: *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. ulcerans*, *M. avium*, y *M. intracellulare*, entre otras.

La transmisión de micobacterias atípicas de persona a persona es poco común. Mientras que para *M. tuberculosis* el mecanismo de transmisión más aceptado es la dispersión de gotas de saliva por aerosol así como el de su ingestión por vía digestiva, en el caso de la linfadenitis en niños y en las formas diseminadas en pacientes con VIH. En pacientes con infecciones de partes blandas, se ha descrito la inoculación directa de las micobacterias atípicas a partir de agua contaminada y otros materiales como herramientas quirúrgicas esterilizadas inadecuadamente. Existe una gran variabilidad geográfica en la prevalencia de la enfermedades causadas por estas micobacterias así como de las especies responsables, habiéndose producido un aumento importante en la incidencia en los últimos 15 años fundamentalmente ligado al SIDA (Caminero, 2009). Este aumento ha condicionado un incremento paralelo en la investigación y conocimiento de las micobacterias atípicas, que ha conllevado a una estandarización en los criterios diagnósticos y terapéuticos para cada una de ellas. Las micobacterias atípicas se han considerado a nivel mundial, como causantes de un gran número de infecciones pulmonares y no pulmonares, diseminadas en individuos inmunocompetentes, inmunocomprometidos y pacientes con Fibrosis Quística (Caminero, 2009). Debido al avance de los medicamentos para pacientes con VIH y SIDA, como el tratamiento antirretroviral de gran actividad (HAART), se ha podido reducir considerablemente la incidencia de infecciones oportunistas en estos pacientes (<http://www.fotolog.com/antonikuin/66319523>, consulta 2/6/2010). Pero la pared celular de las micobacterias juega un papel significativo en la patogenicidad, pues parece ser responsable de propiedades tales como la ácido alcohol resistencia (Barksdale & Kim, 1977 citado por Liu y col., 1999), además de estar involucrada en las reacciones

inmunológicas del hospedador (Liu y col., 1999). La composición molecular y las características estructurales de la pared micobacteriana son importantes, pues le confiere baja permeabilidad lo que trae como consecuencia resistencia intrínseca a drogas (Barksdale & Kim, 1977 citado por Liu y col., 1999) y a desinfectantes (Hett y Rubin, 2008).

La pared celular de las micobacterias consiste de una capa interna y una capa externa que rodea la membrana plasmática. El compartimiento interno contiene peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (MA) unidos covalentemente para formar un complejo conocido como el complejo MA-AG-PG, que se extiende desde la membrana plasmática hacia el exterior en capas, comenzando con el PG y terminando con MAs (figura 1). Este complejo es insoluble y se ha denominado núcleo esencial de la pared celular de las micobacterias. Muchas de las drogas usadas para combatir a las micobacterias tienen como blanco al complejo MA-AG-PG (Hett y Rubin, 2008). El PG o mureina, es un componente versátil, lo suficientemente rígido para suministrar un andamiaje para que la bacteria mantenga su forma y así brindarle protección frente a la presión osmótica, siendo al mismo tiempo flexible para que la bacteria crezca y se expanda. El PG está constituido por péptidos y cadenas de glicanos. Las cadenas de glicanos más largas consisten típicamente de N-acetilglucosamina (NAGs) unidas al ácido acetilmurámico (NAM). Estas cadenas están enlazadas por péptidos unidos al grupo lactil de las NAMs de diferentes cadenas de glicanos. Estas cadenas de péptidos normalmente consisten de L-alanil-D-*iso*-glutaminil-*meso*-ácido diaminopimérico (DAP) desde una cadena unida al residuo terminal D-alanina de L-alanil-D-*iso*-glutaminil-*meso*-DAP-D-alanina de una cadena diferente (Hett y Rubin, 2008).



**Figura 1.** Pared celular micobacteriana (Tomada y modificada de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch20&rendertype=figure&id=ch20.f8>)

Los AG son los principales polisacáridos de la pared celular micobacteriana, pues confieren integridad a la misma y permite el anclaje de la capa de MA impermeables a la capa de PG. Los AG están compuestos de arabinosa y galactosa, ambos en forma de furanosa. Los residuos de galactosa están ordenados de forma alternada 1→5, 1→6, con el arabinano unido a la posición 5 del galactano por un enlace 1→5. Algunos polímeros de los galactanos pueden no tener unido un arabinano, siendo de esta manera cadenas de galactanos ramificadas. Los AG están unidos covalentemente a la capa de PG por un fosforil-N-acetilglucosaminosil-ramnosil (Hett y Rubin, 2008) (figura 1).

Los MAs son los principales determinantes de la permeabilidad de la pared celular y consisten en una variedad de ácidos grasos cortos ( $\alpha$ -alkil) y largos ( $\beta$ -hidroxil), en un rango de 60 a 90 carbonos por cadena. La mayoría de los MAs están covalentemente unidos a los AG por medio de enlaces éster y existen como agrupaciones tetramicolicil-pentaarabinofuranosil en los AG. La capa

externa de lípidos y proteínas mencionada, se intercala dentro de la capa de MA (Hett y Rubin, 2008).

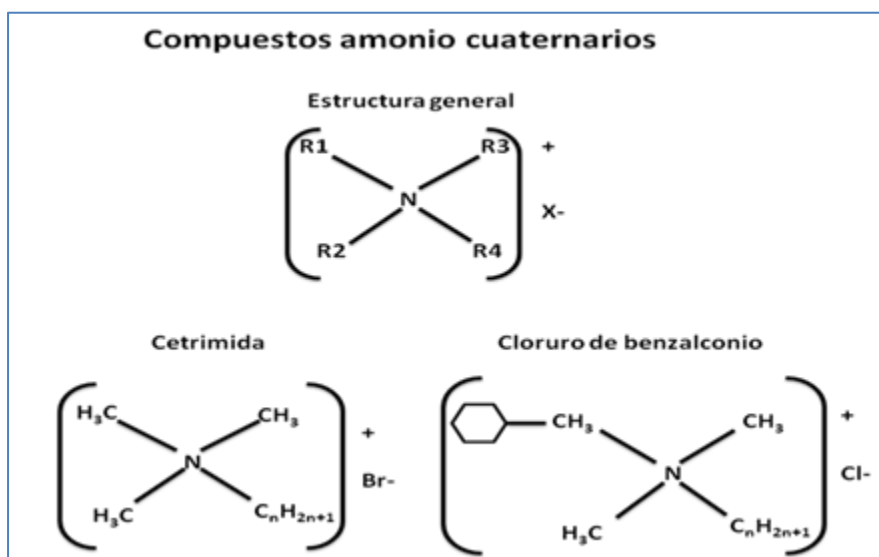
El compartimiento exterior está constituido tanto por lípidos como por peptidoglicolípidos. Los lípidos están a menudo libremente asociados con la pared celular, con algunas cadenas cortas y largas de ácidos grasos, complementando las cadenas cortas y largas que se encuentran en la capa interna. Los lípidos unidos a los polisacáridos asociados con el exterior de la pared celular, consisten de lipoarabinomanano (LAM), lipomanano y phthiocerol que contiene lípidos tales como phthiocerol dimicocerosato, dimicolil tehalosa (cord factor), sulfolípidos específicos de *M. tuberculosis* y el fosfatidilinositol manosido. En micobacterias patógenas de crecimiento lento, tales como *M. tuberculosis* y *M. leprae*, los LAMs están limitados al residuo terminal  $\beta$ -Arabinosa con residuos de manosa que son denominados como ManLAMs, mientras que las micobacterias de crecimiento rápido, tales como *M. smegmatis* y *M. fortuitum*, tiene en el extremo de los LAMs, el fosfatidilinositol que se conocen como PILAMS. Los LAMs de *M. chelonae* que están desprovistos de fosfatidilinositol, son denominados AraLAMs. Estas proteínas y lípidos externos son componentes solubles de la pared celular y han sido denominados como señalizadores y moléculas efectoras de micobacterias porque se conoce su papel en la interacción con el sistema inmune (Hett y Rubin, 2008), entre las que se encuentran: inhibición de la actividad de los macrófagos, inhibición de la producción de la citosina pro – inflamatoria IL – 12, inhibición de la respuesta tipo Th 1 y del TNF -  $\alpha$ . Todas estas respuestas favorecen la supervivencia intra – macrofágica del bacilo (Nigou y col., 2003).

Se ha descrito que los glicopeptidolípidos que forman parte de la pared celular son abundantes en colonias con fenotipo lisas-transparentes, pero estos disminuyen en las colonias lisas-abombadas (Rastogi y col., 1981), mientras que están esencialmente ausentes en las colonias rugosas (Tsukamura y col., 1989 citado por Liu y col., 1999). La presencia de glicopeptidolípidos se

encuentra asociado a la capacidad de las micobacterias de colonizar otros ambientes y persistir en ellos, fenómeno conocido como motilidad, (en el caso de las micobacterias, se define como el desplazamiento por deslizamiento de una población micobacteriana) (Agustí, 2008). Interesantemente, los morfotipos liso-transparente son más resistentes a los antibióticos lipofílicos tales como rifampicina y minociclina, que los morfotipos liso-abombado y rugoso (Tsukamura y col., 1989 citado por Liu y col., 1999). Tsukamura y col. en 1998, demostraron que las cepas lisas-transparentes fueron más resistentes también a antibióticos hidrofílicos tales como aminoglucósidos. Además, las tasas de entrada de los compuestos lipofílicos, chenodeoxicolato y norfloxacin, fueron mucho más altos en las colonias rugosas y lisas-abombadas que en las colonias lisas-transparentes derivadas de la misma cepa inicial de *M. avium* (observaciones no publicadas de Nikaido and Barry citada por Liu y col., 1999). Similarmente, la inhibición de la biosíntesis de los glicopeptidolípidos por 3-fluorofenilalanina, aumenta la susceptibilidad de *M. avium* a agentes lipofílicos tales como la rifampicina, las fluoroquinolonas (Rastogi et al. 1990 citado por Liu, 1999), las tetraciclinas y los macrólidos, pero no a los agentes hidrofóbicos como la isoniazida (Rastogi y col., 1990). Organismos del complejo *M. avium* y varias micobacterias atípicas de crecimiento rápido tales como *M. chelonae*, *M. smegmatis* y *M. fortuitum*, son naturalmente resistentes a estos antibióticos (Liu y col., 1999). Esto sugiere que la presencia de glicopeptidolípidos está involucrada de alguna manera en la construcción de una barrera impermeable efectiva (Liu, 1999), encontrándose que *M. chelonae* es 30 veces menos permeable a moléculas hidrofílicas que *E. coli*, mientras que la de *M. smegmatis* es 20 veces menos permeable que *E. coli* (Hett y Rubin, 2008). Varios reportes han sido correlacionados entre la morfología de la colonia y la virulencia, generalmente siendo las variantes rugosas más virulentas que las variantes lisas (Belisle y Brennan, 1989; Collins y Cunningham, 1981; Schaefer y col., 1970).

Por otro lado, se ha demostrado mediante ensayos “*in vitro*”, que la gran mayoría de las micobacterias atípicas son resistentes a los fármacos antituberculosos, que incluyen macrólidos y quinolonas (Hett y Rubin, 2008), así como de desinfectantes del tipo amonio cuaternario (Cortesía 2010).

Los compuestos de amonio cuaternarios (QACs) son surfactantes anfotéricos que son ampliamente usados como desinfectantes para el control del crecimiento bacterial en clínicas y ambientes industriales, pues tienen una actividad antimicrobiana de amplio espectro y propiedades surfactantes (figura 2) (McBain y col., 2004). Su importante papel en la salud y en las cadenas de comida, han asegurado que su mecanismo de resistencia, estando entre los desinfectantes mejores estudiados (Chapman, 2003).



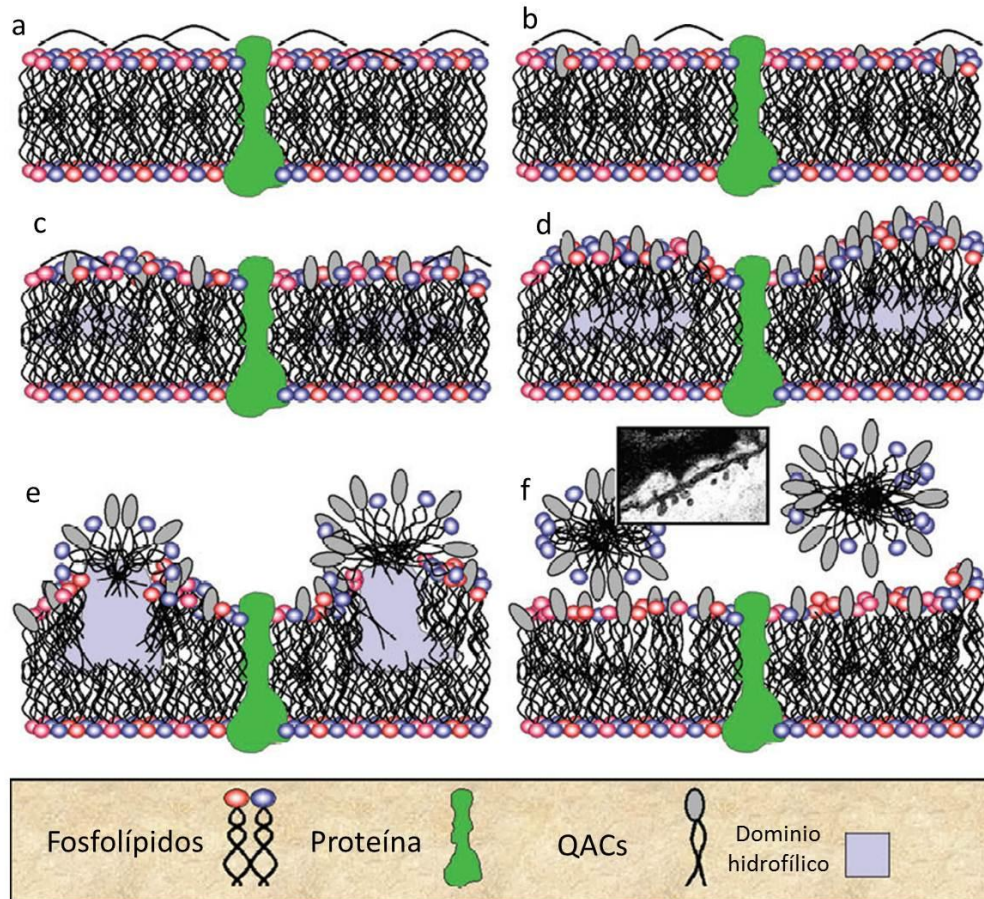
**Figura 2.** Estructuras de los compuestos amonio cuaternarios. Tomado de MacDonnell y col. 1999.

La acción antimicrobiana de los QACs involucra la perturbación citoplasmática de la membrana externa de la bicapa lipídica a través de la asociación de un nitrógeno cuaternario cargado positivamente con un grupo de cabezas polares de los fosfolípidos. Subsecuentemente, la

cola hidrofóbica interactúa con el núcleo de la membrana hidrofóbica (figura 3). A concentraciones usadas normalmente para la aplicación en superficies inanimadas, los QACs forman una mezcla de agregados micelares con componentes hidrofóbicos que solubilizan las membranas y lisan las células (McBain y col., 2004).

Alteraciones en la composición de la membrana tales como el incremento en los niveles de ácidos grasos hidroxilados y de ácido laúrico, así como la disminución de los niveles de ácido palmítico han sido descritas en *P. aeruginosa* resistentes a los compuestos de amonio cuaternario (QACs) (Mechin et al., 1999). Presumiblemente estas alteraciones hacen difícil la inserción de los QACs dentro de la membrana (Chapman, 1999). La resistencia a clorhexidina en *Serratia marcesens* (Lannigan & Bryan, 1985 citado por Chapman, 1999) y *Providencia stuartis* (Ismael y col., 1986) han postulado que se asocia con cambios en la composición de la membrana citoplasmática, aunque las diferencias bioquímicas en la composición de la membrana en las bacterias resistentes a clorhexidina no fueron determinadas (Chapman, 1999).





**Figura 3.** Mecanismo de acción de los compuestos de amonio cuaternario (QACs). Los segmentos (a – f) muestran la acción progresiva de la unión de la cabezas de los QACs con la cabeza polar de los fosfolípidos dentro de la membrana a medida que incrementa su concentración y el tiempo de exposición. Esto permite la disminución de la fluidez de la bicapa y la creación de vacíos hidrofílicos en la membrana (d y e). La función de las proteínas es perturbada por la lisis eventual de la célula, y la solubilización de los fosfolípidos y proteínas dentro de las micelas QAC/fosfolípidos (f). La figura muestra la formación de vesículas de la membrana externa causada por el tratamiento con los QACs (Tomado de Gilbert y Moore, 2005).

Unas de las estrategias que las micobacterias usan para sobrevivir a la acción de los fármacos, en combinación con la baja tasa de difusión a través de la pared celular son las bombas de eflujo, los reguladores de respuesta, la modificación del antibiótico o enzimas que lo degraden ( $\beta$ -lactamasas), o la modificación de enzimas blanco y señuelos que mimetizan los sitios de acción de las drogas (Hett y Rubin, 2008).

Con respecto a las bombas de eflujo, estas se pueden definir como proteínas transportadoras de membrana, las cuales usan como fuente de energía al ATP o gradiente de

protones para el transporte de moléculas concretas tales como desinfectantes y drogas, entre otros. La primera bomba de eflujo reportada para micobacterias, fue en el año 1996 por Takiff y colaboradores, quienes identificaron la bomba de eflujo LfrA (Low Fluoroquinolone Resistance) en *M. smegmatis*. Esta bomba está involucrada en la salida al exterior celular de antibióticos como fluoroquinolonas, así como de bromuro de etidio, acriflavina y algunos compuestos de amonio cuaternarios (Takiff y col., 1996; Liu y col., 1999). En la tabla 2 se pueden observar bombas de eflujo asociadas a la reducida susceptibilidad a agentes antimicrobianos (De Rossi, 2005).

**Tabla 2.** Bombas de eflujo micobacterianas asociadas con la reducción de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Tomado de De Rossi y col., 2006.

Familia de bombas	Microorganismos	Resistencia	Resistencia causada por	Referencias
MFS (Superfamilia de los facilitadores principales)				
LfrA	<i>M. smegmatis</i>	Fluoroquinolonas, bromuro de etidio, acriflavina y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAP)	Amplificación del gen (plásmido multicopia)	Takiff y col., 1996
Tet(v)	<i>M. smegmatis</i>	Tetraciclina	Plásmido multicopia	De Rossi y col., 1998b
Tap	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. fortuitum</i>	Aminoglucósidos y tetraciclina	Plásmido multicopia	Ainsa y col., 1996
P55	<i>M. bovis</i>	Aminoglucósidos y tetraciclina	Plásmido multicopia	Silva y col., 2001
Rv1634	<i>M. tuberculosis</i>	Fluoroquinolonas	Plásmido multicopia	De Rossi y col., 2002
Rv1258c	Cepas clínicas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a rifampicina, ofloxacina, izoniacida y minomicina	Rifampicina y ofloxacina	Inducción de la expresión por el uso de las drogas	Siddiqi y col., 2004
SMR (Resistencia a pequeñas drogas)				
MmR	<i>M. tuberculosis</i>	Tetrafenil fosfonio, bromuro de etidio, eritromicina, acriflavina, safranina O y pironina Y	Plásmido multicopia	De Rossi y col., 1998a
RND (Resistencia a la nodulación y división celular)				
MmpL7	<i>M. tuberculosis</i>	Izoniacida	Plásmido multicopia	G. Riccardi (datos no publicados)
Superfamilia ABC				
PstB	<i>M. smegmatis</i>	Fluoroquinolonas	Sobreexpresión en una mutante resistente a la ciprofloxacina	Bhatt y col., 2000
DrrAB	<i>M. tuberculosis</i>	Tetraciclina, eritromicina, etambutol, norfloxacina, estreptomina, cloranfenicol y antraciclinas	Plásmido multicopia	Choudhuri y col., 2002
Rv2686c-2687c-2688c	<i>M. tuberculosis</i>	Fluoroquinolonas	Plásmido multicopia	Pasca y col., 2004

Los genes que codifican para las bombas de eflujo de drogas son extremadamente prevalentes entre las bacterias y algunas de esas bombas tienen una amplia inespecificidad y parecen catalizar la salida de cualquier componente que contenga un moderado segmento lipofílico tales como la penicilina G y la eritromicina, entre otros (Nikaido, 1996). Por lo tanto, parece probable que buena parte de la resistencia en micobacterias, que ha sido atribuido a las propiedades de barrera de la pared celular, pueda ser el resultado de una colaboración sinérgica entre esta barrera y un proceso activo de eflujo (Liu y col., 1999).

Las bombas de eflujo remueven activamente los QACs desde el interior de la membrana, reduciendo su efectividad a concentraciones por debajo de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) (McBain y col., 2004). Varios sistemas de eflujo de QACs han sido reportados para bacterias Gram-positivas (*qacA*, *qacB*, *smr*) (Lyon y Skurray, 1987; Tennent y col., 1989) y bacterias Gram-negativas (*emrE*, *qacE* y *qacEΔ1*) (Lomovskaya y Lewis, 1992; Kasama y col., 1998). Por lo cual numerosos estudios de laboratorio han reportado una disminución en la susceptibilidad, después de repetidas exposiciones debido a que los cambios reportados en la susceptibilidad son generalmente atribuidos a la adquisición de hiper-expresión de ciertas bombas de flujo que expulsan una gran variedad de drogas o modificación del contenido de los ácidos fosfolípidicos de la membrana. Los determinantes genéticos de la resistencia son frecuentemente encontrados en elementos móviles. Esto fue demostrado por Bjorland y col. en el 2001, quienes encontraron que el gen *qacJ* ubicado en un plásmido, mediaba la resistencia a QACs en varios estafilococos (McBain y col., 2004).

Bacterias resistentes a los QACs han sido aisladas tanto en hospitales como en instalaciones de preparación de alimentos (Baset y col., 1970; Sundheim y col., 1998) e incluso de soluciones de desinfectantes almacenadas (Cloruro de Benzalconio) (Nagai y col., 1996). La caracterización de la resistencia a los QACs ha suministrado la prueba más clara de la asociación de biocidas y genes de resistencia a antibióticos en elementos genéticos móviles. El plásmido pSK01

contiene al gen *qacA* en *S. aureus* y también genes que codifican para la resistencia a trimetoprim (*drfA*) y aminoglicósidos (*aacA-aacD*) (Paulsen y col., 1997). Mientras que los genes *qacE* y *qacEΔ1* están localizados en la secuencia de la región conservada 3' de integrones de alta movilidad en bacterias Gram-negativas (Lucey y col., 2000; Paulsen y col., 1993). Los integrones son sistemas de recombinación sitio específicos responsables del reconocimiento, captura y expresión de genes. Se encuentran habitualmente formando parte de transposones y/o plásmidos (Coque, 2005), conteniendo usualmente varios genes con múltiples resistencias a antibióticos (Chapman, 2003). Hasta la fecha, no ha sido demostrado que plásmidos o transposones medien la resistencia a biocidas en micobacterias (McDonnell y Russell, 1999).

Otra característica de las micobacterias que podría explicar la resistencia tanto a los desinfectantes como a los antibióticos, es la formación de biopelículas, definida como una agrupación de microorganismos organizados dentro de un extenso polímero de exopolisacárido, que contiene monocultivos de varias especies que presentan diferentes fenotipos, las cuales según su ubicación presentan propiedades fisiológicas diferentes (McDonnell y Russell, 1999). Esto fue demostrado por Howard y colaboradores en el año 2006, a través de una muestra clínica aislada de *M. abscessus* que tenía la habilidad de revertir (cambiar) desde el fenotipo liso no invasivo formadora de biopelícula a un fenotipo rugoso, invasivo y no formadora de biopelícula. Existen varias razones que pueden considerarse para la reducida sensibilidad de la bacteria dentro de la biopelícula. Puede haber un acceso reducido del desinfectante o antibiótico a las células que se encuentran en el interior de la biopelícula, puede haber una interacción química entre el desinfectante y la película en sí misma, producción de enzimas degradativas y neutralizantes químicos, así como un intercambio genético entre las bacterias que conforman la biopelícula (McDonnell y Russell, 1999). Tanto la formación de biopelícula como la motilidad, son considerados

como características importantes que juegan un papel en la colonización bacteriana (Recht y col., 2000).

La susceptibilidad relativa de las bacterias es la consecuencia de los mecanismos de resistencia intrínseca, siendo esta una ventaja evolutiva que involucra el mantenimiento de una mínima protección contra compuestos dañinos, la cual está genéticamente conservada (transmisión vertical). Sin embargo la baja permeabilidad de la envoltura celular o la eficiente selectividad de las bombas de eflujo permiten a las células bacterianas sobrevivir a estrés fisiológico y químico. El nivel de resistencia depende algunas veces de las especies que son sometidas a estrés y puede incrementar con la sobreexpresión de genes específicos después de la exposición a factores ambientales y estrés específicos, tales como los antibióticos y los desinfectantes (SCENIHR, 2009).

### **1.1. Identificación de micobacterias atípicas**

El primer paso que se lleva a cabo para confirmar la presencia de micobacterias ya sean tuberculosas o atípicas, es la realización de la tinción Ziehl – Neelsen, la cual no es más que una tinción diferencial al igual que la tinción de Gram. Esta tinción es específica para las micobacterias, ya que tienen una característica muy importante que es la resistencia al ácido alcohol, que permite la captación de la fucsina fenicada (fucsina mezclada con fenol) y retención aún con la acción de un decolorante, como el alcohol - ácido. Esta característica se debe al alto contenido de lípidos, particularmente a los ácidos micólicos que posee en la pared celular micobacteriana (Cortes, 2009).

Una vez se verifica la presencia de micobacterias atípicas, se procede con la identificación tradicional de las mismas. Esta identificación se basa en el análisis de ciertas características fenotípicas (biológicas o bioquímicas) como la velocidad de crecimiento, la producción de pigmento, la actividad de ciertas enzimas y/o la utilización de algunos sustratos. La realización de muchas de

estas técnicas requieren de varias semanas y no es posible en muchos casos, la diferenciación de miembros pertenecientes al mismo complejo (Godoy y col., 2008).

Recientemente se han venido utilizando técnicas de biología molecular para realizar la identificación en base a características genotípicas. Estas pruebas no sólo son más rápidas, sino sensibles y precisas, ya que no son modificables por condiciones ambientales. Entre los métodos moleculares destacan los basados en la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (RCP o sus siglas en inglés PCR), los cuales presentan una alta sensibilidad y especificidad. En la década de los 90, Telenti y colaboradores, implementaron con éxito el llamado Análisis de Restricción de productos de PCR o PRA (PCR Restriction Enzyme analysis), la cual se basa en la digestión enzimática con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, del producto de amplificación del gen *hsp65* (Godoy y col., 2008). Este gen contiene sitios de restricción que son únicos, así como epitopes que son comunes en las especies micobacterianas, permitiendo la diferenciación de las micobacterias en un período de 24 horas (Telenti y col., 1993). La técnica de PRA, además de ser de gran utilidad en el diagnóstico de infecciones por micobacterias, también ha sido descrita en la realización de análisis filogenéticos (Godoy y col., 2008).

Otros métodos tales como la cromatografía líquida de alta definición o la cromatografía de capa fina están limitados por la necesidad de estandarizar las condiciones de crecimiento. Es por ello que el uso de las técnicas moleculares como la secuenciación del gen 16S ARNr es una poderosa técnica que permite la diferenciación de especies (Telenti, 1993), debido a su presencia en todas las especies bacterianas, conteniendo tanto una región conservada con una región variable, haciendo de él un blanco ideal para propósitos taxonómicos. El gen 16S ARNr que codifica para la subunidad pequeña del ARNr, ha sido secuenciado en un gran número de especies micobacterianas (Soini y Musser, 2001), teniendo un tamaño aproximado de 1550 pb. Algunas veces es necesario secuenciar el gen completo para distinguir entre cepas (Sacchi y col., 2002) o para describir nuevas

especies. Sin embargo, para muchos aislados clínicos bacterianos la secuenciación de las primeras 500 pares de bases del gen suministra una adecuada diferenciación para identificar y de hecho suministra un gran porcentaje de diferencia entre especies, porque la región muestra un poco más de diversidad por kilobase secuenciada. El análisis de la secuencia del gen 16S ARNr puede discriminar mejor entre cepas de bacterias que los métodos fenotípicos, esto puede permitir una identificación más precisa de las cepas mal descritas, aislados raros o cepas fenotípicamente aberrantes (Clarridge, 2004).

Por otro lado, el análisis de la secuencia del gen *rpoB* fue sugerido como una herramienta alternativa para la identificación de micobacterias. Este gen codifica una de las subunidades de la ARN polimerasa (ARNP), la cual es una enzima crucial en el proceso transcripcional y es el blanco final de las vías regulatorias que controlan la expresión génica en todos los organismos vivos. En bacterias la ARNP es responsable de la síntesis de ARNm, ARNr y ARNt. Los 400 kDa del núcleo de la enzima consiste de cinco subunidades, incluyendo un dímero  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ), una subunidad  $\beta$ , una subunidad  $\beta'$  y una subunidad  $\omega$ . Esas subunidades son convertidas en holoenzimas después de la unión de una subunidad  $\sigma$ , la cual inicia la transcripción a partir de los promotores. La mayoría de las funciones catalíticas de la ARNP es llevada a cabo por la subunidad  $\beta$ , la cual es codificada por el gen *rpoB*. El origen evolutivo del ancestro del gen indica que tiene potencial para ser usado como un poderoso cronometro molecular. Desde la secuenciación del gen *rpoB*, este ha sido usado para la identificación molecular de bacterias en microbiología clínica (Adékambi, 2009) y como herramienta alternativa para identificar micobacterias (Kim, 1999).

La secuenciación parcial del gen *rpoB* (300 – 750 pb) permite la identificación precisa de muchos aislados clínicos. Este gen contiene regiones conservadas y variables alternantes. Varios estudios han indicado que la región hipervariable del gen *rpoB* es más discriminativo para la

identificación y filogenia a nivel de especies y subespecies. Esta región es localizada entre la posiciones 2576 - 2592 y la 3317 - 3337 y pueden ser secuenciadas usando sólo un par de iniciadores (Myco F y Myco R) (Adékambi, 2003). Por lo tanto, se recomienda la región hipervariable como el punto de inicio para la identificación bacteriana (Adékambi, 2009).

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



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Antecedentes Nacionales

Olivero y colaboradores en el año 2006, evaluaron muestras provenientes de pacientes venezolanos que presentaban infecciones en la piel y tejidos blandos, como consecuencia de haber sido sometidas al procedimiento de mesoterapia con productos que no poseían permiso sanitario en lugares inapropiados. De esas muestras se aislaron las micobacterias atípicas *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. simiae* y una nueva especie a la cual se le denominó *M. cosmeticum*. Ellos encontraron que algunas de las infecciones podrían estar relacionadas con el uso del desinfectante Gerdex. Este producto declaró en su etiqueta que tenía actividad tuberculicida, basado en estudios realizados con *M. smegmatis*.

Bello y colaboradores en el año 2006, evaluaron tres desinfectantes de producción nacional Gerdex, K-Iler y Microplus Action y demostraron que la actividad tuberculicida era ineficiente, ya que las micobacterias analizadas presentaron sensibilidad variable frente a estos desinfectantes, siendo considerada *M. smegmatis* como la más sensible y *M. abscessus* la más resistente. Esto sugirió que *M. smegmatis* no es una referencia apropiada para establecer la actividad tuberculicida.

Cortesía en el año 2007, realizó ensayos para determinar la CMI por el método de la GFP (Proteína Verde Fluorescente) en micobacterias atípicas y encontró que existían diferencias en la sensibilidad de las distintas especies de micobacterias a los QACs, al ser la acción micobacteriostática de éstos sobre *M. chelonae* y *M. abscessus* menor al compararlas con *M. smegmatis* y *M. terrae*. También encontró que de todos los QACs evaluados (CTAB, HPC, BLDBA,

entre otros), a las concentraciones ensayadas mostraba tener un menor efecto micobacteriostático sobre cada una de las micobacterias atípicas incluidas en su estudio.

Bello y colaboradores en el año 2008, evaluaron la eficacia del bromuro de lauril dimetil bencil amonio en esporas de *Bacillus atropheus*, así como también en *M. tuberculosis*, encontrando que este QACs no tiene ninguna actividad esporicida y una baja actividad tuberculicida.

Cortesía y colaboradores en el año 2010, ampliaron el estudio realizado en el año 2007 utilizando el método de dilución – neutralización, para evaluar el efecto de los compuestos de amonio cuaternario BLDBA y CTAP. Las especies micobacterianas que se incluyeron en el estudio fueron *M. massiliense*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, así como también una cepa perteneciente al complejo *tuberculosis*, *M. bovis* BCG. Los resultados indican que estos compuestos eran capaces de eliminar totalmente a *M. smegmatis*, teniendo ésta una frecuencia de sobrevivencia menor a 1 en  $10^5$ . Además, también se encontró que eliminó a la mayoría de la población de las especies *M. abscessus* y *M. chelonae*, pero con la aparición de colonias sobrevivientes a una frecuencia menor a 5 en 100, después de 20 minutos o 60 minutos de exposición a los QACs, con muy baja frecuencia de sobrevivencia después de 24 horas. Resultados equivalentes fueron obtenidos cuando se ensayaron las especies *M. massiliense*, *M. fortuitum* y *M. bovis* BCG. Estos resultados sugieren que el uso de los QACs no previene, sino que tal vez promueve la ocurrencia de infecciones causadas por micobacterias.

## 2.2. Antecedentes Internacionales

En el año 1997 Griffiths y colaboradores, realizaron ensayos de susceptibilidad a desinfectantes en cepas de *M. chelonae* aisladas de dos máquinas desinfectantes de endoscopio pertenecientes a distintos hospitales del Reino Unido. Ellos encontraron que estas cepas eran muy resistentes a soluciones de glutaraldehído al 2%, presentando poca o ninguna pérdida de viabilidad durante el período de exposición al desinfectante.

Ryu y colaboradores en el año 2004, evaluaron pacientes coreanos que presentaron lesiones en la piel aproximadamente 16 días después de haber iniciado sesiones de acupuntura, encontrando que esas lesiones eran provocadas por *M. abscessus*.

En el año 2004 Devi y colaboradores, aislaron a la micobacteria atípica *M. chelonae*, de un paciente al que se le realizó pocos meses antes una hernioplastia laparoscópica. Estos investigadores señalaron como causa probable de infección, un proceso de esterilización inadecuado como el uso de agua contaminada en el lavado del laparoscópio después de la descontaminación realizada con el desinfectante glutaraldehído, así como la dilución del desinfectante (superior a lo permitido) y al almacenamiento de este durante un largo período tiempo.

Nomura y colaboradores en el año 2004, lograron aislar de las maquinas donde se realizaba el lavado de los broncoscopios de un hospital, a *M. chelonae* y *M. abscessus*, hallando cepas de estas especies resistente a la solución de glutaraldehído al 2%.

En el 2006, Kantor detectó la presencia de *M. abscessus* en el esputo de un niño brasileño con compromiso pulmonar y digestivo debido a la Fibrosis Quística.

Girón y colaboradores en el año 2008, aislaron de varios hospitales micobacterias atípicas pertenecientes al complejo *M. avium*, así como a *M. abscessus* y *M. fortuitum* de muestras de esputo del 8% de los pacientes españoles con Fibrosis Quística que estaban incluidos dentro del estudio.

La resistencia a glutaraldehído y a otros aldehídos de especies cercanamente relacionadas a *M. chelonae*, han sido observados en estudios relacionados con la higiene en hospitales (Uttley y col.; Klinger y col. citados por Selvaraju, 2008).

Correa y colaboradores en el año 2009, lograron aislar e identificar por medio de la técnica de PRA *hsp65*, 26 aislados de *M. chelonae*, 2 de *M. abscessus* y 1 *M. fortuitum* de 70 pacientes que presentaron lesiones de piel luego de realizarse una mesoterapia en distintos centros de estética.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones causadas por las micobacterias atípicas se han vuelto un problema de salud pública a nivel mundial. El aumento en el número de infecciones en pacientes sometidos a trasplantes y procedimientos quirúrgicos es un ejemplo de ello. En países como Corea, se han reportado infecciones en la piel como consecuencia de la acupuntura (Koh, y col., 2010). En otros países se han reportado un incremento en el número de pacientes con Fibrosis Quística que se encuentran infectados con micobacterias atípicas (Oliver y col., 2001). Por otro lado la resistencia a desinfectantes se ha convertido en un problema creciente, dado que cada vez más, se reportan casos de micobacterias aisladas de equipos de clínicas y hospitales esterilizados con desinfectantes del tipo amonio cuaternario o aldehídos.

En Venezuela se ha vuelto común encontrar pacientes infectados con micobacterias como consecuencia de la práctica de cirugías estéticas tales como liposucción y aumento de mamas. También se han encontrado después de procedimientos menos invasivos como la mesoterapia, realizada con productos sin permiso sanitario aunado a un inapropiado proceso de esterilización de los instrumentos utilizados. Es por ese motivo que este proyecto tiene como finalidad el estudio del comportamiento de diferentes especies de micobacterias al ser expuestas a desinfectantes de amonio cuaternario, con el propósito de determinar la variedad de especies micobacterianas donde la aparición de cepas resistentes es común.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

- Caracterización de la resistencia de las cepas de micobacterias atípicas sometidas a desinfectantes derivados de amonio cuaternario.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Identificar las micobacterias que fueron facilitadas por el Doctor Jacobus De Waard, del Instituto de Biomedicina, mediante el uso de PRA - *hsp65*.
- Seleccionar las cepas de micobacterias atípicas resistentes a los desinfectantes derivados de amonio cuaternario y determinar la frecuencia de aparición de sobrevivientes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Especies micobacterianas

El material biológico empleado durante la realización de este estudio incluye diferentes micobacterias atípicas (tabla 3), las cuales fueron gentilmente cedidas por el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de La Universidad Central de Venezuela.

Tabla 3. Micobacterias atípicas empleadas durante la realización de este estudio.

Número de muestra	Especie	Procedencia
0	<i>M. smegmatis</i> mc 155	Cepa de referencia
1	<i>M. simiae</i> LTB 2082A	Secreción de mama
2	<i>M. abscessus</i> LTC23	Clínica
3	<i>M. chelonae</i> LTC432	Cultivo
4	<i>M. fortuitum</i> LTC145	Secreción
5	<i>M. kansasii</i> LTF2284	Espudo
6	<i>M. gordonae</i>	Agua de drenaje de equipo de gastroscopia
7	<i>M. mucogenicum</i> MNT003	Agua de ducha
8	<i>M. cosmeticum</i> LTA62A	Secreción
9	<i>M. scrofulaceum</i>	Clínica (aislada de Brasil)
11	<i>M. peregrinum</i> LTD1546	Secreción de implante de mama
12	<i>M. phlei</i> LTD1782B	Cultivo
13	<i>M. lentiflavum</i> LTD868	Clínica (aislada del Delta de Orinoco)
14	<i>M. flavescens</i>	Clínica (aislada de Brasil)
15	<i>M. massiliense</i>	Clínica (aislada de Brasil)
16	<i>M. intracellulare</i> LTE 2710	Espudo
17	<i>M. sherrisii</i> LTG3254	Clínica
18	<i>M. marinum</i>	Cepa de referencia
19	<i>M. bovis</i> BCG	Cepa de referencia
20	<i>M. abscessus</i> C (control positivo)	Clínica

### **5.2.5. Reactivos**

Todas las soluciones necesarias se prepararon con reactivos grado analítico o grado biología molecular, distribuidos comercialmente por las casas Difco, HIMEDIA, Sigma Chemical Co., New England Biolabs y PROMEGA. En caso de ser necesario, dichas soluciones se esterilizaron en una autoclave a 121°C (15 lb.) durante 20 minutos o, por filtración, utilizando para ello filtros Millipore de 0.22 micras.

### **5.1.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para micobacterias**

Las células micobacterianas se crecieron en medio líquido Difco o en medio sólido HIMEDIA. Ambos medios deben ser suplementados con OAD (ácido oleico, albúmina, glucosa, cloruro de sodio) al 10% y glicerol. Las incubaciones se realizaron a 37°C (exceptuando *M. marinum*, la cual fue crecida a temperatura ambiente), durante un rango de 3 a 31 días (dependiendo de la tasa de crecimiento de cada especie).

**5.1.3.1. Medio líquido Middlebrook 7H9:** se resuspendieron 2.35 g del medio base en 450 ml de agua destilada. Posteriormente se agregaron 2 ml de glicerol y 0.5 gr de Tween 80. Se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión (121°C) durante 15 min y luego se dejó enfriar hasta 45°C para suplementarlo con 50 ml de OAD bajo condiciones de esterilidad. La composición del medio se detalla en la tabla 4.

**5.1.3.2. Medio sólido Middlebrook 7H10:** se resuspendieron 9.735 g del medio base en 450 ml de agua destilada. Se agregaron 2 ml de glicerol y se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión (121°C)



durante 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar hasta 45°C y se suplementó con 50 ml de OAD bajo condiciones de esterilidad. La composición del medio se detalla en la tabla 4.

**5.1.3.3. Suplemento OAD (Oleico-Albúmina-Dextrosa):** se resuspendieron 25 g de albúmina, 10 g de glucosa y 4.25 g de cloruro de sodio en 500 ml de agua destilada. Posteriormente se le agregaron 2.5 ml de ácido oleico y se procedió a esterilizar por filtración (0.22 micras). Se almacenó a 4°C hasta su uso.

**5.1.3.4. Medio Ogawa – Kudoh:** se resuspendieron 6 g de fosfato monopotásico, 0.3 g de citrato de magnesio y 1.5 g de glutamato de sodio en 300 ml de agua destilada, añadiéndosele 12 ml de glicerol. Seguidamente se calentó para disolver, ajustando luego el pH a 5.3. Se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión (121°C) durante 15 minutos. Posteriormente se homogeneizó 600 ml de huevos enteros, para ser mezclados con la solución preparada previamente y con 12 ml de verde de malaquita (2%). Se licuó suavemente la mezcla y se ajustó el pH a 6.4. Esta mezcla fue repartida en tubos de vidrio, para finalmente ser introducidos en el coagulador durante 1 hora a 85°C. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

#### 5.1.3.5. Composición de medios de cultivo

**Tabla 4.** Composición de los medios de cultivo.

Medio	Composición
7H9 Difco	Sulfato de amonio (0.5 g/l), fosfato disódico (2.5 g/l), fosfato monopotásico (1.0 g/l), citrato de sodio (0.1 g/l), sulfato de magnesio (0.05 g/l), cloruro de calcio (0.0005 g/l), sulfato de zinc (0.001 g/l), sulfato de cobre (0.001 g/l), citrato de amonio férrico (0.04 g/l), ácido L – glutámico (0.5 g/l), piridoxina (0.001 g/l), biotina (0.0005 g/l), pH 6.6 a 25°C.

<b>7H10 HIMEDIA</b>	Sulfato de amonio (0.5 g/l), ácido L – glutámico (0.5 g/l), fosfato monopotásico (1.5 g/l), fosfato disódico (1.5 g/l), citrato de sodio (0.4 g/l), citrato de amonio férrico (0.04 g/l), sulfato de magnesio (0.025 g/l), cloruro de calcio (0.0005 g/l), sulfato de zinc (0.001 g/l), sulfato de cobre (0.001 g/l), clorhidrato de piridoxina (0.001 g/l), biotina (0.0005 g/l), verde de malaquita (0.00025 g/l), agar (15 g/l), pH 6.6 a 25°C.
<b>Ogawa - Kudoh</b>	fosfato monopotásico (6 g), citrato de magnesio (0.3g), glutamato de sodio (1.5 g), agua destilada (300 ml), glicerol (12 ml), huevos homogeneizados (600 ml), verde de malaquita (12 ml al 2%), pH 6.4 a 25°C.

## 5.2. Metodologías

### 5.2.1. Tinción Ziehl – Nielsen modificado de Cortes, 2009.

#### Proceso de tinción

1. Se tomó una pequeña porción de una colonia y se realizó un frotis sobre una lámina portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente.
2. Se fijó la muestra con calor mediante el uso de un mechero.
3. Se cubrió la totalidad del extendido con fucsina fenicada previamente filtrada.
4. La muestra fue flameada con la llama de un mechero cada 3 minutos, pasándolo por debajo de las láminas, hasta que se produjo la emisión de vapores fenólicos (cuando ocurría la evaporación de la fucsina se cubría nuevamente la lámina). Este paso se realizó durante 10 minutos.
5. Transcurrido el tiempo de contacto con la fucsina, se dejó enfriar y posteriormente se procedió a lavar la lámina suavemente con agua corriente.

#### Decoloración

1. Se colocó la muestra con alcohol – ácido al 3% durante 5 minutos y se lavó la lámina nuevamente con agua corriente.
2. Si el extendido conservó todavía el color rojo o rosado, se volvió a decolorar y se lavó nuevamente.

## **Contraste**

1. Se cubrió la muestra con azul de metileno durante un minuto.
2. Luego se lavó suavemente con agua corriente.
3. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente en posición vertical.

Se observó al microscopio utilizando el lente objetivo de 100X y aceite de inmersión. Las células con una coloración rosada se consideraron como ácido alcohol resistentes, mientras que las que se colorearon de azul fueron considerados como contaminantes.

### **5.2.2. Método de descontaminación Ogawa – Kudoh modificado de Cortes, 2009**

La descontaminación de las muestras se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se tomaron las colonias mediante un hisopado.
2. Luego se sumergió el hisopo en 3 ml de NaOH 2% durante 2 minutos.
3. Finalmente se tomó el hisopo y mediante movimientos rotatorios de éste, se sembró la muestra descontaminada en medio Ogawa – Kudoh (pH= 6,4).

### **5.2.3. Identificación de las especies micobacterianas. Modificado de Godoy y colaboradores, 2008**

**5.2.3.1. Aislamiento de ADN:** se inició el aislamiento del ADN micobacteriano, sembrando una asada de las micobacterias en estrías en medio sólido 7H10 Middlebrook suplementado con 10% de OAD. Luego, se tomó una colonia aislada y se resuspendió en 200 µl de agua ultrapura. Seguidamente se dejó hervir en baño de maría durante 10 minutos, para luego centrifugarlo a 4602 g durante 2 minutos. Finalmente se tomaron 5 µl del sobrenadante para usarse como sustrato en la PCR.

### 5.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN se empleó la enzima Go Taq (PROMEGA). La mezcla de reacción de la PCR se realizó como se indica en la tabla 5.

**Tabla 5.** Preparación de la mezcla madre para la PCR.

Reactivo	Concentración Final	Secuencias de los iniciadores
Buffer de reacción Go Tag	1X	
dNTPs	200 µM	
Iniciador Tb11	0.2 µM	5-ACCAACGATGGTGTGTCCAT
Iniciador Tb12	0.2 µM	5-CTTGTCGAACCGCATACCCT
Iniciador 16Sf		5-GTATTACCGCGGCTGCTG
Iniciador 16Sr		5-AAGAGTTTGATCATGGCTCA
Iniciador Myco f		5-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG
Iniciados Myco r		5-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC
DMSO	10%	
Go Taq polimerasa	0.02 U/µl	
Templado	----	
dH <sub>2</sub> O	----	

Las reacciones en cadena de la polimerasa fueron realizadas en las condiciones de ciclaje que se indican en las tablas 6, 7 y 8.

**Tabla 6.** Tabla de ciclaje para PCR del gen *hsp65* (Estandarización en el laboratorio).

Fase del PCR	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min.	1
Desnaturalización	95	30 seg.	45
Hibridación	55	30 seg.	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

**Tabla 7.** Tabla de ciclaje para PCR del 16S ARN (Estandarización en el laboratorio).

Fase del PCR	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	13 min.	1
Desnaturalización	95	1 min.	30
Hibridación	57	1 min.	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

**Tabla 8.** Tabla de ciclaje para PCR del gen *rpoB* (comunicación personal con la M.Sc. Claudia Cortesia).

Fase del PCR	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min.	1
Desnaturalización	95	30 sg.	40
Hibridación	68	30 sg.	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

**5.2.3.3. Visualización del producto de PCR:** la separación y resolución de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa en buffer TBE 1X (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M). La concentración de agarosa varió entre 1% y 2%, dependiendo de la masa molecular de los fragmentos de ADN a resolver en cada caso. Para colocar las muestras de ADN en los bolsillos del gel, éstas se mezclaron con 1/6 volúmenes de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol 0.25%, glicerol 50%). Una vez cargadas las muestras en el gel, se aplicó una corriente de 5 v/cm. En todas las electroforesis se incluyó un marcador de peso molecular apropiado. Los productos se visualizaron exponiendo el gel a luz UV indirecta a 320 nm, luego de ser teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), mediante la utilización de un transiluminador modelo FOTO/Prep (FOTODYNE Incorporated). Registrándose los resultados con una cámara fotográfica digital Olympus modelo C3020 (Olympus Optical Co., LTD) por medio del programa de computación Doc-it versión 2.2.0 (UVP, Inc).

El producto de amplificación obtenido para la proteína *hsp65* tiene un tamaño de 439 pb, correspondientes a la región entre las posiciones 398 y 836 del gen. El amplificado correspondiente al gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S, tiene una longitud de 500 pb (correspondientes a las primeras pares de bases de dicho gen); mientras que el correspondiente al gen *rpoB*, tiene 764 pb.

**5.2.3.4. Digestión del producto de PCR de *hsp65*:** una vez verificada la presencia del producto de amplificación, se procedió a digerir el mismo con las enzimas de restricción *BstEII* (New England Biolabs) y *HaeIII* (New England Biolabs), por medio de las cuales se obtuvo el patrón de restricción PRA (PCR Restriction Enzyme Analysis o en español Análisis de Restricción enzimática del Producto de PCR). Las digestiones se llevaron a cabo como se indica en la tabla 9.

**Tabla 9.** Digestión del producto de PCR de *hsp65*.

Reactivo	Concentración final		Reactivo	Concentración final
<i>BstEII</i>	0.4 U/μl		<i>HaeIII</i>	0.4 U/μl
Buffer de restricción	1X		Buffer de restricción	1X
BSA	1X		BSA	1X
Templado	-----		Templado	-----
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>		<b>Volumen total</b>	<b>25</b>

La digestión con la enzima de restricción *BstEII*, se llevó a cabo durante 60 minutos a 60°C, mientras la que se realizó con la enzima de restricción *HaeIII*, se llevó a cabo en el mismo período de tiempo, pero a 37°C.

**5.2.3.5. Análisis de los patrones de restricción generados por PRA *hsp65*:** para evaluar los productos de digestión se realizó una electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2%, según apartado 5.2.3.3. La identificación se realizó empleando el banco de datos de patrones de restricción PRAsite (<http://app.chuv.ch/prasite/index.htm>), en el cual se introdujo el tamaño de las bandas obtenidas en la digestión con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII* por separado, para cada una de las especies, obteniendo finalmente una lista de las especies portadoras de un patrón de digestión similar. La especie que alcanzó la puntuación más cercana a cero, se consideró como la primera opción para la identificación.

#### **5.2.4. Secuenciación del ADN**

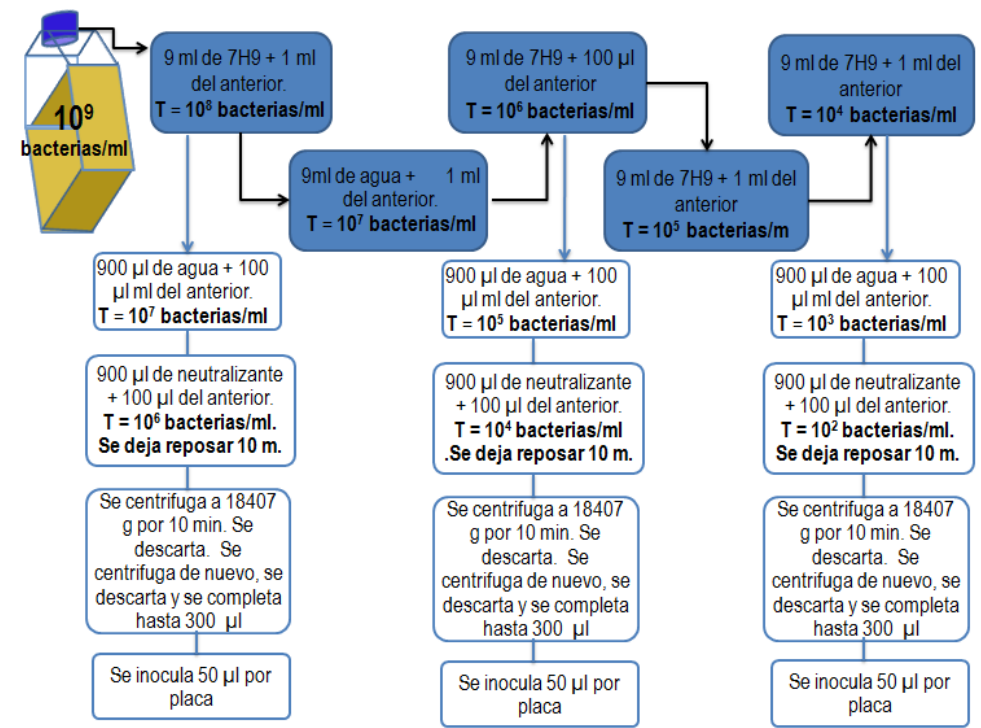
La secuencia de los productos de PCR (16S ARNr y *rpoB*), fue realizada en la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (U.E.G.F), Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), mediante la utilización de un secuenciador ABI3130XL.

Por requerimientos del U.E.G.F, el ADN a secuenciar se purificó empleando los estuches comerciales QIAquick® Gel extraction kit y QIAquick® PCR Purificación kit (Qiagen). Las concentraciones de las muestras entregadas oscilaban entre 60 ng/μl - 100 ng/μl de ADN y se secuenciaron con 2000 pmol de cada uno de los iniciadores.

#### **5.2.5. Ensayo de valoración del desinfectante de amonio cuaternario BLDBA y CTAP por el método de dilución – neutralización. Tomado de Marín, 2008 y modificado del original para ser aplicado a las micobacterias.**

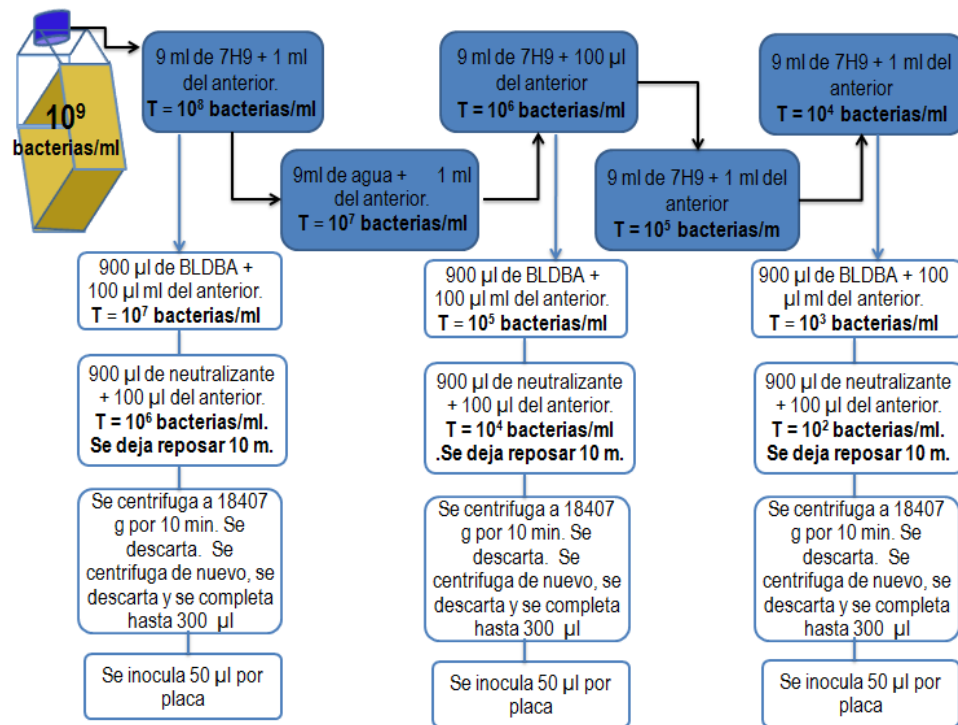
**Preparación de la suspensión bacteriana:** Se inocularon 5 ml de medio 7H9 suplementado con OAD, con una colonia aislada de cada una de las especies micobacterianas a estudiar, tomadas de una placa de medio 7H10. Una vez crecido los cultivos (dependiendo del tiempo de crecimiento de cada una de las especies), se tomaron 500 μl de los mismos y se inocularon en 5 ml de medio 7H9. Seguidamente se tomaron 2,5 ml y se inocularon en 25 ml de medio 7H9. Cuando los cultivos alcanzaron una D.O<sub>600</sub> de 1 (aproximadamente en 10<sup>9</sup> células/ml); se tomaron 10 ml y se colocaron en un tubo cónico de 50 ml, añadiéndosele 10 perlas de vidrio (diámetro= 0,2 mm), para luego colocarlo en el vortéx durante 30 segundos. Este tubo es a partir del cual se dio comienzo al ensayo.

Los controles del experimento se obtuvieron aplicándose el protocolo esquematizado en la figura 4. A diferencia de los protocolos esquematizados en las figuras 5 y 6, a los controles no se les añadió el desinfectante, siendo éste sustituido por agua destilada ultrapura. Las micobacterias fueron expuestas durante 20 minutos, 1 hora y 24 horas a los compuestos de amonio cuaternario BLDBA (10%) y CTAB (10%) durante el ensayo o en agua destilada ultrapura en los controles, incubándose a 37°C y en agitación durante la exposición (exceptuando a *M. marinum*, la cual fue incubada a temperatura ambiente y *M. bovis* BCG incubada sin agitación). De esta manera se obtuvo el número total de micobacterias que se encontraban en la dilución.



**Figura 4.** Controles del Ensayo de dilución – neutralización. T (título del cultivo)





**Figura 5.** Ensayo de dilución – neutralización, con BLDBA como desinfectante. T (título del cultivo).

Una vez obtenidas colonias resistentes, se tomaron dos de ellas y fueron crecidas hasta  $D.O_{600} = 1$ , realizándose el ensayo como esta descrito en la figura 6. Los controles se realizaron tal como se encuentra descrito en la figura 4.

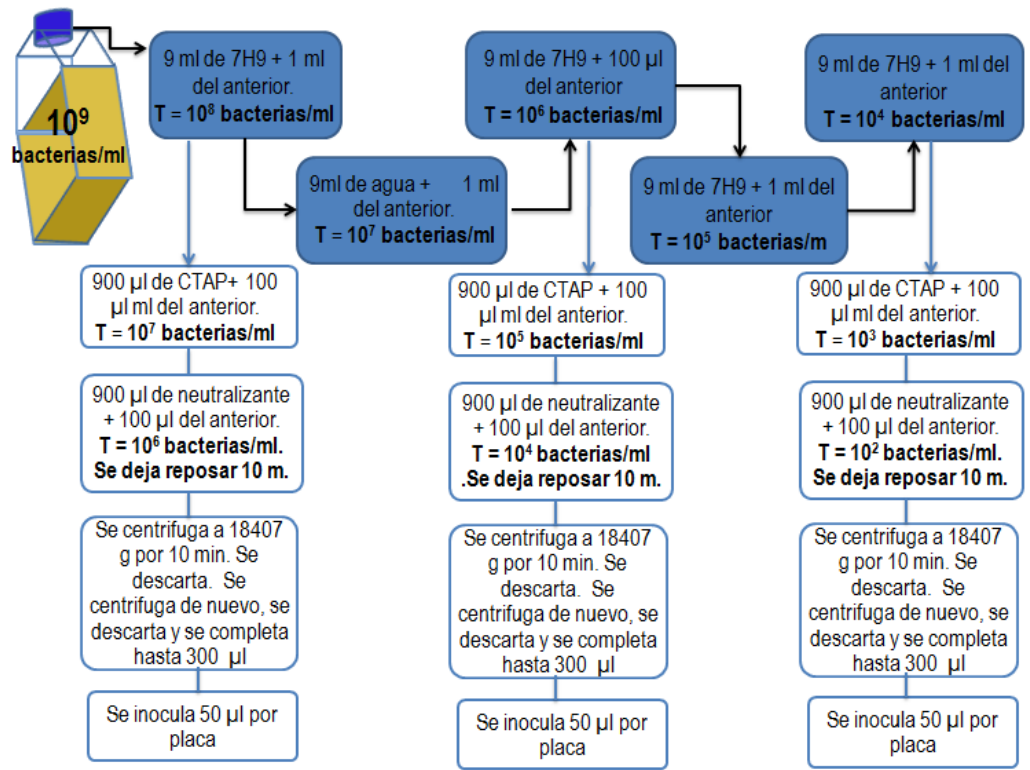


Figura 6. Ensayo de dilución – neutralización, con CTAP como desinfectante. T (título del cultivo).

Se calculó la frecuencia de selección de micobacterias sobrevivientes al desinfectante de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Frecuencia} = \frac{\# \text{ de micobacterias resistentes al desinfectante}}{\# \text{ de micobacterias totales contenidas en la dilución}}$$

### 5.2.6. Árboles filogenéticos

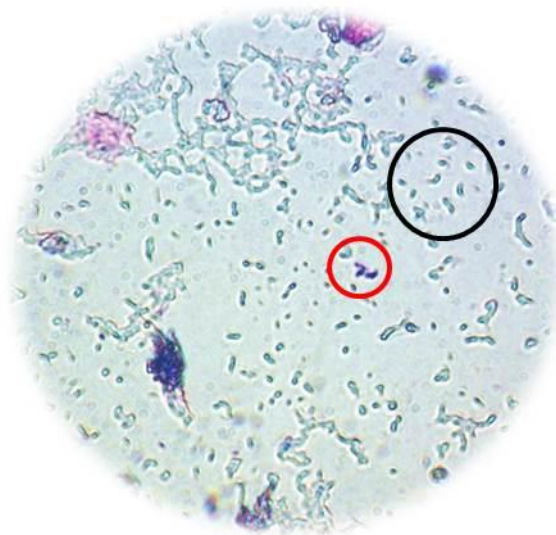
Los árboles filogenéticos fueron realizados con el programa MEGA 4.0.2

## 6. RESULTADOS

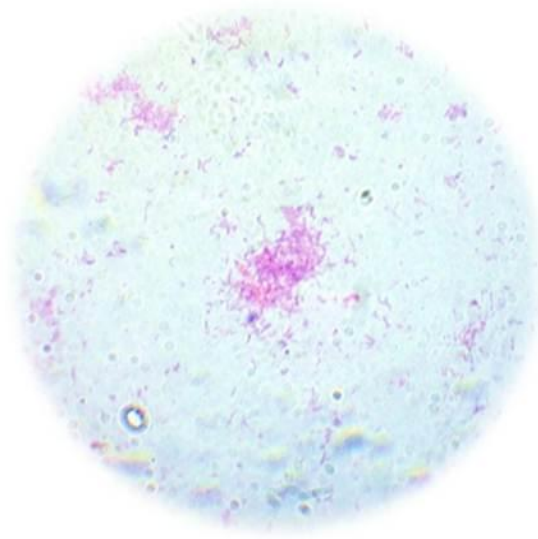
### 6.1. Tinción de Ziehl – Neelsen

Esta técnica se realizó con la finalidad de garantizar que los cultivos micobacterianos se encontraran puros, es decir, libres de cualquier tipo de contaminación ya sea por bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos, los cuales podrían interferir con la identificación molecular de las especies involucradas, así como los ensayos de dilución – neutralización a los cuales serían expuestas.

Se pudo evidenciar que de las 18 especies de micobacterias suministradas por el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, 10 se encontraban contaminadas. En la figura 7 se puede visualizar la imagen correspondiente a una tinción Ziehl – Neelsen, en la cual se puede observar tanto la presencia de micobacterias como de otro tipo de bacterias, consideradas como contaminantes del cultivo. Por otra parte en la figura 8, se observa la imagen correspondiente a una tinción Ziehl – Neelsen de un cultivo puro.



**Figura 7.** Tinción Ziehl – Neelsen de cultivo contaminado. Circulo naranja: micobacterias; circulo negro: bacterias contaminantes.



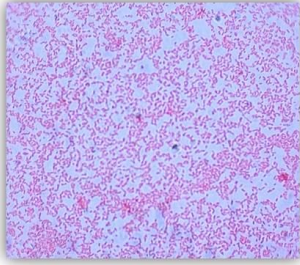
**Figura 8.** Tinción Ziehl – Neelsen de un cultivo puro.

## 6.2. Descontaminación

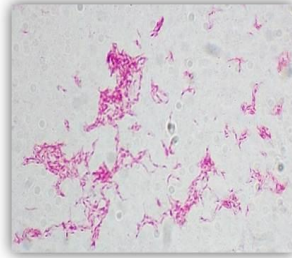
Este procedimiento fue llevado a cabo con el propósito de obtener cultivos puros, a partir de los cultivos que se encontraban contaminados.

La tinción Ziehl – Neelsen fue realizada nuevamente para corroborar la pureza de los cultivos. La tinción correspondiente a cada una de la especies involucradas en el estudio, fue realizada a las colonias visibles crecidas en el medio Ogawa – Kudoh (pH = 6,4), utilizado para la neutralización del NaOH al 2% con el cual se lleva a cabo la descontaminación. Después de haber realizado este procedimiento, se lograron recuperar puros a la mayoría de las especies micobacterianas. Aquellas especies que presentaron una contaminación alta fueron repicadas de gliceroles distintos a los inicialmente utilizados.

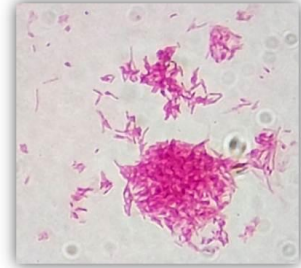
Estas tinciones de los cultivos descontaminados, fueron registradas fotográficamente, las cuales pueden ser observadas en las figuras que van desde la número 9 hasta la 27.



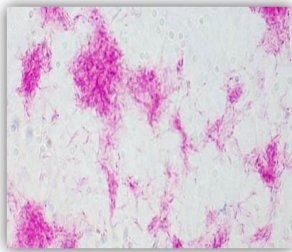
**Figura 9.** *M. smegmatis*



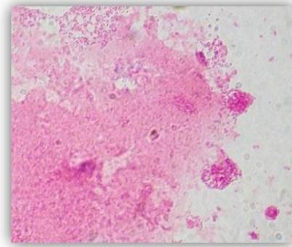
**Figura 13.** *M. fortuitum.*



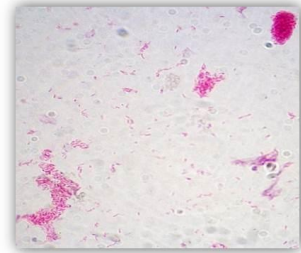
**Figura 16.** *M. mucogenicum.*



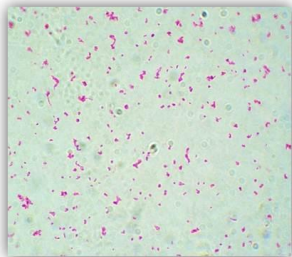
**Figura 10.** *M simiae*



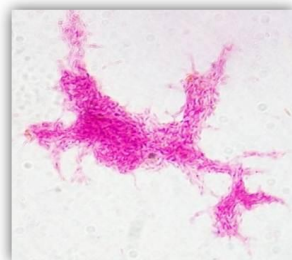
**Figura 14.** *M. kansasii.*



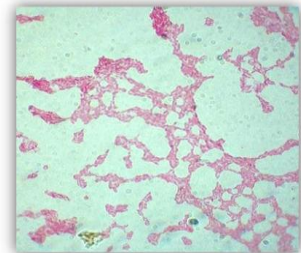
**Figura 17.** *M. cosmeticum.*



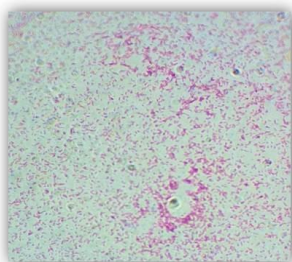
**Figura 11.** *M. abscessus.*



**Figura 15.** *M. gordonae.*



**Figura 18.** *M. scrofulaceum.*



**Figura 12.** *M. chelonae.*

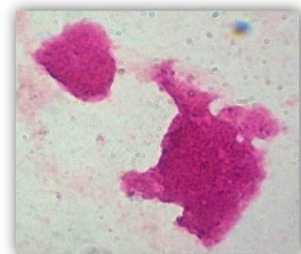


Figura 19. *M. peregrinum*.

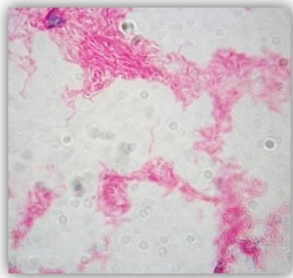


Figura 20. *M. phlei*.

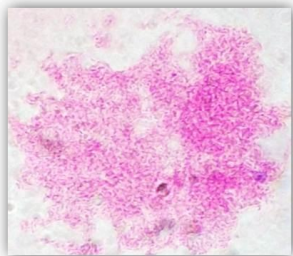


Figura 21. *M. lentiflavum*.

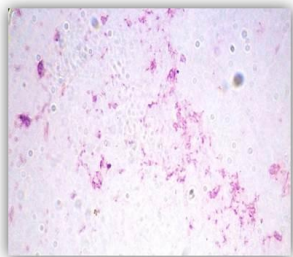


Figura 22. *M. flavescens*.

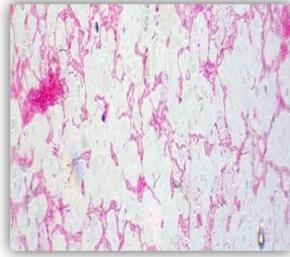


Figura 23. *M. massiliense*.

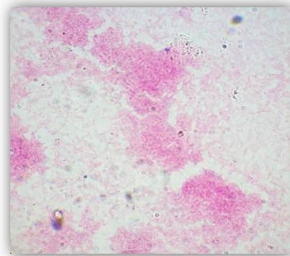


Figura 24. *M. intracellulare*.

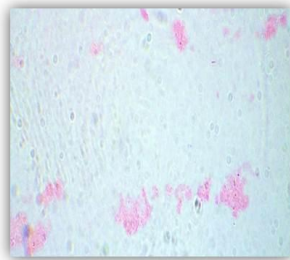


Figura 25. *M. marinum*.

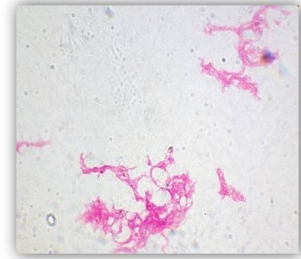


Figura 26. *M. bovis* BCG.

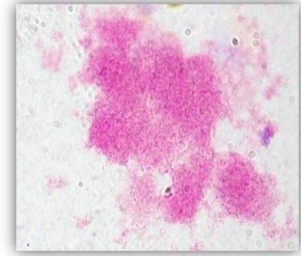
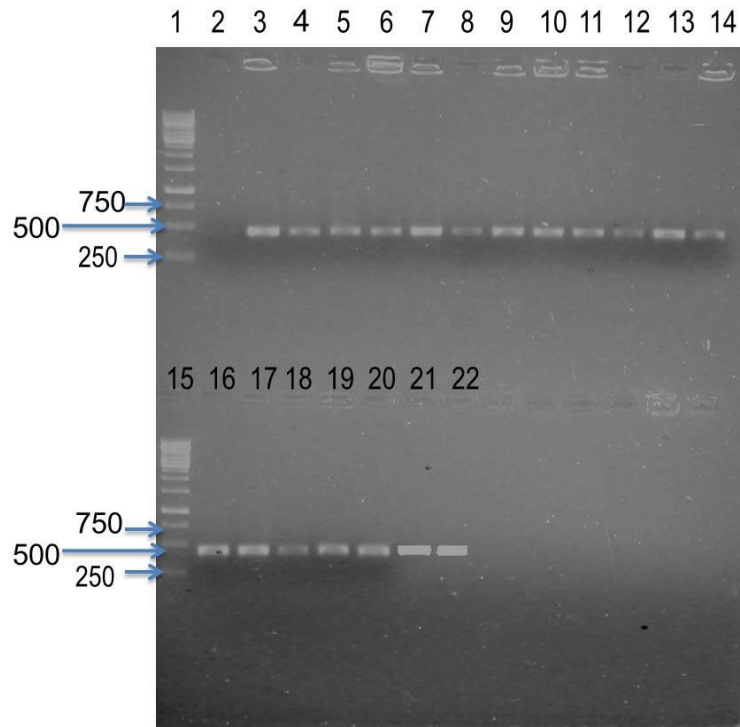


Figura 27. *M. abscessus* C.

### 6.3. Identificación de las especies micobacterianas a través de PRA *hsp65*.

Luego de confirmar que todos los cultivos se encontraban puros, se procedió con la amplificación de un segmento de 441 pb de la secuencia del gen *hsp65*, de todas las especies de

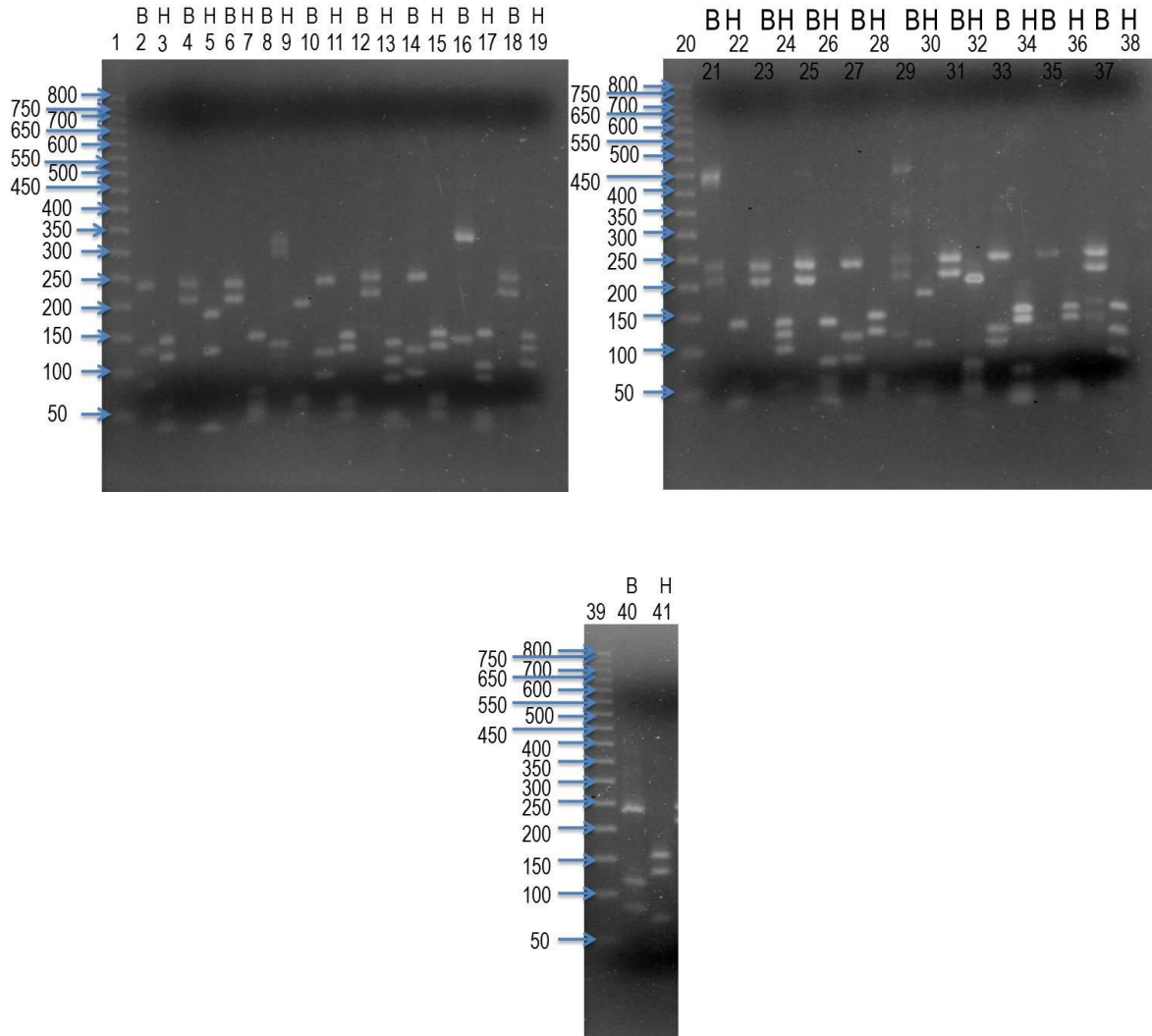
micobacterias incluidas en el estudio (figura 28). Para ello se estandarizaron las condiciones del PCR en el laboratorio (datos no mostrados).



**Figura 28. Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la amplificación del PRA *hsp 65*.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas), carril 2: control negativo; carril 3: control positivo (*M. smegmatis*); carril 4: *M. simiae*; carril 5: *M. abscessus*; carril 6: *M. chelonae*; carril 7: *M. fortuitum*; carril 8: *M. kansasii*; carril 9: *M. gordonae*; carril 10: *M. mucogenicum*; carril 11: *M. cosmeticum*; carril 12: *M. scrofulaceum*; carril 13: *M. peregrinum*; carril 14: *M. phlei*; carril 15: Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); carril 16: *M. lentiflavum*; carril 17: *M. flavescens*; carril 18: *M. massiliense*; carril 19: *M. intracellulare*; carril 20: *M. sherrissi*; carril 21: *M. marinum*; carril 22: *M. bovis* BCG.

Luego de la obtención del amplificado de 441 pb para cada una de la especies, se realizó la digestión con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaellI* por separado, consiguiéndose un patrón de restricción distinto para cada especie. En la figura 29 se observan las digestiones de los productos del PRA *hsp65* de las especies de micobacterias incluidas en el estudio. La corrida de las digestiones fue estandarizada (datos no mostrados), encontrándose que la concentración de agarosa más adecuada fue de 2%.

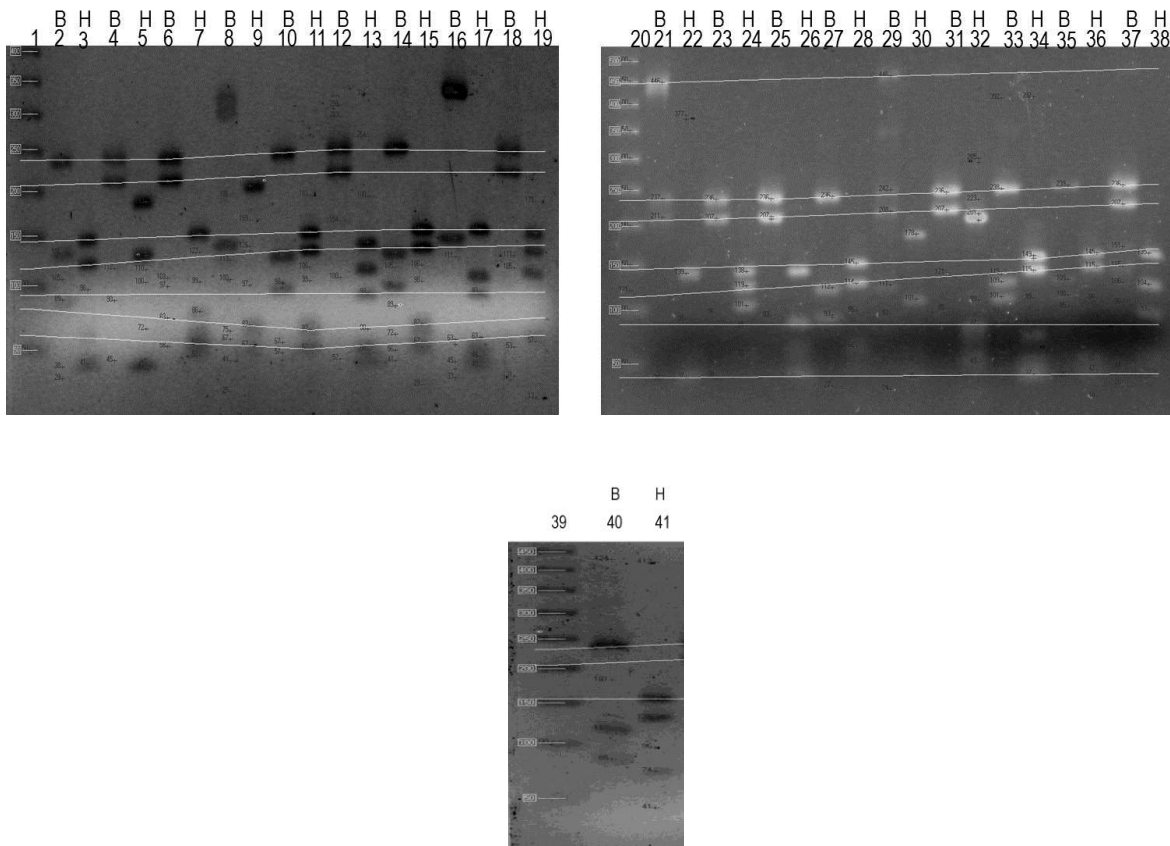




**Figura 29. Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los patrones de PRA obtenidos de los aislados estudiados.** B: *BstEII*, H: *HaeIII*. Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb (PROMEGA); carril 2: *M. smegmatis* + B; carril 3: *M. smegmatis* + H; carril 4: *M. simiae* + B; carril 5: *M. simiae* + H; carril 6: *M. abscessus* + B; carril 7: *M. abscessus* + H; carril 8: *M. chelonae* + B; carril 9: *M. chelonae* + H; carril 10: *M. fortuitum* + B; carril 11: *M. fortuitum* + H; carril 12: *M. kansasii* + B; carril 13: *M. kansasii* + H; carril 14: *M. gordonae* + B; carril 15: *M. gordonae* + H; carril 16: *M. mucogenicum* + B; carril 17: *M. mucogenicum* + H; carril 18: *M. cosmeticum* + B; carril 19: *M. cosmeticum* + H; carril 20: Marcador de peso molecular 50 pb (PROMEGA); carril 21: *M. scrofulaceum* + B; carril 22: *M. scrofulaceum* + H; carril 23: *M. peregrinum* + B; carril 24: *M. peregrinum* + H; carril 25: *M. phlei* + B; carril 26: *M. phlei* + H; carril 27: *M. lentiflavum* + B; carril 28: *M. lentiflavum* + H; carril 29: *M. flavescens* + B; carril 30: *M. flavescens* + H; carril 31: *M. massiliense* + B; carril 32: *M. massiliense* + H; carril 33: *M. intracellulare* + B; carril 34: *M. intracellulare* + H; carril 35: *M. sherrisii* + B; carril 36: *M. sherrisii* + H; carril 37: *M. marinum* + B; carril 38: *M. marinum* + H; Carril 39: Marcador de peso molecular 50 pb (PROMEGA); carril 40: *M. bovis* BCG + B; carril 41: *M. bovis* BCG + H.

### 6.3.1. Análisis de los geles de agarosa con el software Gel Pro Analyzer 3.1

Los patrones de digestión fueron analizados con el software Gel Pro Analyzer 3.1, utilizando para ello solo las imágenes digitales de los geles. En la figura 30, se divisan los geles luego de haber sido analizados, en donde se encuentran señalados el tamaño del gen *hsp65* digeridos con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, respectivamente.



**Figura 30. Análisis de la digestión del producto de PRA *hsp65* realizado con el software Gel Pro Analyzer 3.1.** B: *BstEII*, H: *HaeIII*. Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb (PROMEGA); carril 2: *M. smegmatis* + B; carril 3: *M. smegmatis* + H; carril 4: *M. simiae* + B; carril 5: *M. simiae* + H; carril 6: *M. abscessus* + B; carril 7: *M. abscessus* + H; carril 8: *M. chelonae* + B; carril 9: *M. chelonae* + H; carril 10: *M. fortuitum* + B; carril 11: *M. fortuitum* + H; carril 12: *M. kansasii* + B; carril 13: *M. kansasii* + H; carril 14: *M. gordonae* + B; carril 15: *M. gordonae* + H; carril 16: *M. mucogenicum* + B; carril 17: *M. mucogenicum* + H; carril 18: *M. cosmeticum* + B; carril 19: *M. cosmeticum* + H; carril 20: Marcador de peso molecular 50 pb (PROMEGA); carril 21: *M. scrofulaceum* + B; carril 22: *M. scrofulaceum* + H; carril 23: *M. peregrinum* + B; carril 24: *M. peregrinum* + H; carril 25: *M. Phlei* + B; carril 26: *M. phlei* + H; carril 27: *M. lentiflavum* + B; carril 28: *M. lentiflavum* + H; carril 29: *M. flavescens* + B; carril 30: *M. flavescens* + H; carril 31: *M. masilense* + B; carril 32: *M. masilense* + H; carril 33: *M. intracellulare* + B; carril 34: *M. intracellulare* + H; carril 35: *M. sherrisii* + B; carril 36: *M. sherrisii* + H; carril 37: *M. marinum* + B; carril 38: *M. marinum* + H; Carril 39: Marcador de peso molecular 50 pb (PROMEGA); carril 40: *M. bovis* BCG + B; carril 41: *M. bovis* BCG + H.

### 6.3.2. Confirmación de la identidad de las especies incluidas en el estudio.

Luego de analizar los patrones de restricción de todas las especies micobacterianas, se procedió a introducir el tamaño de cada uno de los fragmentos generados por la digestión con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, en la base de datos del PRASite, la cual arrojó los resultados que se encuentran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Tamaños de los fragmentos de la digestión de la proteína *hsp65*, obtenidos mediante el análisis de los geles con el software Gel Pro Analyzer 3.1. Las especies subrayadas son las que arrojaron la mejor puntuación de identificación en la base de datos contenida en el PRASite. Las especies en negritas son aquellas bajo las cuales fueron previamente identificadas en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina y en Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Microbiología y Biología Celular del IVIC (*M. marinum*, *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG). Las especies que se encuentran resaltadas en un fondo gris son aquellas que confirmaron su identidad.

Número de muestra	Especie	<i>BstEII</i>			<i>HaeIII</i>			Resultado
		1	2	3	1	2	3	
0	<b>Fragmento</b> <i>M. smegmatis</i>	234	131	89	144	117	41	<u><i>M. alvei</i> tipo 1</u> <i>M. senegalense</i> tipo 1 <i>M. woliski</i> tipo 1 <i>M. mageritense</i> tipo 1 <b><i>M. smegmatis</i> tipo 1</b>
1	<b><i>M. simiae</i></b>	237	207	0	183	126	42	<u><i>M. hassiacum</i> tipo 1</u> <i>M. thermoresistibile</i> tipo 1 <i>M. poriferae</i> tipo 1 <b><i>M. simiae</i> tipo 1</b>
2	<b><i>M. abscessus</i></b>	237	207	0	145	86	52	<u><i>M. chlorophenolicum</i> tipo 1</u> <i>M. chubuense</i> tipo 1 <i>M. obuense</i> tipo 1 <i>M. conspicuum</i> tipo 1 <i>M. phlei</i> tipo 1 <i>M. kubicae</i> tipo 1 <i>M. celatum</i> tipo 1 <i>M. poriferae</i> tipo 1 <b><i>M. abscessus</i> tipo 1</b>
3	<b><i>M. chelonae</i></b>	316	131	0	196	82	0	<u><i>M. haemophilum</i> tipo 1</u> <i>M. terrae</i> tipo 1 <b><i>M. chelonae</i> tipo 1</b>
4	<b><i>M. fortuitum</i></b>	236	114	98	144	117	82	<u><i>M. malmoense</i> tipo 1</u> <i>M. gordonae</i> tipo 10 <i>M. kansasii</i> tipo 4 <i>M. brisbanense</i> tipo 1 <i>M. tuberculosis complex</i> tipo 1 <i>M. gordonae</i> tipo 6

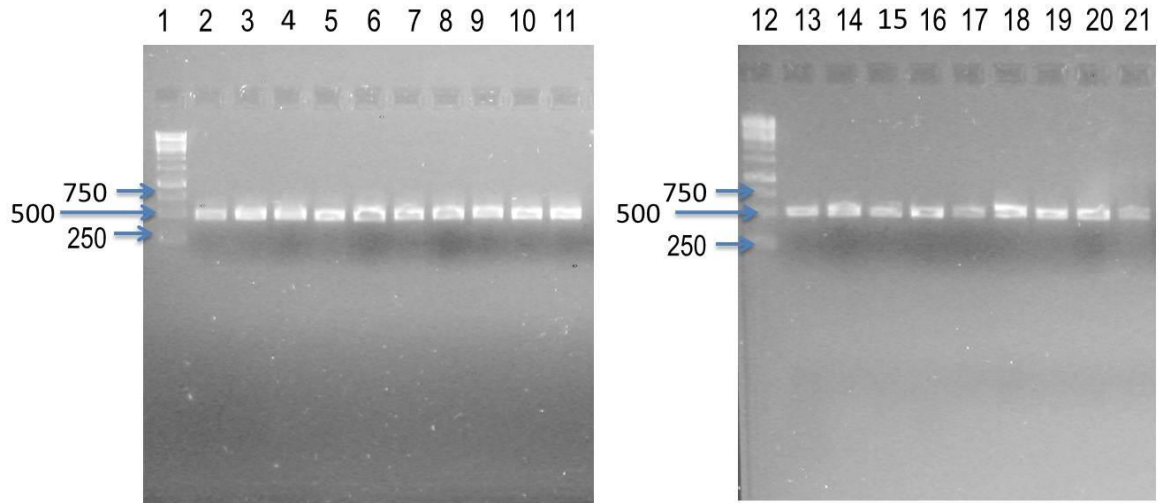
								<i>M. fortuitum</i> s. <i>acetadolyticum</i> tipo 1
								<i>M. intracellulare</i> tipo 1
								<b><i>M. fortuitum</i> tipo 1</b>
5	<i>M. kansasii</i>	237	207	0	126	105	93	<b><i>M. kansasii</i> tipo 1</b>
6	<i>M. gordonae</i>	238	114	96	144	117	82	<u><i>M. malmoense</i> tipo 2</u> <i>M. kansasii</i> tipo 4 <i>M. gordonae</i> tipo 10 <i>M. brisbanense</i> tipo 1 <i>M. tuberculosis</i> complex tipo 1
								<b><i>M. gordonae</i> tipo 6</b>
7	<i>M. mucogenicum</i>	313	131	0	144	100	93	<u><i>M. cosmeticum</i> tipo 1</u> <i>M. canariasense</i> tipo 1 <i>M. lacus</i> tipo 1 <i>M. kansasii</i> tipo 5 <i>M. kumamotoense</i> tipo 1 <i>M. gordonae</i> tipo 8
								<b><i>M. mucogenicum</i> tipo 3</b>
8	<i>M. cosmeticum</i>	228	199	0	128	109	86	<u><i>M. peregrinum</i> tipo 2</u> <i>M. porcinum</i> tipo 1 <i>M. septicum</i> tipo 1 <i>M. scrofulaceum</i> tipo 1 <i>M. intracellulare</i> tipo 4
9	<i>M. scrofulaceum</i>	440	0	0	139	37	0	<u><i>M. flavescens</i> tipo 1</u> <i>M. novocastrense</i> tipo 1 <i>M. tusciae</i> tipo 1 <i>M. brumae</i> tipo 1 <i>M. flavescens</i> tipo 3
11	<i>M. peregrinum</i>	236	207	0	138	119	101	<b><i>M. peregrinum</i> tipo 2</b>
12	<i>M. phlei</i>	236	207	0	138	90	40	<u><i>M. chubuense</i> tipo 1</u> <i>M. obuense</i> tipo 1 <i>M. chlorophenolicum</i> tipo 1 <i>M. conspicuum</i> tipo 1
								<b><i>M. phlei</i> tipo 1</b>
13	<i>M. lentiflavum</i>	236	112	93	145	114	66	<u><i>M. fortuitum</i> tipo 1</u> <i>M. fortuitum</i> s. <i>acetamidolyticum</i> tipo 1 <i>M. fortuitum</i> tipo 2 <i>M. houstonense</i> tipo 1 <i>M. neworleanense</i> tipo 1
14	<i>M. flavescens</i>	440	0	0	178	101	0	<u><i>M. tusciae</i> tipo 1</u> <i>M. triviale</i> tipo 1 <i>M. lentiflavum</i> tipo 1 <i>M. florentinum</i> tipo 1 <i>M. gilvum</i> tipo 1 <i>M. simiae</i> tipo 5
								<b><i>M. flavescens</i> tipo 3</b>
15	<i>M. massiliense</i>	236	207	0	201	87	49	<u><i>M. moriokaense</i> tipo 1</u> <i>M. bolletti</i> tipo 1
								<b><i>M. massiliense</i> tipo 1</b>
16	<i>M. intracellulare</i>	238	109	101	149	115	78	<u><i>M. malmoense</i> tipo 1</u> <i>M. gordonae</i> tipo 9 <i>M. heckeshornense</i> tipo 1
								<b><i>M. intracellulare</i> tipo 1</b>
17	<i>M. sherrisii</i>	239	109	100	145	115	52	<u><i>M. fortuitum</i> tipo 1</u> <i>M. intracellulare</i> tipo 1

								<i>M. gordonae</i> tipo 9
								<i>M. chimaera</i> tipo 1
								<i>M. fortuitum</i> s.
								<i>acetamidolyticum</i> tipo 1
18	<i>M. marinum</i>	237	207	0	135	104	93	<i>M. kansasii</i> tipo 1
								<i>M. branderi</i> tipo 1
								<i>M. intracellulare</i> tipo 2
								<i>M. malmoense</i> tipo 2
								<i>M. marinum</i> tipo 1
19	<i>M. bovis</i> BCG	236	117	85	156	131	74	<i>M. tuberculosis complex</i> tipo 1

De las diecinueve especies analizadas, solo tres coincidieron con los patrones de digestión de las especies bajo las cuales fueron inicialmente identificadas; dos del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina (*M. kansasii* y *M. peregrinum*) y una del Laboratorio de genética Molecular del Instituto de Microbiología y Biología Celular del IVIC (*M. bovis* BCG), razón por la cual se implementó una segunda técnica para la identificación, la secuenciación del amplificado correspondiente al gen 16S ARNr.

#### 6.4. Secuenciación del gen 16S ARNr

El primer paso en llevarse a cabo para la secuenciación del gen 16S ARNr, fue la estandarización de la amplificación de un fragmento de este gen, específicamente de sus primeras 500 pares de bases (datos no mostrados), pudiéndose mostrar finalmente en la figura 31, el producto de PCR del fragmento de interés de todas las especies incluidas en el estudio, una vez purificados y cuantificados para su posterior secuenciación.



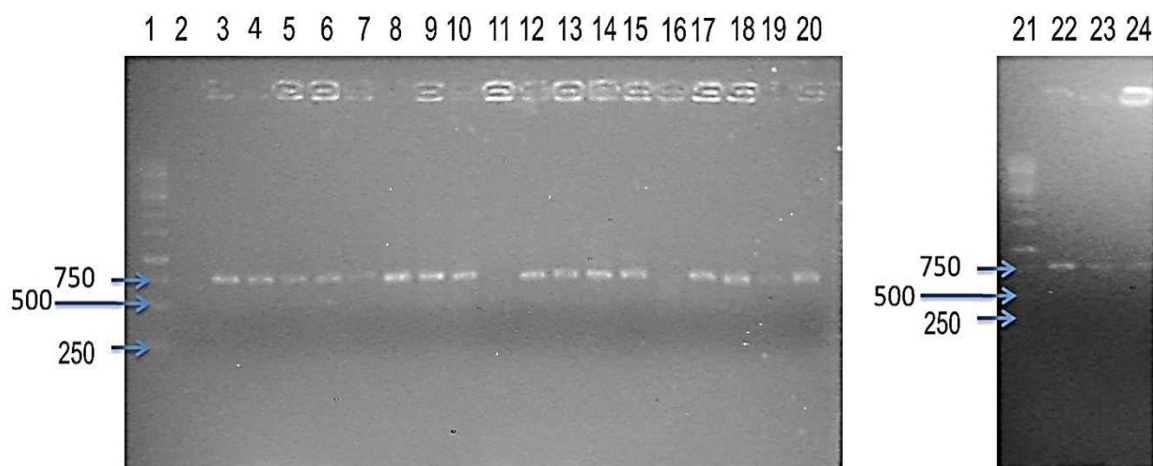
**Figura 31. Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la amplificación del gen 16S ARNr.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas), carril 2: *M. smegmatis*; carril 3: *M. simiae*; carril 4: *M. abscessus*; carril 5: *M. chelonae*; carril 6: *M. fortuitum*; carril 7: *M. kansasii*; carril 8: *M. goodii*; carril 9: *M. mucogenicum*; carril 10: *M. cosmeticum*; carril 11: *M. scrofulaceum*; carril 12: Marcador de peso molecular 1 Kb; carril 13: *M. peregrinum*; carril 14: *M. phlei*; carril 15: *M. lentiflavum*; carril 16: *M. flavescens*; carril 17: *M. massiliense*; carril 18: *M. intracellulare*; carril 19: *M. sherrisii*; carril 20: *M. marinum*; carril 21: *M. bovis* BCG

En la figura 31 se puede observar el amplificado correspondiente a las primeras 500 pares de bases del gen 16S ARNr para las diferentes especies micobacterianas.

Debido a la incongruencias obtenidas al verificar la identidad de las micobacterias incluidas en el estudio, con los resultados del PRA *hsp65* (tabla 10) y la secuenciación del gen 16S ARNr (ver anexos 1-17), se decidió secuenciar el gen *rpoB*, el cual posee una región hipervariable haciéndolo por lo tanto más adecuado para la identificación y la discriminación filogenética a nivel de especies y sub especies (Adékambi y col., 2009).

## 6.5. Secuenciación del gen *rpoB*

La estandarización del PCR para la amplificación del fragmento de 764 pb del gen *rpoB* (datos no mostrados), fue el paso inicial para su secuenciación. Seguidamente se realizó la purificación (figura 32) y cuantificación del producto de PCR, para finalmente ser secuenciados.



**Figura 32. Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la amplificación del gen *rpoB*.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); carril 2: control negativo; carril 3: control positivo (*M. smegmatis*); carril 4: *M. simiae*; carril 5: *M. abscessus*; carril 6: *M. chelonae*; carril 7: *M. fortuitum*; carril 8: *M. kansasii*; carril 9: *M. gordonae*; carril 10: *M. mucogenicum*; carril 11: *M. cosmeticum*; carril 12: *M. scrofulaceum*; carril 13: *M. peregrinum*; carril 14: *M. phlei*; carril 15: *M. lentiflavum*; carril 16: *M. flavescens*; carril 17: *M. massiliense*; carril 18: *M. intracellulare*; carril 19: *M. sherrisii*; carril 20: *M. marinum*; carril 21: Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); carril 22: *M. bovis* BCG; carril 23: *M. cosmeticum*; carril 24: *M. flavescens*.

En la figura 32 se puede visualizar las amplificaciones correspondientes al gen *rpoB* de diferentes especies micobacterianas. En los carriles 11 y 16 no se observan amplificadas correspondientes a *M. cosmeticum* y *M. flavescens*, respectivamente. Por este motivo, se realizó nuevamente el PCR para estas especies, permitiendo obtener la amplificación correspondiente en una mejor concentración.

En la tabla 11 se puede observar la comparación de los resultados obtenidos al realizar la técnica de PRA *hsp65*, de la secuenciación del gen 16S ARNr y del gen *rpoB*, para lograr finalmente la correcta identificación de las micobacterias involucradas en el estudio.

**Tabla 11.** Comparación de los resultados obtenidos para la identificación de las micobacterias utilizadas en el estudio (las especies resaltadas en gris son aquellas bajo las cuales se identificaron finalmente las muestras, ----- no se realizó la técnica).

Número de muestra	Identificación en Biomedicina	PRA <i>hsp65</i>	Gen 16S ARNr	Gen <i>rpoB</i>
0 ( <i>M. smegmatis</i> )	-----	<i>M. alvei</i>	Sin secuencia	Sin secuencia
1	<i>M. simiae</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. simiae</i>
2	<i>M. abscessus</i>	<i>M. chlorophenicum</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. abscessus</i>
3	<i>M. chelonae</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
4	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. malmoense</i>	Bacteria no cultivable <i>M. conceptionense</i> <i>M. farcinogenes</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. senegalense</i>
5	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
6	<i>M. gordonae</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. conceptionense</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. farcinogenes</i> <i>M. houstonense</i>	<i>M. senegalense</i>
7	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. fortuitum</i>
8	<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. porcinum</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>
9	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. acalpuensis</i>	<i>M. flavescens</i>
11	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. porcinum</i>	<i>M. porcinum</i>
12	<i>M. phlei</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. phlei</i>	No arrojó resultado
13	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	Sin secuencia
14	<i>M. flavescens</i>	<i>M. tusciae</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>	Sin secuencia
15	<i>M. massiliense</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>Mycobacterium. sp.</i>	<i>M. massiliense</i>
16	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. chimaera</i> Bacteria <i>Corynebacterineae</i> no cultivable	<i>M. timonense</i>
17	<i>M. sherrisii</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>M. timonense</i>
18 ( <i>M. marinum</i> )	-----	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>
19 ( <i>M. bovis</i> BCG)	-----	<i>M. del complejo tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
20 ( <i>M. abscessus</i> C)	-----	-----	-----	-----



Luego de analizar y comparar los resultados obtenidos de las secuencias del gen 16S ARNr, del gen *rpoB* (ver detalles en anexos 1-32) y los patrones de PRA *hsp65* de todas las muestras en la tabla 10, se pudo comprobar la identidad de las muestras 1, 2, 3, 5, 12 y 15; ya que estas correspondían a las mismas especies bajo las cuales fueron previamente identificadas en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina. La especie 18 y 19 del Laboratorio de Genética Molecular del IVIC, resultaron ser *M. marinum* y *M. bovis* BCG respectivamente, tal y como se esperaba. Las especies *M. smegmatis* y *M. abscessus* C fueron identificadas en estudio previos, tomándose la primera como control de identificación, pero sin lograr obtener una secuencia para su verificación. Los resultados obtenidos para las muestras restantes (4, 6, 7, 8, 9, 11, 16 y 17) indicaron que podían ser identificadas como otras especies diferentes a la que inicialmente se consideraba que correspondían, mientras que la identificación de la muestra 14 no pudo ser lograda.

## **6.6. Ensayos dilución-neutralización**

Con el fin de verificar la eficiencia de la actividad micobactericida del desinfectante de amonio cuaternario BLDBA, se llevaron a cabo ensayos de dilución – neutralización. Estos ensayos consisten en exponer durante tres períodos de tiempo distintos (20 minutos, 1 hora y 24 horas), a tres concentraciones distintas del inóculo ( $10^6$  células/ml,  $10^4$  células/ml y  $10^2$  células/ml, partiendo de un inóculo con un título de  $1 \times 10^9$  células/ml) a 20 especies micobacterianas a dicho desinfectante.

Luego de seleccionar colonias sobrevivientes, se prosiguió a tomar dos de ellas al azar para repetir el ensayo de dilución – neutralización, pero esta vez con el amonio cuaternario CTAP y sólo en los períodos de incubación 20 minutos y 1 hora, ya que sólo en éstos fueron encontradas micobacterias resistentes. Las especies seleccionadas para esta parte del ensayo fueron *M.*

*abscessus* C (control de sobrevivencia) (muestra # 20), *M. abscessus* (2), *M. senegalense* (4), *M. porcinum* (11), *M. timonense* (16), *M. marinum* (muestra # 18) y *M. bovis* BCG (muestra # 19). *M. abscessus* C fue seleccionada como control positivo, ya que fue reportada por Cortesía y col., en el 2010 como una de las especies más resistentes a los QACs, mientras que *M. bovis* BCG es el modelo que permitió inferir el comportamiento de *M. tuberculosis*, debido a que en el laboratorio no se cuenta con instalaciones adecuadas para trabajar con micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Las especies restantes fueron escogidas simplemente porque luego de ser expuestas al BLDBA pudieron sobrevivir a la acción de dicho compuesto.

#### 6.6.1 Ensayo de dilución – neutralización de *M. smegmatis* (muestra # 0)

En la tabla 12 se puede visualizar los resultados obtenidos del ensayo dilución – neutralización realizada a *M. smegmatis*. También se observan los datos obtenidos para los controles (sin exposición al desinfectante) como los datos obtenidos durante la exposición al amonio cuaternario BLDBA.

**Tabla 12.** Ensayo dilución – neutralización de *M. smegmatis* (muestra # 0).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	11	9	8	0	0	0
	8	9	14	0	0	0
	12	5	12	0	0	0
<b>Promedio</b>	10,33	7,66	11,33	0	0	0
<b>Título</b>	2,06x10 <sup>9</sup>	1,53x10 <sup>9</sup>	2,66x10 <sup>9</sup>			
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	434	444	Césped	0	0	0
	485	439	Césped	0	0	0
	506	483	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	475	455,33	-----	0	0	0

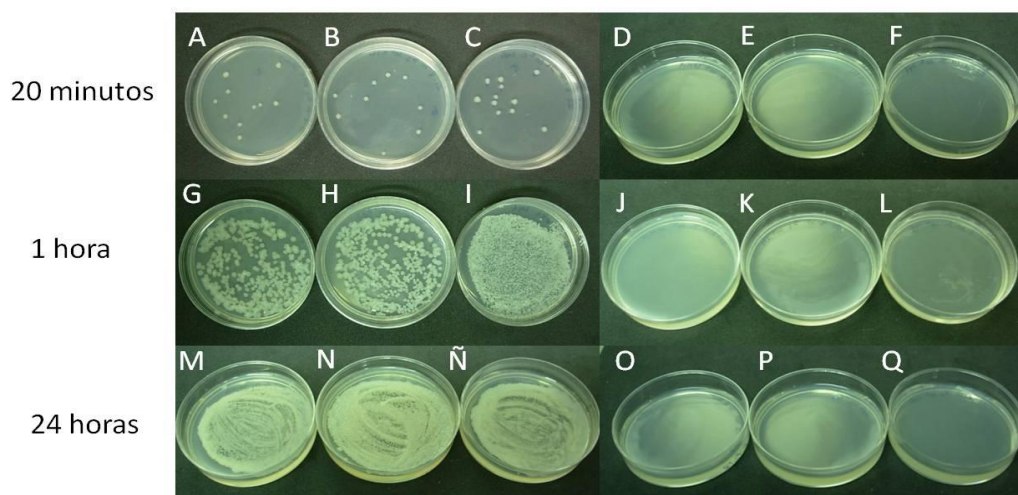
<b>Título</b>	9,50x10 <sup>8</sup>	9,10x10 <sup>8</sup>	-----			
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	0	0	0
	Césped	Césped	Césped	0	0	0
	Césped	Césped	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	0	0	0
<b>Título</b>	4,13x10 <sup>8</sup>	6,80x10 <sup>8</sup>	6,81x10 <sup>9</sup>			
<b>Frecuencia</b>				<b>&lt;9,68x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;1,31x10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;8,83x10<sup>-6</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

La tabla anterior muestra que la actividad micobactericida del desinfectante de amonio cuaternario BLDBA contra la especie *M. smegmatis* fue óptima, ya que no hubo ninguna micobacteria de esta especie capaz de sobrevivir al estar en contacto con el desinfectante en ninguna de las condiciones ensayadas.

Por otra parte la frecuencia de selección de micobacterias sobrevivientes al desinfectante de amonio cuaternario BLDBA de esta especie fue menor a  $9,68 \times 10^{-6}$  luego de 20 minutos, menor a  $1,31 \times 10^{-5}$  después de 1 hora y finalmente menor a  $8,83 \times 10^{-6}$  a las 24 horas de exposición. Siendo en los tres períodos de tiempo menor a cero, ratificando así la efectividad de la acción micobactericida de este compuesto al menos en esta especie.

En la figura 33 se muestra un registro fotográfico del experimento, en la cual se puede observar tanto las placas correspondientes al control del experimento (A, B, C, G, H, I, M, N, Ñ) como las placas correspondientes al ensayo (D, E, F, J, K, L, O, P, Q), en las cuales no se observó ninguna colonia resistente para la especie *M. smegmatis* (D, E, F, J, K, L, O, P, Q).



**Figura 33. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de *M. smegmatis* (muestra # 0).** A: control de la dilución  $10^{-7}$ ; B: control de la dilución  $10^{-5}$ ; C: control de la dilución  $10^{-3}$ ; D: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; E: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; F: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; G: control de la dilución  $10^{-7}$ ; H: control de la dilución  $10^{-5}$ ; I: control de la dilución  $10^{-3}$ ; J: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; K: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; L: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; M: control de la dilución  $10^{-7}$ ; N: control de la dilución  $10^{-5}$ ; Ñ: control de la dilución  $10^{-3}$ ; O: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; P: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; Q: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ .

### 6.6.2. Ensayo de dilución – neutralización de *M. abscessus* C (muestra # 20)

En la tabla 13 se puede visualizar los resultados obtenidos del ensayo dilución neutralización realizado a *M. abscessus* C. También se observan los datos obtenidos para los controles (sin exposición al desinfectante) como los datos obtenidos durante la exposición al amonio cuaternario BLDBA.

**Tabla 13.** Ensayo dilución – neutralización de *M. abscessus* C (muestra # 20).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
$10^{-7}$	33	43	Césped	3	1	0
	40	45	Césped	4	17	0
<b>Promedio</b>	36,5	44	-----	3,5	9	0
<b>Título</b>	$7,30 \times 10^9$	$8,80 \times 10^9$	-----			
<b>Frecuencia</b>				$9,59 \times 10^{-2}$	$2,05 \times 10^{-1}$	0

<b>10<sup>-5</sup></b>	602	532	Césped	64	22	0
	600	470	Césped	44	18	0
<b>Promedio</b>	601	501	-----	54	20	0
<b>Título</b>	1,20x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>9</sup>	-----			
<b>Frecuencia</b>				<b>8,98x10<sup>-2</sup></b>	<b>3,99x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	Césped	484	0
	Césped	Césped	Césped	Césped	514	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	-----	499	0
<b>Título</b>	2,36x10 <sup>9</sup>	1,18x10 <sup>9</sup>	6,64x10 <sup>9</sup>			
<b>Frecuencia</b>				-----	<b>1,13x10<sup>-3</sup></b>	<b>&lt;3,01x10<sup>-6</sup></b>

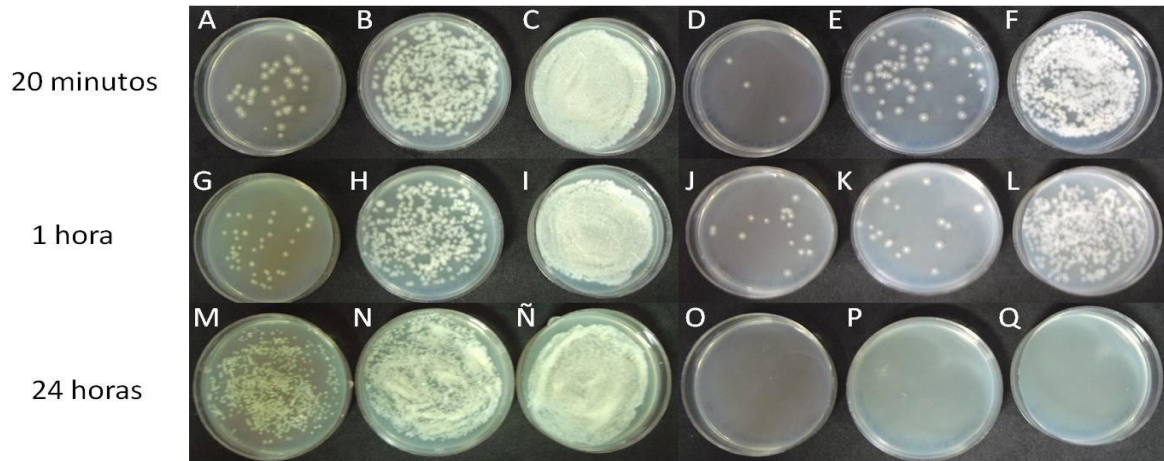
(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

En la tabla anterior, se puede observar que la especie *M. abscessus* C, sobrevivió al contacto con el desinfectante BLDBA, obteniendo micobacterias resistentes a los 20 minutos y a 1 hora de exposición en las tres diluciones en las cuales se llevó a cabo el ensayo. Esto trajo como consecuencia que el número de colonias sobrevivientes en la dilución 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-5</sup> disminuyera aproximadamente 10 veces con respecto a sus controles, lo que indica que la exposición al desinfectante durante 20 minutos conlleva a una inadecuada eliminación de este microorganismo, debido a la eliminación de solo una pequeña porción la población total micobacteriana sometida al desinfectante. Cuando se incrementó el tiempo de exposición al desinfectante de 20 minutos a 1 hora en la dilución 10<sup>-5</sup> se observó una disminución de 25 veces del número de colonias cuantificadas en su control respectivo, mientras que en la dilución 10<sup>-7</sup> fue de 5 veces, indicando igual que en el caso anterior la ineficiencia del desinfectante. En cuanto a la dilución 10<sup>-3</sup> no se pudo observar una disminución en el número de colonias, debido a la obtención de un césped bacteriano haciendo imposible visualizar el efecto del desinfectante, ya que no hay diferencias cuantitativas ni cualitativas en él (no se puede apreciar visualmente la disminución o aumento en la cantidad de

colonias resistentes al desinfectante), razón por la cual no se puede comparar el resultado de dicha dilución; al aumentar el tiempo de exposición de 20 minutos a 1 hora, se observó evidentemente una disminución de la población micobacteriana. Finalmente al exponer a la población micobacteriana durante 24 horas, no se observó la aparición de ninguna sobreviviente en ninguna de las tres diluciones ensayadas, indicando estos resultados que para lograr la eliminación total de este microorganismo, no se debe utilizar dicho desinfectante durante períodos menores a 24 horas.

La frecuencia de selección de resistentes al desinfectante BLDBA de la especie *M. abscessus* C, no pudo ser calculado durante los 20 minutos de exposición debido a la presencia de un césped bacteriano. Por otro lado después de 1 hora de exposición la frecuencia alcanzo un valor de  $1,13 \times 10^{-3}$ , indicando que 20 minutos y 1 hora de exposición al desinfectante no son suficientes para lograr la eliminación de este microorganismo, siendo solo es capaz este compuesto de lograrlo luego de 24 horas, período en la cual la frecuencia alcanza un valor menor a  $3,01 \times 10^{-6}$  interpretándose este como la aparición de ninguna colonia sobreviviente.

En la figura 34 se muestra un registro fotográfico del experimento, en la cual se puede observar tanto las placas correspondientes al control del experimento (A, B, C, G, H, I, M, N, Ñ) como las placas correspondientes al ensayo (D, E, F, J, K, L, O, P, Q), en las cuales sólo se observaron colonias resistente para la especie *M. abscessus* C, a los 20 minutos y 1 hora de exposición en las tres condiciones ensayadas (D, E, F, J, K y L).



**Figura 34. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de *M. abscessus* C (muestra # 20).** A: control de la dilución  $10^{-7}$ ; B: control de la dilución  $10^{-5}$ ; C: control de la dilución  $10^{-3}$ ; D: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; E: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; F: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; G: control de la dilución  $10^{-7}$ ; H: control de la dilución  $10^{-5}$ ; I: control de la dilución  $10^{-3}$ ; J: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; K: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; L: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; M: control de la dilución  $10^{-7}$ ; N: control de la dilución  $10^{-5}$ ; Ñ: control de la dilución  $10^{-3}$ ; O: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; P: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; Q: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ .

Para comprobar si las micobacterias que sobrevivieron a la exposición al amonio cuaternario BLDBA, conservaban su condición de resistentes; se tomaron dos colonias sobrevivientes y se inocularon en medio líquido suplementado con OAD, hasta que alcanzaron un  $D.O_{600nm} = 1$ . Seguidamente se realizó el ensayo de dilución - neutralización con el desinfectante amonio cuaternario CTAP.

#### 6.6.2.1. Colonia resistente 1 de *M. abscessus* C (muestra # 20)

La tabla 14 contiene el resultado del ensayo dilución – neutralización con el amonio cuaternario CTAP de la colonia 1 resistente a BLDBA seleccionada de la especie *M. abscessus* C.

**Tabla 14.** Ensayo dilución – neutralización de la colonia 1 resistente de *M. abscessus* C (muestra # 20).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	9	17	1	0
	9	19	0	0
<b>Promedio</b>	9	18	0,5	0
<b>Título</b>	1,80x10 <sup>9</sup>	3,60x10 <sup>9</sup>		
<b>Frecuencia</b>			<b>5,56x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	700	600	3	0
	836	750	2	0
<b>Promedio</b>	768	675	2,5	0
<b>Título</b>	1,53x10 <sup>9</sup>	1,35x10 <sup>9</sup>		
<b>Frecuencia</b>			<b>3,26x10<sup>-3</sup></b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	63	35
	Césped	Césped	89	35
<b>Promedio</b>	-----	-----	76	35
<b>Título</b>	5x10 <sup>8</sup>	5,60x10 <sup>8</sup>		
<b>Frecuencia</b>			<b>8,44x10<sup>-4</sup></b>	<b>1,94x10<sup>-4</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

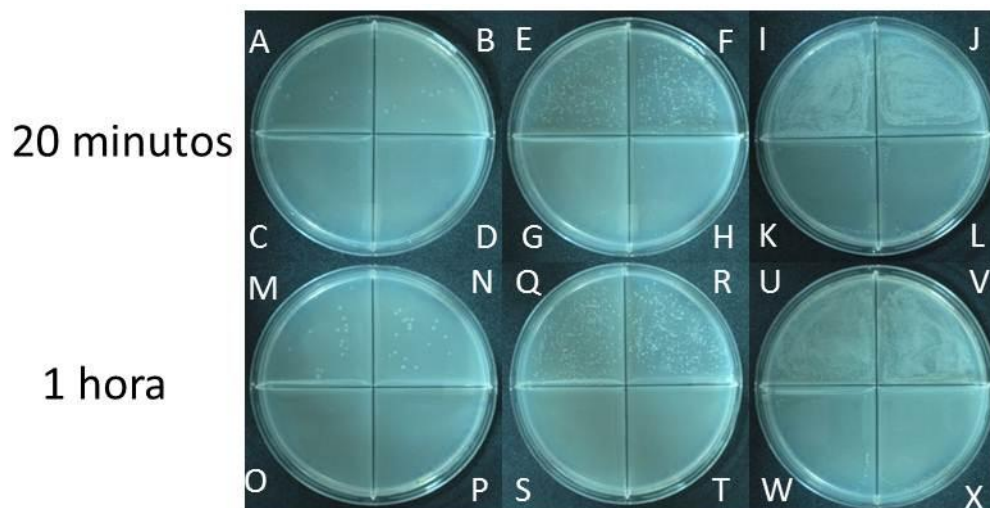
En la tabla anterior se puede observar la selección de micobacterias sobrevivientes a los 20 minutos en las tres diluciones en las cuales se realizó el ensayo, mientras que al ser expuestas al desinfectante durante 1 hora sólo pudieron contabilizarse sobrevivientes en la dilución 10<sup>-3</sup>. Se puede notar que al ser expuestos al desinfectante durante 20 minutos, el número de colonias en las diluciones 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-5</sup> disminuyó aproximadamente 9 y 300 veces, respectivamente al ser comparados con sus controles correspondientes, lo que indica que 20 minutos de exposición al desinfectante conlleva a una inadecuada eliminación de este microorganismo. Cuando se incrementó el tiempo de exposición al desinfectante de 20 minutos a 1 hora, se observó la eliminación total del microorganismo, exceptuando la dilución 10<sup>-3</sup> donde solo se recuperó una



pequeña parte de las población micobacteriana existente antes de la exposición, por lo cual se podría inferir que en esta condición específicamente, el desinfectante es totalmente ineficaz.

Por otra parte, se puede visualizar una frecuencia de selección de sobrevivientes en el orden de  $10^{-4}$  en ambos períodos de exposición, indicando que el desinfectante es ineficaz cuando se exponen a las micobacterias durante 20 minutos y que su acción micobactericida se ve disminuida al aumentar la cantidad de micobacterias en el ensayo aunque se incremente el tiempo de exposición.

En la figura 35 se muestra el registro fotográfico del experimento, en el que se puede observar tanto las placas correspondientes al control del experimento (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R, U y V) como las placas correspondientes al ensayo (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T, W y X). En estas placas se observaron colonias sobrevivientes al desinfectante amonio cuaternario CTAP a los 20 minutos en las tres diluciones ensayadas, mientras que durante 1 hora de exposición sólo fueron observadas en la dilución  $10^{-3}$  (C, D, G, H, K, L, W y X).



**Figura 35. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de la colonia 1 resistente de *M. abscessus* C (muestra # 20).** A y B: control de la dilución  $10^{-7}$  a los 20 minutos; E y F: control de la dilución  $10^{-5}$  a los 20 minutos; I y J: control de la dilución  $10^{-3}$ ; C y D: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; G y H: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; K y L: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; M y N: control de la dilución  $10^{-7}$ ; Q y R: control de la dilución  $10^{-5}$ ; U y V: control de la dilución  $10^{-3}$ ; O y P: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; S y T: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; W y X: ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ .

### 6.6.2.2. Colonia resistente 2 de *M. abscessus* C (muestra # 20)

La tabla 15 contiene el resultado de la segunda colonia resistente seleccionada de la especie *M. abscessus* C.

**Tabla 15.** Ensayo dilución – neutralización de la colonia 2 resistente de *M. abscessus* C (muestra # 20).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	29	66	0	0
	35	39	0	0
<b>Promedio</b>	32	52,5	0	0
<b>Título</b>	6,40x10 <sup>9</sup>	1,05x10 <sup>10</sup>		
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	733	800	6	3
	799	830	0	4
<b>Promedio</b>	766	815	3	3,5
<b>Título</b>	1,53x10 <sup>9</sup>	1,63x10 <sup>9</sup>		
<b>Frecuencia</b>			<b>3,92x10<sup>-3</sup></b>	<b>4,29x10<sup>-3</sup></b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	86	61
	Césped	Césped	150	63
<b>Promedio</b>	-----	-----	118	62
<b>Título</b>	5,60x10 <sup>8</sup>	5,20x10 <sup>8</sup>		
<b>Frecuencia</b>			<b>4,21x10<sup>-3</sup></b>	<b>2,38x10<sup>-3</sup></b>

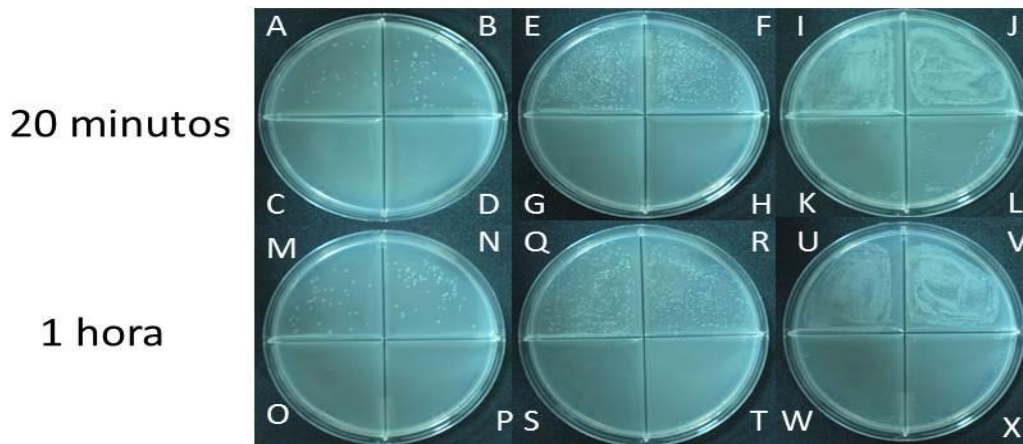
(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

En la tabla anterior se observa que las células provenientes de esta colonia, son menos sensible al desinfectante que las correspondientes a la colonia 1. Esto es debido a que se contabilizaron sobrevivientes en ambos períodos de exposición (20 minutos y 1 hora) en las diluciones 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-3</sup>. En la dilución 10<sup>-5</sup> se puede observar la disminución del número de colonias entre 250 y 230 veces aproximadamente con respecto a sus controles correspondientes en ambos períodos de exposición, lo que indica que al someter a las células a ambos tratamientos conlleva a la

eliminación inadecuada de este microorganismo. Con respecto a la dilución  $10^{-3}$ , se observa una evidente disminución del número de colonias ya que los controles en ambos períodos resultaron en un césped bacteriano, indicando que en esta condición el desinfectante no tiene una acción micobactericida eficaz sobre la población micobacteriana.

La frecuencia de selección de resistentes al desinfectante CTAP, se mantiene prácticamente sin ningún cambio, al aumentar el tiempo de exposición, lo que ratifica que la actividad micobactericida de este compuesto no acaba eliminando por completo a la población, sino que permite la aparición de sobrevivientes cuando el número de micobacterias es igual o mayor a  $10^4$  células/ml, por lo que una vez más se puede observar que el número de micobacterias sometidas al desinfectante es un factor importante que afecta su actividad.

En la figura 36 se muestra un registro fotográfico del experimento, en el cual se puede observar tanto las placas correspondientes al control del experimento (A, B, E, F I, J, M, N, Q, R, U y V) como las placas correspondientes al ensayo (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T, W y X), en las cuales se observaron colonias sobrevivientes al desinfectante amonio cuaternario CTAP en las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-3}$  en ambos períodos de exposición (K, L, W y X).



**Figura 36. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización de la colonia 2 resistente de *M. abscessus* C (muestra # 20).** A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup> ; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; M: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; N: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; Ñ: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; O: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; P: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; Q: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

Los ensayos concernientes a el resto de las especies micobacterianas incluidas en el estudio pueden observar detalladamente en los anexo 33-74.

En la tabla 16 se observan las frecuencias de aparición de micobacterias sobrevivientes encontradas para cada una de las especies incluidas en el estudio, que comprenden a la especies expuestas al BLDBA así como las colonias sobrevivientes de las especies escogidas sometidas al CTAP. Las frecuencias se encuentran colocadas en la tabla en orden descendente.

**Tabla 16.** Comparación de las frecuencias de selección de sobrevivientes de todas las especies micobacterianas incluidas en el estudio.

Orden de resistencia	Número de muestra	Especie	Frecuencia 20 minutos	Frecuencia 1 hora	Frecuencia 24 horas
1	16	<i>M. timonense</i> Colonia 1	$7,56 \times 10^{-2} - 1,20 \times 10^{-1}$	$5,41 \times 10^{-2} - 9,55 \times 10^{-2}$	-----
2	6	<i>M. senegalense</i>	$7,46 \times 10^{-2} - 1,46 \times 10^{-1}$	$2,55 \times 10^{-2} - 6,71 \times 10^{-2}$	$<2,08 \times 10^{-6}$
3	20	<i>M. abscessus</i> C	$8,98 \times 10^{-2} - 9,59 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-3} - 2,05 \times 10^{-1}$	$<3,01 \times 10^{-6}$
4	15	<i>M. massiliense</i>	$6,45 \times 10^{-2} - 7,99 \times 10^{-2}$	$3,43 \times 10^{-3} - 2,23 \times 10^{-2}$	$<1,07 \times 10^{-7}$
5	16	<i>M. timonense</i> Colonia 2	$3,21 \times 10^{-2} - 6,81 \times 10^{-2}$	$1,34 \times 10^{-1} - 3,29 \times 10^{-1}$	-----
6	18	<i>M. marinum</i>	$1,19 \times 10^{-2} - 2,27 \times 10^{-2}$	$2,45 \times 10^{-2}$	$<1,63 \times 10^{-4}$
7	2	<i>M. abscessus</i> Colonia 1	$3,59 \times 10^{-2}$	$6,54 \times 10^{-3}$	-----
8	2	<i>M. abscessus</i> Colonia 2	$3,67 \times 10^{-3}$	$2,79 \times 10^{-3} - 2,14 \times 10^{-2}$	-----
9	19	<i>M. bovis</i> BCG	$7,47 \times 10^{-3} - 1,37 \times 10^{-2}$	$1,72 \times 10^{-2} - 3,65 \times 10^{-2}$	$1,31 \times 10^{-5}$
10	20	<i>M. abscessus</i> C Colonia 2	$3,92 \times 10^{-3} - 4,21 \times 10^{-3}$	$2,38 \times 10^{-3} - 4,29 \times 10^{-3}$	-----
11	20	<i>M. abscessus</i> C Colonia 1	$8,44 \times 10^{-4} - 5,56 \times 10^{-2}$	$1,94 \times 10^{-4}$	-----
12	16	<i>M. timonense</i>	$2,91 \times 10^{-4}$	$<1,35 \times 10^{-6}$	$<2,70 \times 10^{-6}$
13	8	<i>M. porcinum</i>	$3,33 \times 10^{-6} - 1,67 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-6}$	$<8,53 \times 10^{-8}$
14	11	<i>M. porcinum</i>	$3,13 \times 10^{-6}$	$<3,51 \times 10^{-6}$	$<2,70 \times 10^{-7}$
15	2	<i>M. abscessus</i>	$2,70 \times 10^{-6}$	$3,19 \times 10^{-6}$	$<2,94 \times 10^{-6}$
16	6	<i>M. senegalense</i> Colonia 2	$8,47 \times 10^{-7}$	$<2,47 \times 10^{-6}$	-----
17	18	<i>M. marinum</i> Colonia 2	$<1,54 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	-----
18	12	<i>M. phlei</i>	$<3,33 \times 10^{-5}$	$<2,50 \times 10^{-5}$	$<4,44 \times 10^{-6}$
19	18	<i>M. marinum</i> Colonia 1	$<1,54 \times 10^{-5}$	$<1,67 \times 10^{-5}$	-----
20	0	<i>M. smegmatis</i>	$<9,68 \times 10^{-6}$	$<1,31 \times 10^{-5}$	$<8,83 \times 10^{-6}$
21	4	<i>M. senegalense</i>	$<4,44 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-5}$	$<4,48 \times 10^{-7}$
22	7	<i>M. cosmeticum</i>	$<3,23 \times 10^{-6}$	$<2,17 \times 10^{-6}$	$<9,43 \times 10^{-7}$
23	6	<i>M. senegalense</i> Colonia 1	$<1,75 \times 10^{-6}$	$<1,83 \times 10^{-6}$	-----
24	11	<i>M. porcinum</i> Colonia 2	$<8,33 \times 10^{-7}$	$<8,70 \times 10^{-7}$	-----
25	11	<i>M. porcinum</i> Colonia 1	$<6,94 \times 10^{-7}$	$<6,25 \times 10^{-7}$	-----

(----- indica que no se llevó a cabo el ensayo durante ese período de tiempo). La mayoría de las frecuencias de selección encontradas para cada tiempo de exposición oscilan dentro de un rango, ya que fueron obtenidas a través de los resultados arrojados de cada una de las tres diluciones de la suspensión bacteriana ( $D_{600} = 1$ ) que fueron sometidas al mismo período de exposición.

En la tabla anterior se puede observar que los dos compuestos de amonio cuaternario tienen una actividad micobactericida eficaz contra las especies *M. marinum* (colonia sobreviviente 1 y 2) *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. senegalense* wt y su colonia sobreviviente 1, *M. cosmeticum*, y las dos colonias sobrevivientes de *M. porcinum* cuando son expuestas al desinfectante durante 20 minutos, aun cuando los compuestos son neutralizados, alcanzando valores de frecuencia de selección de sobrevivientes comprendidas entre  $1/10^5$  -  $1/10^7$ . Por otra parte las frecuencias de aparición de sobrevivientes más altas fueron registradas en las especies *M. timonense* (colonia sobreviviente 1 y 2), *M. senegalense*, *M. abscessus* C, *M. massiliense*, *M. marinum*, *M. abscessus* (colonia sobreviviente 1 y 2) y *M. bovis* BCG con frecuencias comprendidas entre  $1/10^3$  a  $1/10^1$ . Cabe destacar que no se pudo observar el comportamiento de las colonias resistentes de *M. bovis* BCG, ya que no se observó crecimiento micobacteriano en ninguna de las condiciones ensayadas con el desinfectante CTAP.

Para finalizar la investigación concerniente a la resistencia de las micobacterias a los compuestos de amonio cuaternario, se realizaron 3 árboles filogenéticos usando el programa MEGA 4.0.2 (figuras 37, 38 y 39) basados en las secuencias de los genes 16S ARNr y *rpoB*, por medio de los cuales se determinó si las especies más resistentes se encontraban estrechamente relacionadas.

En la figura 37 se muestra el árbol filogenético obtenido con las secuencias del gen 16S ARNr, basado en el alineamiento de las primeras 500 pares de bases del gen que fueron secuenciadas para cada una de las especies estudiadas.

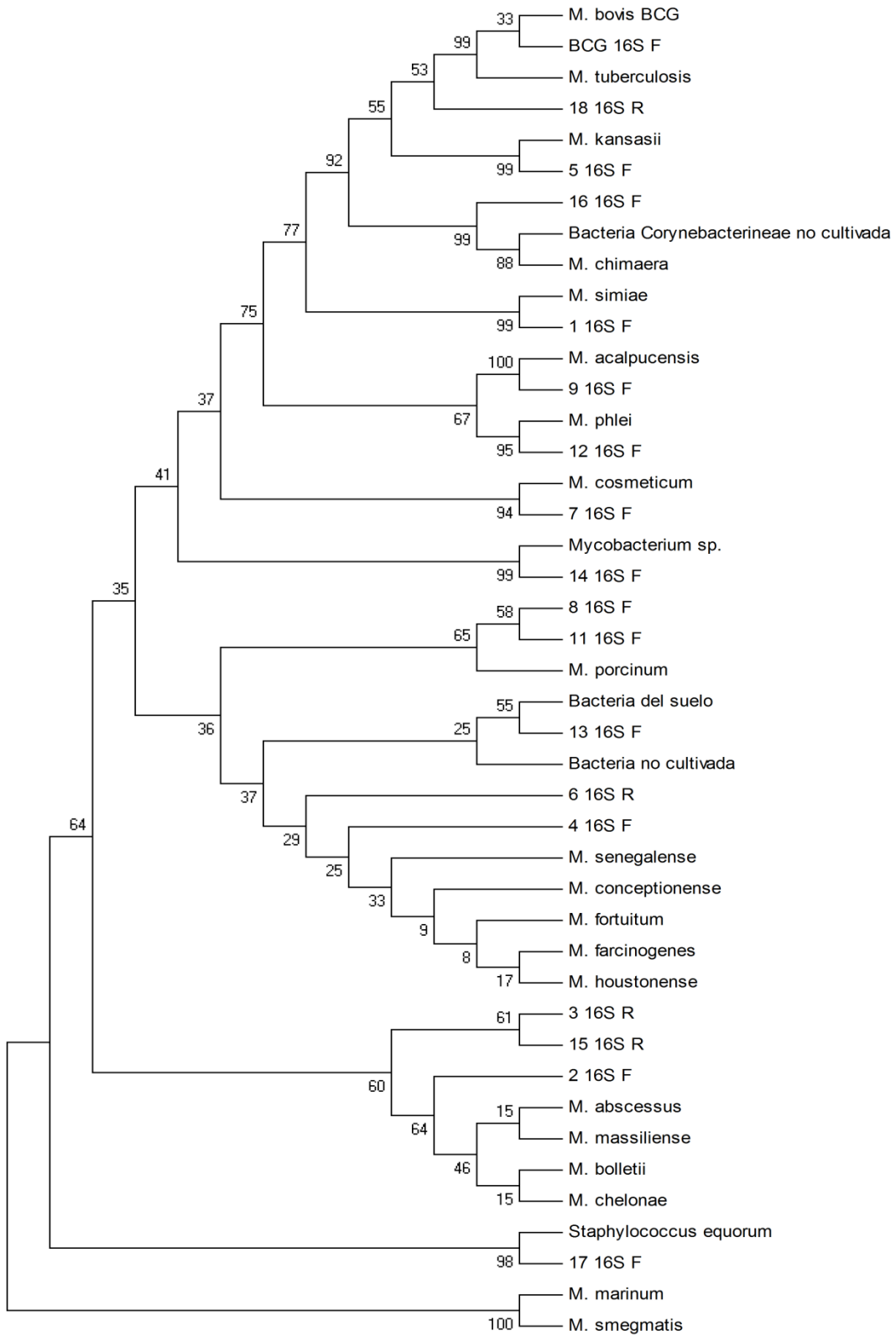


Figura 37. Árbol filogenético del gen 16S ARNr de las especies micobacterias estudiadas. Método Neighbor Joining; Bootstrap (10000) repeticiones. Distancia Kimura 2 parámetros.

En el árbol filogenético anterior se observa que la secuenciación del gen 16S ARNr no resultó en una correcta identificación de cada una de las especies, entre las cuales se tienen a las muestras 4 y 6, cuyas secuencias concuerdan con las especies *M. conceptionense*, *M. farcinogenes* y *M. fortuitum*. Otras muestras como la 4 y 17 compartieron la secuencia de dicho gen con microorganismo no relacionados tales como bacterias del suelo, por lo que con este gen no se puede establecer una relación filogenética específica entre las micobacterias.

En las figuras 38 y 39 se observan los árboles filogenéticos obtenidos de las secuencias del gen *rpoB*, basado en el alineamiento de 764 pb del gen, localizada entre las posiciones 2576 - 2592 y la 3317 - 3337 de cada una de las especies estudiadas, mostrando que las especies con mayor número de sobrevivientes no se encuentran formando una misma agrupación o complejo, exceptuando a las especies *M. abscessus* y *M. massiliense* quienes forman parte del complejo *M. abscessus – chelonae*.



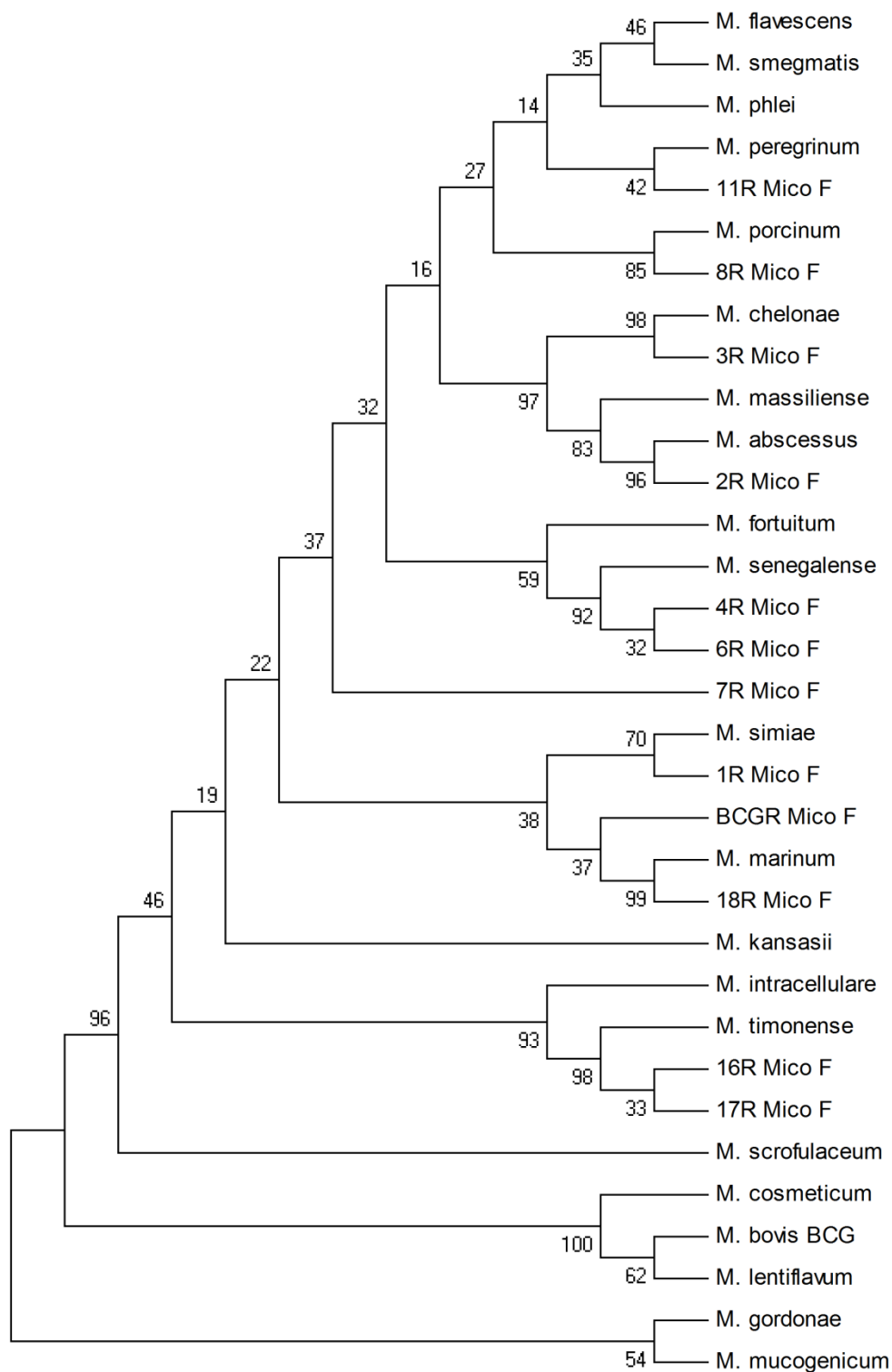
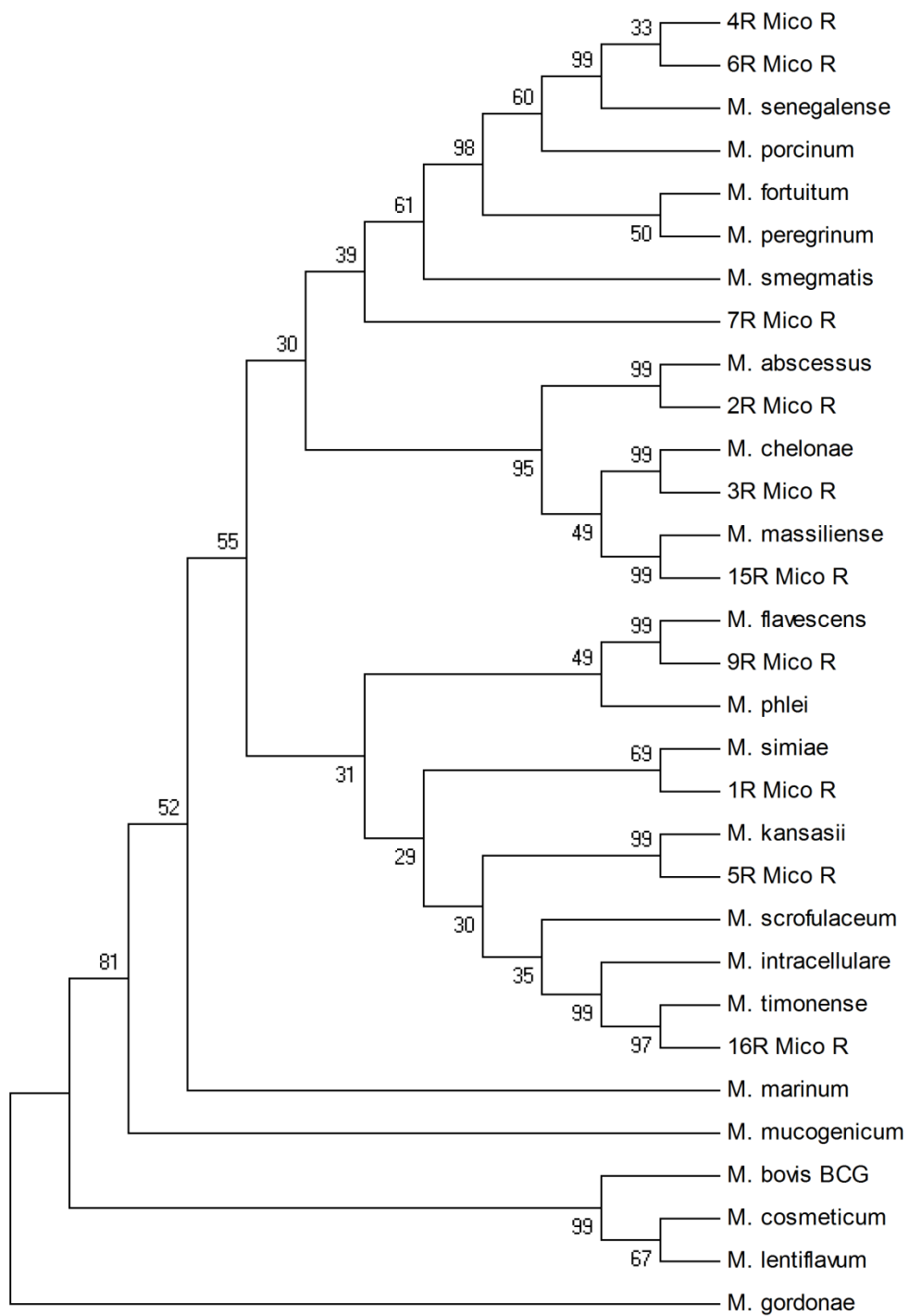


Figura 38. Árbol filogenético del gen *rpoB* (secuencias forward) de las especies de micobacterias estudiadas. Método Neighbor Joining; Bootstrap (10000) repeticiones. Distancia Kimura 2 parámetros.



**Figura 39. Árbol filogenético del gen *rpoB* (secuencias reverse) de las especies de micobacterias estudiadas. Método Neighbor Joining; Bootstrap (10000) repeticiones. Distancia Kimura 2 parámetros.**

## 7. DISCUSIÓN

La microscopía es el método más sencillo, rápido y económico para el diagnóstico microbiológico, empleando la técnica de tinción Ziehl Neelsen que permite la visualización tanto de las micobacterias, como también de bacterias de los géneros *Rhodococcus* y *Nocardia*. La tinción Ziehl – Neelsen es una herramienta poderosa utilizada para la confirmación de la existencia de micobacterias en una muestra o cultivo, así como también para conocer el estado de pureza de los mismos. Esta técnica de coloración fue utilizada para asegurar que los cultivos de las muestras incluidas en el estudio, se encontraban puros antes de iniciar su identificación mediante la implementación del PRA *hsp65*, debido a que contaminantes como otros microorganismos no micobacterianos y hongos, tienen la capacidad de interferir con el PCR. Además, el tener cultivos axénicos también garantiza que los cambios fenotípicos observados en los ensayos de dilución – neutralización, se deben exclusivamente a las micobacterias. Aunque la especificidad del examen directo de la muestra para detectar micobacterias es elevada, la diferenciación de especies es imposible, aunque en ocasiones para ciertas especies la tinción nos pueden orientar por ciertas peculiaridades tales como el tamaño, granulaciones peculiares y la tinción no uniforme de los ácidos micólicos de la pared (Valdés y Cid, 2004).

El crecimiento celular de las especies micobacterianas estudiadas se realizó a partir de muestras criopreservadas, gentilmente suministradas por el Instituto de Biomedicina. Una vez crecidas en medio sólido 7H10, sin embargo, cuando se realizó la tinción, los resultados obtenidos indicaron que 10 de 17 de las especies micobacterianas se encontraban contaminadas, razón por la cual se procedió a usar la técnica de descontaminación de Ogawa – Kudoh.

La descontaminación fue realizada a partir de los cultivos crecidos en medio sólido 7H10. Para las especies de *M. scrofulaceum*, *M. mucogenicum*, *M. cosmeticum*, *M. flavescens*, *M.*

*peregrinum* y *M. kansasii*, se logró descontaminar a partir de los cultivos criopreservados, ya que tras sucesivas descontaminación de los cultivos, no se obtuvo ningún crecimiento. Luego de haber agotado esta vía, se procedió a repicar de cultivos criopreservados distintos a los usados anteriormente para las especies *M. flavescens*, *M. scrofulaceum* y *M. kansasii*.

El siguiente paso fue realizar la estandarización del PRA *hsp65*. Esta técnica tiene como principal desventaja, la determinación del tamaño de las bandas presentes en los patrones de restricción, debido a que se necesita un software que permita la digitalización de la imagen del gel, para poder llevar a cabo el análisis, minimizando así los errores calculados para los tamaños de cada una de las bandas, para finalmente lograr la identificación. En este caso se empleó el software Gel Pro Analyzer 3.1, el cual permitió hacer la identificación más exacta. Al introducir en el PRAsite, los tamaños de las bandas encontrados para cada de las especies, solo se logró confirmar la identidad de *M. kansasii* y *M. bovis* BCG, esta última como perteneciente al complejo *M. tuberculosis*. En lo concerniente a las especies restantes, los patrones de restricción no correspondían a los patrones de las especies bajo las cuales fueron inicialmente identificadas en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina. Debido a que la interpretación de los patrones de restricción obtenidos empleando la técnica PRA *hsp65*, no permitió la identificación de la mayoría de las micobacterias, porque se deben estandarizar las condiciones de electroforesis (concentración del gel y el tipo de agarosa) para obtener una buena resolución así como el tiempo de corrida, para evitar tanto la difusión de las bandas a través del gel como el efecto sonrisa.

Debido a que con la técnica de PRA *hsp65*, no logró identificar la totalidad de las especies micobacterianas, se procedió a la secuenciación de las primeras 500 pares de base del gen 16S ARNr, siendo esta una región muy conservada que tiene suficientes sitios polimórficos como para discriminar entre especies micobacterianas (Ripoll y col., 2009).

Luego de analizar las secuencias del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (16S ARNr) de cada una de las especies, se logró confirmar la identidad de *M. simiae*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. phlei* y *M. marinum*. Por otra parte, se determinó que las especies inicialmente identificadas como *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. scrofulaceum*, *M. lentiflavum* y *M. bovis* BCG resultaron ser *M. massiliense*, *M. cosmeticum*, *M. alcalpucensis*, *M. fortuitum* y *M. tuberculosis*, respectivamente. Sin embargo, con esta técnica la especie *M. abscessus* no puede ser discriminada de *M. bolletii* y *M. massilense*, debido a que solo hay 1% de variación entre ellas (Ripoll y col., 2009). Se han descrito dos pruebas bioquímicas (la tolerancia a NaCl y la utilización de citrato) (Leao y col., 2009) o la secuenciación del gen *rpoB*, que permitirían llevar a cabo la identificación. Por otro lado, *M. bovis* BCG fue identificada como *M. tuberculosis* debido a que los miembros de *complejo M. tuberculosis*, no pueden ser diferenciados por este método, porque la secuencia de dicho gen es idéntica en todos (Rogal y col., 1990). Aunque también pueden ser diferenciadas a través de la amplificación por PCR de los genes 16S ARNr, Rv0577, IS1561, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8 y Rv3120, los cuales generan un patrón único para cada especie del *complejo M. tuberculosis*, a excepción de *M. tuberculosis* y *M. africanum* tipo II, los cuales poseen el mismo patrón (Huard y col., 2003).

Con respecto a las especies clasificadas en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina como: *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. cosmeticum*, *M. peregrinum*, *M. flavescens*, *M. intracellulare* y *M. massiliense*, no pudieron ser identificadas debido a que sus secuencias correspondían a distintas especies micobacterianas así como también a especies no relacionadas. Por otra parte, *M. sherrisii* fue identificada como *Staphylococcus equorum* debido posiblemente a la contaminación del cultivo con este microorganismo. Sin embargo, esto no pudo ser confirmado por la tinción Ziehl - Neelsen porque dicho cultivo perdió viabilidad. Finalmente, no se logró obtener la

secuencia del gen 16S ARNr de *M. smegmatis*, por lo que no se pudo comparar con la base de datos del GenBank (ver anexos 1-17). En el año 2004, Hafner y colaboradores compararon los patrones de restricción obtenidos a través de PRA *hsp65* con la base de datos del gen 16S ARNr de 126 aislados y encontraron que ambas técnicas coincidieron en la identificación de 120 de ellos, situación nada parecida a nuestro caso.

Los análisis filogenéticos micobacterianos basados en la secuenciación del gen 16S ARNr han ayudado a definir las especies micobacterianas, demostrando la utilidad de estos estudios, especialmente cuando los procedimientos convencionales son inaplicables, particularmente para la diferenciación e identificación de micobacterias nuevas y/o no cultivables (Clarridge, 2004). Sin embargo, se ha reportado que la delimitación de especie, en este gen tiene sus limitaciones. La presencia de ambigüedades en los resultados incluyen errores en la secuenciación, errores producidos durante la amplificación (Fox y col., 1992) y la presencia en un mismo microorganismo de dos loci que codifican para la subunidad 16S ARN ribosomal, que difieren uno del otro, restringiendo así el uso de la secuenciación de este gen en la identificación de especies micobacterianas (Ninet y col., 1996). Todo esto hace difícil dar un valor definitivo de similaridad o disimilitud para definir un género o especie, lo cual se ve afectado por la generación de diferentes valores al realizar el análisis en distintas bases de datos y por el uso de métodos distintos. El porcentaje de diferencia puede variar si éste es calculado usando sólo las primeras 500 pb o todo el gen y también puede variar con el programa usado para los cálculos (Clarridge, 2004). El análisis de toda la secuencia del gen 16S ARNr en la base de datos del GenBank de varias cepas de una misma especie de bacteria revela una considerable variación (Ninet y col., 1996). En este sentido, la secuenciación de las primeras 500 pares de base del gen 16S ARNr, no permitió la identificación de todas las especies involucradas en el estudio, razón por la cual se decidió secuenciar una región de

764 pb del gen *rpoB*, siendo ésta una región hipervariable, lo cual la hace más adecuada para la identificación y la discriminación filogenética a nivel de especies y sub especies (Adékambi y col., 2009).

Luego del análisis de la secuenciación del gen *rpoB*, se lograron confirmar las identidades de las especies *M. simiae*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. massiliense*, *M. marinum* y *M. bovis* BCG. Las secuencias del gen *rpoB* que a su vez, coincidieron con los resultados obtenidos con la secuenciación del gen 16S ARNr, fueron para las especies *M. simiae*, *M. chelonae* y *M. kansasii*. Con respecto a las especies *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. mucogenicum*, *M. cosmeticum*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. intracellulare* y *M. sherrisii*, después de la secuenciación del gen *rpoB*, éstas resultaron ser *M. senegalense*, *M. senegalense*, *M. fortuitum*, *M. porcinum*, *M. flavescens*, *M. porcinum*, *M. timonense* y *M. timonense* respectivamente (ver anexos 18-32). *M. sherrisii* fue identificada como *M. timonense*, motivo por el cual se piensa que la secuenciación correspondiente al gen 16S ARNr que se recibió, era una secuencia perteneciente a otro microorganismo. En cuanto a *M. mucogenicum*, se decidió tomar la identificación que arrojó la secuenciación del gen 16S ARNr, el cual dio como resultado que esta muestra era *M. cosmeticum*, ya que al analizarse el alineamiento de las secuencias de ambos genes, se encontró que había menos cambios en la secuencia del 16S ARNr que en el gen *rpoB*. Por otro lado, la secuenciación de las especies *M. smegmatis*, *M. lentiflavum* y *M. flavescens* no tuvo éxito, mientras que la secuencia de *M. phlei* no arrojó resultado alguno al ser introducida en la bases de datos del GenBank.

Comparando el análisis de las secuencias del gen 16S ARNr con las del gen *rpoB*, esta última ofrece varias ventajas. Primero, es una secuencia blanco que se caracteriza por no tener deleciones o inserciones, es suficientemente pequeña para ser secuenciada en ambas direcciones y

contiene suficiente información para distinguir la mayoría de las micobacterias actualmente conocidas. Por lo tanto, no hay necesidad de analizar varias regiones hipervariables o secuenciar los casi 1500 pb del gen 16S ARNr. Segundo, los problemas asociados a las limitaciones para diferenciar algunas especies de este género serían eliminados (Kim, 1999), ya que en muchos estudios, la secuencia del gen *rpoB* permitió diferenciar entre especies que incluso no habían podido ser diferenciadas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr (Adékambi, 2009). Tercero, para ser un buen marcador que permita la diferenciación de especies, éste debería ser estable y al mismo tiempo las variaciones de la secuencia deberían ocurrir al azar. Sin embargo, para la diferenciación de especies, un gen extremadamente conservado o altamente variable no es adecuado. En otras palabras, el elevado valor de similitud o un estrecho rango de las secuencias del gen 16S ARNr (94.3 a 100% similitud) se oponen a la discriminación.

Con respecto, al gen *rpoB* en micobacterias se conoce que la variación de la secuencia es moderada (85 a 100% de similitud), e indica la susceptibilidad de especies o cepas particulares de *Mycobacterium* a la rifampicina (Kim, 1999). Por las razones anteriormente expuestas, el gen *rpoB* permite una amplificación más robusta, reproducible y exacta pues mejora la resolución filogenética hecha sobre el gen 16S ARNr, lo que podría permitir la reclasificación de especies y la detección de organismos nuevos, incluyendo organismos no cultivados presentes en comunidades bacterianas (Adékambi, 2009).

Una vez identificadas correctamente las micobacterias involucradas en el estudio, se procedió a la realización de los ensayos de dilución – neutralización, analizándose la efectividad de los compuestos de amonios cuaternario BLDBA y CTAB contra las micobacterias atípicas. Aunque los QACs están descritos como micobacteriostáticos (McDonnell y Russell, 1999), los resultados aquí obtenidos indican que tienen actividad micobactericida contra las especies *M. marinum* (colonia



resistente 1 y 2) *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. senegalense* wt y su colonia resistente 1, *M. cosmeticum*, y las dos colonias resistentes de *M. porcinum* a los 20 minutos de exposición, con una frecuencia de selección de sobrevivientes comprendidas entre  $1/10^5$  -  $1/10^7$ . Por otra parte, las frecuencias de selección de sobrevivientes más altas se registraron para las especies *M. timonense* (colonia resistente 1 y 2), *M. senegalense*, *M. abscessus* C, *M. massiliense*, *M. marinum*, *M. abscessus* (colonia resistente 1 y 2) y *M. bovis* BCG, con frecuencias que van desde  $1/10^3$  hasta  $1/10^1$ , encontrando que los QACs eliminaron más del 90% de la población micobacteriana, aun cuando este es neutralizado, coincidiendo con Cortesía y colaboradores en el año 2010, en que las especies más resistentes están dentro del complejo *M. abscessus* – *chelonae*. Esta investigación encontró también una alta frecuencia de sobrevivientes en *M. senegalense* y *M. timonense*, las cuales mostraron una mayor sobrevivencia al desinfectante, que las pertenecientes al complejo *M. abscessus* – *chelonae*. Trascorrida 1 hora de exposición se encontró que la frecuencia de selección de sobrevivientes más elevada, se mantenía en las mismas especies que la tuvieron a los 20 minutos de exposición a los desinfectantes, disminuyendo ese valor en el resto de las especies estudiadas. Luego de 24 horas de exposición, sólo se encontró una sobreviviente en *M. bovis* BCG (ver tablas 12-15 y anexos 33-74). Debido a los hallazgos reportados en este estudio, se puede decir que la ocurrencia de infecciones causadas por micobacterias atípicas, podría estar asociado al uso de desinfectantes del tipo amonio cuaternario. Esta capacidad de resistir a la exposición a los QACs sugiere la selección de un fenotipo resistente (debido quizás a la inducción de la expresión de bombas de eflujo) causado por la presión selectiva ejercida por los QACs, ya que la frecuencia de selección de sobrevivientes retorna a su estado original, luego de sucesivos repiques en ausencia de estos compuestos (Cortesía y col., 2010).

El uso generalizado de antisépticos y desinfectantes genera expectativas sobre la resistencia bacteriana provocada por la presión ambiental que ejercen los productos ya mencionados, y enfoca el interés hacia la posible resistencia a antibióticos (McDonnell y Russell, 1999).

Existen varios factores que afectan la efectividad de los biocidas como la concentración, siendo el factor más importante que afecta su eficacia (Russell y McDonnell, 2000). En el caso de las biopelículas, la concentración del biocida y la consecuente susceptibilidad bacterial, está fuertemente afectada por la reducida difusión de moléculas activas a través de la biopelícula (Maillard, 2007). La concentración y el contacto son cruciales. Además, la combinación del tiempo de contacto y la concentración determinan el resultado en términos de la reducción microbiana. Esto es llamado el concepto CT (concentración – tiempo), en los cuales ciertos límites entre el tiempo y la concentración, originan una relación de eficacia. Así el resultado micobactericida podría ser obtenido con una alta concentración de desinfectante durante un corto período de tiempo o viceversa (SCENIHR, 2009). El modo de contacto también influye la eficacia (efectos mecánicos), ya que la protección por adhesión a la materia particulada reduce la superficie de absorción disponible de los microorganismos (Hernández, 2006).

La temperatura del ambiente también afecta la efectividad, ya que la mayoría de las sustancias tienen una baja eficacia a bajas temperaturas, así como el pH debido a que al aumentar su valor, el número de cargas negativas de la superficie bacteriana aumenta, con lo que las moléculas con carga positiva tienen un cierto grado de unión; siendo este el caso de los QACs (Hernández, 2006).

Para un biocida es fácil ser efectivo y destruir un número reducido de microorganismos. Sin embargo, cuando el número de microorganismos se incrementa también aumentan las dificultades

para eliminarlos. Los diferentes tipos de microorganismos difieren en sus respuestas a las sustancias biocidas, debido en parte a la presencia de estructuras de barrera como membrana y pared celular, que pueden actuar interfiriendo en la penetración de fluidos y solutos (Hernández, 2006).

La permeabilidad de la envoltura celular limita la cantidad de biocida que entra a la bacteria, disminuyendo así la concentración efectiva del biocida. En micobacterias la presencia de la capa de ácidos micólicos y arabinogalactanos resulta impermeable para muchos antimicrobianos (SCENIHR, 2009) y QACs, además esta resistencia intrínseca es frecuentemente asociada con la actividad basal de las bombas de eflujo que están activamente removiendo QACs del núcleo de la membrana (Hegstad y col., 2010).

Está claro que en estudios "*in vitro*" la resistencia bacteriana puede desarrollarse rápidamente seguido de la exposición a un biocida. La respuesta inicial al estrés causada por el biocida, el cual no demuestra acción letal, es rápida y ha sido ejemplificada por la iniciación de la respuesta SOS o ha sido indirectamente demostrada por la búsqueda de la curva de crecimiento en la presencia de un biocida (Gomez y col., 2005). En la práctica es difícil determinar la amplitud de la propagación del desarrollo de la resistencia bacteriana a los biocidas, principalmente debido a la escasez de información disponible, debido a que uno de los factores del desarrollo de la resistencia es la concentración del biocida, por lo que se podría especular que donde estén presente bajas concentraciones de biocida, resultaría en una presión selectiva que conllevaría a un cambio de la comunidad bacteriana, la población bacteriana o el fenotipo bacteriano. Sin embargo, sin más evidencia de investigaciones "*in situ*", el riesgo global de la emergencia de resistencia puede solo ser evaluado en evidencia derivada "*in vitro*". También está claro que un número de mecanismos proporciona a las bacterias la habilidad de sobrevivir a los biocidas y a la exposición a antibióticos. Esto ha sido demostrado en ensayos "*in vitro*", pero en cierta medida aún existe una falta de

información acerca del tema. Sin embargo, cuando aislados clínicos y ambientales son investigados, estos tienden a mostrar mejor habilidad a sobrevivir a antimicrobianos que sus contrapartes estándares de colección de cultivos (SCENIHR, 2009).

Para finalizar la investigación se decidió explorar si las especies micobacterianas más resistentes a los amonio cuaternario encontradas durante los ensayos de dilución – neutralización tenían una estrecha relación filogenética, es decir si se encontraban agrupadas dentro de un mismo complejo o simplemente eran más parecidas entre ellas que a las más sensibles. Pero al analizar los árboles filogenéticos obtenidos con las secuencias de los genes 16S ARNr (figura 37) y *rpoB* (figura 38 y 39) no se encontró ninguna relación filogenética entre estas especies micobacterianas, más allá que aquella que las agrupa dentro del mismo género, exceptuando a *M. massiliense* y *M. abscessus* ambas pertenecientes al complejo *M. abscessus – chelonae*.

## 8. CONCLUSIONES

- La secuenciación de los genes *rpoB* y 16S ARNr, resultó ser más adecuada y confiable para la identificación de micobacterias, que la técnica de PRA *hsp65*.
- En los ensayos de dilución – neutralización realizados empleando el compuesto BLDBA, indicaron que las especies con mayor frecuencia de selección de sobrevivientes a los 20 minutos y 1 hora de exposición al desinfectante fueron: *M. senegalense*, *M. abscessus* C, *M. massiliense*, *M. marinum*, *M. abscessus* y *M. bovis* BCG, con frecuencias que van desde  $1/10^3$  hasta  $1/10^1$ .
- En los ensayos de dilución – neutralización realizados empleando el compuesto CTAB, se obtuvo que las especies con mayor frecuencia de selección de sobrevivientes a los 20 minutos y 1 hora de exposición al desinfectante fueron: *M. timonense* (colonia sobrevivientes 1 y 2) y *M. abscessus* (colonia sobreviviente 1 y 2), con frecuencias que van desde  $1/10^3$  hasta  $1/10^1$ .
- No se encontró una relación filogenética que permita agrupar a las especies resistentes dentro de un mismo grupo, exceptuando a *M. abscessus* y *M. massiliense*, las cuales pertenecen al complejo *M. abscessus* – *chelonae*.
- La mayoría de las cepas estudiadas se comportan como *M. smegmatis*, pues presentan con una baja frecuencia de sobrevivientes a los compuestos de amonio cuaternario.
- El grupo del complejo *M. abscessus* – *M. chelonae* se comporta de manera diferente a *M. smegmatis*, lo que pudiera explicar la frecuente aparición de este grupo, como causantes de infecciones humanas, razón por la cual se debería estudiar el mecanismo utilizado en su supervivencia.
- *M. timonense* también parece tener un mecanismo a través del cual sobrevive a la actividad micobactericida de los compuestos de amonio cuaternario.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

10. Adékambi, T., Colson, P., Drancourt, M. 2003. *rpoB* – Based identification of Nonpigmented and Late – Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5699-5708.
11. Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D. 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* **17**: 37-45.
12. Agustí, G., Astola, O., Rodríguez, E., Julián, E., Luquin, M. 2008. Surface Spreading Motility Shown by a Group of Phylogenetically Related, Rapidly Growing Pigmented Mycobacteria Suggests that Motility Is a Common Property of Mycobacterial Species but Is Restricted to Smooth Colonies. *J. Bacteriol.* **190** (20): 6894-6902.
13. Alcaide F., Moreno, J., González M., Julián J., Palacios G. Micobacterias.11/09/2009. <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.htm>
14. Basset, D., Stokes, K., Thomas W. 1970. Wound infection with *Pseudomonas multivorans*, a water – borne contaminate of disinfectant solutions. *Lancet* **1**. 1188-1191.
15. Belisle, J., Brennan, P. 1989. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J. Bacteriol.* **171**: 3465-3470.
16. Bello, T., Rivera, O., de Waard, J. 2006. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**(5): 319-21.
17. Bello, T., Rosales, P., Acosta, E., de Waard, J. 2008. Instrument processing with lauryl dimethyl benzyl ammonium bromide: A challenge for patient safety. *Am. J. Infect. Control.* **36** (8): 598-601.
18. Caminero L., J. A. 19/09/2009. <http://www.comtf.es/pediatria/Bol-2001-2/Micobacterias%20at%EDpicas.pdf>
19. Chapman, J. 2003. Biocide resistance mechanisms. *Int. Biodeter. Biodegr.* **51**: 133-138.
20. Clarridge, J. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol. Rev.* **17** (4): 840-862.
21. Collins, F., Cunningham, D. 1981. Systemic *Mycobacterium Kansasii* infection and regulation of the alloantigenic response. *Infect. Immun.* **32**: 614-624.
22. Correa, N., Cataño, J., Mejía, G., Realpe, T., Orozco, B., Estrada, S., Vélez, A., Vélez, L. y colaboradores. 2010. Outbreak of Mesotherapy – Associated Cutaneous Infections Caused by *Mycobacterium chelonae* in Colombia. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**: 143-145.

23. Cortes, E. 2009. Descripción de Técnicas Fenotípicas y Moleculares para la Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y Micobacterias Atípicas en el Laboratorio Clínico. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
24. Cortesía, C. 2007. Desarrollo de un Nuevo método rápido y fácil para determinar la concentración mínima inhibitoria de desinfectantes y antibióticos sobre cepas de micobacterias atípicas que expresan el gen de la proteína de fluorescencia verde. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Tesis de Maestría. Caracas, Venezuela.
25. Cortesía, C., López, G., De Waard, J., Takiff, H. 2010. The use of quaternary disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. *J. Antimicrob Chemoth.* **65** (12): 2574-2581.
26. Coque, M. 2005. Papel de los Integrones en la Resistencia a los Agentes Antimicrobianos. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **23**: 251-253.
27. Crespo, M., Corral, R. 1997. Micobacterias no tuberculosas en personas VIH positivas y en personas sin factores de riesgo a la infección. *Colomb. Medica.* **28**: 16-144.
28. De Rossi, E., Aínsa, J., Riccardi, G. 2006. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev.* **30**: 36-52.
29. Devi, G. Indumathi, V., Babu, P., Sandhya, B., Swamy, A. 2004. Isolation of *Mycobacterium chelonae* from wound infection following laparoscopic: A case report. *Indian. J. Tuberc.* **51**: 149-151.
30. Fernández de Vega, F. 2005. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enfer. Infec. Microbiol. Clin.* **11**: 53-57.
31. Fox, G., Wisotzkey, J., Jurtshuk P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166 -170.
32. Gilbert, P., Moore, L. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 703-715.
33. Girón, R., Máiz, L., Barrio, I., Martínez, M., Salcedo, A., Prados, C. 2008. Estudio multicéntrico de prevalencia de micobacterias ambientales en pacientes con fibrosis quística. *Arch Bronconeumol.* **44** (12):679-84
34. Griffiths, P., Babb, J., Bradley, C., Fraise, A. 1997 Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. *J. Appl Microbiol.* **82**: 519-526.

35. Godoy, M. J., Orozco, L., Hernández, C., DaMata, O., De Waard, J., González, S. 2008. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **28**: 96-104.
36. Gomez, M., Russell, A., Maillard, J., Ochs, D. 2005. Triclosan – bacteria interactions: single or multiple target sites?. *Lett Appl. Microbiol.* **41**: 476-481.
37. Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B., Scheie, A., Sunde, M., Yazdankhah, S. 2010. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health?. *Microb. Drug. Resist.* **0** (0): 1-14.
38. Hernández, A. 2006. Aportaciones al Estudio de la Actividad Antimicrobiana de los Antisépticos y Desinfectantes. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
39. Hett, E., Rubin, E. 2008. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol. Mol. R.* **1**: 126-156.
40. Howard, S., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, C., Lyons C. y colaboradores. 2006. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology.* **152**: 1581-1590.
41. Huard, R., Oliveira, L., Butler, R., Soolingen, D., Ho, J. 2003. PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis Complex* on the Basis of Genomic Deletions. *J. Clin. Microbiol.* **41** (4): 1637-1650.
42. Ismael, N., El-Moug, T., Furr, J.R., Russell, A. 1986. Resistance of *Providencia stuartii* to chlorhexidine: A consideration of the role of the inner membrane. *J. Appl Bacteriol.* **60**: 361-367.
43. Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Ararai, T. 1998. Distribution of the antiseptic resistance gene *qacEΔ1* in Gram – positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**: 295-299.
44. Kantor, O., Pauls, A. 2006. Micobacteria atípica infectando la vía respiratoria baja de un paciente con fibrosis quística, asma y rinoconjuntivitis alérgica. *Arch. Alerg. Inmunol. C.* **37** (3): 119.123.
45. Kim, B., Lee, S., Lyu, M., Kim, S., Bai, G., Kim, S., Chae, G., y colaboradores. 1999. Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpob*). *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1714-1720.



46. Koh, S., Song, T., Kang, Y., Choi, J., Chang, K., Chu, C., Jeong, J. y colaboradores. 2010. An outbreak of skin and soft tissue infection caused by *Mycobacterium abscessus* following acupuncture. *Clin. Microbiol. Infec.* **16** (7): 895-901.
47. Leao, S., Tortoli, E., Viana – Niero, C., Mizuka, S., Batista, K., Lopes, M., Yubero, J., y colaboradores. 2009. Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggests that Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae* – *M. abscessus* Group Is Needed. *J. Clin. Microbiol.* **47** (9): 2691-2698.
48. Liu, j., Clifton, E., Barry, I., Nikaido, H. 1999. Cell wall: physical structure and permeability. 12. p. 220-238. En Ratledge, C., Dale, J. Mycobacteria. Molecular Biology and Virulence. Editorial Blackwell Science. EEUU.
49. Liu, J., Takiff, H., Nikaido, H. 1996. Active Efflux of Fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* Mediated by LfrA, a Multidrug Efflux pump. *J. Bacteriol.* **178** (13): 3791-3795.
50. Lomovskaya, O., Lewis, K. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA.* **89**: 8938-8942.
51. Lucey, B., Moloney, P., Cryan, B., Daly, M., O'Halloran, M., Threlfall, E., Fanning, E. 2000. Integron – like structures in *Campylobacter spp.* Of human and animal origin. *Emerg. Infect. Dis.* **6** (1): 50-55.
52. Lyon, B., Skurray, R. 1987. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiol. R.* **51** (1): 88-134.
53. Marín, J., Navarro, L., Santos, N. 2008. Evaluación del Método Dilución Neutralización Aplicado a un Desinfectante Según la Norma Técnica Colombiana 5473 de 2007. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
54. Maillard, J. 2007. Bacterial resistance to biocidas in the health care environment: should it be of genuine concern?. *J. Hosp. Infect.* **65**: 60-72.
55. McBain, A., Ledder, R., Moore, L., Catrenich, C., Gilbert, P. 2004. Effects of Quaternary-Ammonium Based Formulations on Bacterial Community Dynamics and Antimicrobial Susceptibility. *Appl. Environ. Microb.* **70** (6): 3449-3456.
56. McDonnell, G., Russell, D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (1): 147-179.

57. Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B., Leveau, J. Adaptation of *Pseudomona aeruginosa* 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J. Appl Microbiol.* **86**: 859-866.
58. Nagai, K., Ohta, S., Zenda, H., Matsumoto, Makino, M. 1996. Biochemical Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* Strain Isolated from a Benzalkonium Chloride Solution. *Biol. Pharm. Bull.* **19** (6): 873-875.
59. Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G. 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie.* **85**: 153-166.
60. Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of Gram – Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* **178** (20): 5853-5859.
61. Ninet, B., Monod, M., Emler, S., Pawlowski, J., Metral, C., Rohner, P., Auckenthaler, R., y colaboradores. 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2531-2536.
62. Nomura, K., Ogawa M., Miyamoto, H, Muratani, T., Taniguchi, H. 2004. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium Chelonae* from bronchoscope washing machines. *Am. J. Infect. Control.* **32** (4): 185-188.
63. Oliver, A., Maiz, L., Cantón R., Escobar, E., Baquero, F., Gómez, E. 2001. Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Cystic Fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 1298-1303.
64. Olivero, I., Guevara, A., Escalona, A., Oliver, M., Alfonso, R., Piquero, J., Zerpa y col. 2006. Infecciones en Tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia. ¿Cuánto vale la belleza?. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**: 302-6.
65. Paulsen, I., Firth, N., Skurray, R. 1997. Resistance to antimicrobial agents other than  $\beta$  – lactams. p. 175-212. *The Staphylococci in Human Disease*. Crossley, K. B. G. L. A, Ed.
66. Rastogi, N., Frehel, C., Ryter, A., Ohayon, H., Lesourd, M., David, H. 1981. Multiple Drug Resistance in *Mycobacterium avium*: Is the Wall Architecture Responsible for the Exclusion of Antimicrobial Agents?. *Antimicrob. Agents Ch.* **20** (5): 666-677.
67. Rastogi, N., Goh, K., David, H. 1990. Enhancement of Drug Susceptibility of *Mycobacterium avium* by Inhibitors of Cell Envelope Synthesis. *Antimicrob. Agents Ch.* **34** (5): 759-764.
68. Recht, j., Martínez, A., Torello, S., Kolter, R. 2000. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **182** (15): 4348-4351.

69. Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., Macheras, E. y colaboradores. 2009. Non Mycobacterial Virulence Genes in the Genome of the Emerging Pathogen *Mycobacterium abscessus*. *Plos one*. **4** (6): 1-12.
70. Rodríguez C., Grisel. Género *Mycobacterium*. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf>. (Consulta: 11 de Noviembre del 2009)
71. Rogall, T., Flohr, T., Böttger, E. 1990. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1915-1920.
72. Russell, A., McDonnell, G. 2000. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *J. Hosp. Infect.* **44**: 1-3.
73. Ryu, H., Joo, W., Oh, C., Song, H. 2004. Iatrogenic *Mycobacterium abscessus* infection associated with acupuncture: clinical manifestations and its treatment. *Int. Soc. Dermatol.* **44**: 846-850.
74. Sacchi, C., Whitney, L., Mayer, L., Morey, L., Steigerwalt, A., Boras, R., Weyant, R. y colaboradores. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1117-1123.
75. Schaefer, W., Davis, C., Cohn, M. 1970. Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* **102**: 499-506.
76. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihr/docs/scenihr\\_o\\_021.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf) (Consulta: 3 de Enero del 2011).
77. Selvaraju, S., Khan, I., Yadav, J. 2008. Differential biocide susceptibility of the multiple genotypes of *Mycobacterium immunogenum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 197- 203.
78. Souni, H., Musser, J. 2001. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clin. Chem.* **47** (5): 809-814.
79. Sundheim, G., Langsrud, S., Heir, E., Holck, A. 1998. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. *Int. Biodeter. Biodegr.* **41**: 235-239.
80. Takiff, H., Cimino, M, Musso, M, Weisbrod, T, Martinez, R, Delgado, M, Salazar, L y colaboradores. 1996. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 362-366.

81. Telenti, A., Marches, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E., Bodmer, T. 1993. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31** (2): 175-178.
82. Tennent, J., Lyon, B., Midgley, M., Jones, I., Purewal, A., Skurray, R. 1989. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1-10.
83. Valdés, F., Cid, A. 2004. Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr.* **95** (6): 331-357.

**Consultas en línea:**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch20&rendertype=figure&id=ch20.f8> (consulta: 16 de Noviembre del 2009).

<http://www.fotolog.com/antonikuin/66319523> (consulta: 2 de Junio del 2010)

## 10. ANEXOS

```

Score = 913 bits (494), Expect = 0.0
Identities = 500/503 (99%), Gaps = 1/503 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 77 TATTACCCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGCTTCTTCTGCAGSTACCGTCACTT 136
      |||
Sbjct 502 TATTA-CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGCTTCTTCTGCAGSTACCGTCACTT 444

Query 137 GCGCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCCACGGGCGT 196
      |||
Sbjct 443 GCGCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCCACGGGCGT 384

Query 197 CGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC 256
      |||
Sbjct 383 CGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC 324

Query 257 TGGCCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGACACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTGG 316
      |||
Sbjct 323 TGGCCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGACACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTGG 264

Query 317 CCTTGGTAGGCCGTACCCCAACCAACAAAGCTGATAGGCCGGGGCCATCCACACCCGA 376
      |||
Sbjct 263 CCTTGGTAGGCCGTACCCCAACCAACAAAGCTGATAGGCCGGGGCCATCCACACCCGA 204

Query 377 AAAGCTTTCACCACAAGGCATGCGCCAAGTGGTCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTCC 436
      |||
Sbjct 203 AAAGCTTTCACCACAAGGCATGCGCCAAGTGGTCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTCC 144

Query 437 CAGGCTTATCCCGAAGTGCAGGGCAGATTACCCAGTGTACTCACCCGTTTCGCCACTCG 496
      |||
Sbjct 143 CAGGCTTATCCCGAAGTGCAGGGCAGATTACCCAGTGTACTCACCCGTTTCGCCACTCG 84

Query 497 AGTACCCCGAAGGGGCTTTCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCCGCCAGCGTTC 556
      |||
Sbjct 83 AGTACCCCGAAGGGGCTTTCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCCGCCAGCGTTC 24

Query 557 GTCCTGAGCCATGATCAACTCT 579
      |||
Sbjct 23 GTCCTGAGCCAGGATCAAACTCT 1

```

**Anexo 1. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 1 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 1 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *M. simiae* (No. Acceso GenBank GQ153280.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. simiae* (No. Acceso GenBank GQ153280.1), con una puntuación máxima de 913 y un valor de máximo de identidad de 99%.

```

Score = 861 bits (466), Expect = 0.0
Identities = 466/466 (100%), Gaps = 0/466 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 10 CTTCTCTGTAGGTACCGTCACTTTCGCTTCGTCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGA 69
      |||
Sbjct 466 CTTCTCTGTAGGTACCGTCACTTTCGCTTCGTCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGA 407

Query 70 AGGCCGTATCCCTCACGCGCGTTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTC 129
      |||
Sbjct 406 AGGCCGTATCCCTCACGCGCGTTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTC 347

Query 130 CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCC 189
      |||
Sbjct 346 CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCC 287

Query 190 TCTCAGGCCGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGGGCCATTACCCCAACCAAGCTGATAG 249
      |||
Sbjct 286 TCTCAGGCCGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGGGCCATTACCCCAACCAAGCTGATAG 227

Query 250 GCCGCGGCTCATCCACACCCGAAAAGCTTGCACCACTCACCATGAAGTGTGTGGTCC 309
      |||
Sbjct 226 GCCGCGGCTCATCCACACCCGAAAAGCTTGCACCACTCACCATGAAGTGTGTGGTCC 167

Query 310 TATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAGAGTGCAGGGCAGATCACCCAG 369
      |||
Sbjct 166 TATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAGAGTGCAGGGCAGATCACCCAG 107

Query 370 TGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCGAGTACCCGAAGGGCCTTTCGGTTCGACTTGCATGT 429
      |||
Sbjct 106 TGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCGAGTACCCGAAGGGCCTTTCGGTTCGACTTGCATGT 47

Query 430 GTTAAGCACGCCGCGCAGCGTTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCT 475
      |||
Sbjct 46 GTTAAGCACGCCGCGCAGCGTTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCT 1

```

**Anexo 2. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 2 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de muestra 2 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *M. massiliense* (No. Acceso GenBank EU370523.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la

especie *M. abscessus* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. massiliense* (una especie cercanamente relacionada a *M. abscessus*), con una puntuación máxima de 861 y un valor de máximo de identidad de 100%.

```

Score = 845 bits (457), Expect = 0.0
Identities = 462/464 (99%), Gaps = 2/464 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 3 GTATTACCG-GGCTGCTGGCACGTAAGTTGGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTACCGTCACTT 61
      |||
Sbjct 477 GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAAGTTGGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTACCGTCACTT 418

Query 62 TCGCTTCGTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGCCGTCATCCCTCACGCGGGT 121
      |||
Sbjct 417 TCGCTTCGTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGCCGTCATCCCTCACGCGGGT 358

Query 122 CGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCGTTAGGAGTC 181
      |||
Sbjct 357 CGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCGTTAGGAGTC 298

Query 182 TGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGTCG 241
      |||
Sbjct 297 TGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGTCG 238

Query 242 CCTTGGTGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGGGCTCATCCACACCCGCA 301
      |||
Sbjct 237 CCTTGGTGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGGGCTCATCCACACCCGCA 178

Query 302 AAAGCTTGCACCACTCACCATGAAGTGTGTGGTCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTCC 361
      |||
Sbjct 177 AAAGCTTGCACCACTCACCATGAAGTGTGTGGTCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTCC 118

Query 362 CAGGCTTATCCAGAGTGCAGGGCAGATCACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCG 421
      |||
Sbjct 117 CAGGCTTATCCAGAGTGCAGGGCAGATCACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCG 58

Query 422 AGTACCCCGAAGGGCCTTCCGTTTCGACTTGCATG-GTAAGCAG 464
      |||
Sbjct 57 AGTACCCCGAAGGGCCTTCCGTTTCGACTTGCATGTGTAAGCAG 14
  
```

**Anexo 3. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 3 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 3 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *M. chelonae* (No. Acceso GenBank FJ770977.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. chelonae*, con una puntuación máxima de 845 y un valor de máxima identidad de 99%.

```

TTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAAGTTGGCTCGGTCTTCTTCTATAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTATTGAAAGAG
GTTTACAACCCSAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCT
CCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGTCGCTTGGTAGGCC
ATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCCATCCACACCCGAAAAGCTTCCACCACACCATGAAGCGCGTGGTCTT
ATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCCAAAGTGCAGGGCAGATCACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCGAGT
ACCCCGAAGGGCCTTCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGYMAGCGTTCCGCTGAGCCATGATCAAACCTCTTAA
  
```

**Anexo 4. Secuencia nucleotídica de la muestra 4 obtenida por secuenciación.** La secuenciación de este gen no permitió su identificación debido a que comparte tanto el mismo valor máximo de identidad como de la máxima puntuación con los siguientes microorganismos: una bacteria no cultivada (No. Acceso GenBank HQ445812.1), *M. conceptionense* (No. Acceso GenBank GU142926.1), *M. farcinogenes* (No. Acceso GenBank AY457084.1), *M. senegalense* (No. Acceso GenBank AY457081.1), *M. fortuitum. sub especie fortuitum* (No. Acceso GenBank AY457067.1), *M. conceptionense* (No. Acceso GenBank AY859684.1) y *Mycobacterium sp.* (No. Acceso GenBank AY215249.1).

```

Score = 315 bits (170), Expect = 7e-83
Identities = 173/174 (99%), Gaps = 1/174 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GGGCCCATCCACACCGCAAAGCTTTCCACCACAAGGCATGCGCCAAGTGGTCCTATCC 60
      |||
Sbjct 202 GGGCCCATCCACACCGCAAAGCTTTCCACCACAAGGCATGCGCCAAGTGGTCCTATCC 143

Query 61 GGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCCGGTGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTA 120
      |||
Sbjct 142 GGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCCGGTGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTA 83

Query 121 CTCACCCGTTGCCCCTCGAGTGTCTCCGAAGAGACCTTCCGTTGCGACT-GCA 173
      |||
Sbjct 82 CTCACCCGTTGCCCCTCGAGTGTCTCCGAAGAGACCTTCCGTTGCGACTTGCA 29

```

**Anexo 5. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 5 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 5 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *M. kansasii* (No. Acceso GenBank AJ536035.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. kansasii*, con una puntuación máxima de 315 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

TGTATTACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTCACCCCTTCTCTATAGGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTATTGAAAGAG
GTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCAGCGGGCGTGCCTCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATCCCACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTGTCGCTTGGTAGGCCAT
TACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGGGCCATCCACACCGCAAAGCTTTCCACCACACCCATGAAGCGCGTGGTCTATC
CGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCCAAAGTGCAGGGCAGATCACCCACGTGTTACTCACCCGTTGCCACTCGAGTACC
CCGAAGGGCCTTCCGTTGCGACTTGCATGTGTTAAGCAGCGMCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTTCAAA

```

**Anexo 6. Secuencia nucleotídica de la muestra 6 obtenida por secuenciación.** La secuenciación de este gen no permitió su identificación debido a que comparte tanto el mismo valor máximo de identidad como de la máxima puntuación con los microorganismos: *M. conceptionense* (No. Acceso GenBank GU142926.1), *M. fortuitum* (No. Acceso GenBank EU741213.1), *M. senegalense* (No. Acceso GenBank AM884321.1), *M. farcinogenes* (No. Acceso GenBank AY457084.1) y *M. houstonense* (No. Acceso GenBank AY012579.3).







```

Score = 854 bits (462), Expect = 0.0
Identities = 465/466 (99%), Gaps = 1/466 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 5      CTTCTTC-ATAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTATTGAAAGAGGTTTACAACCCGA 63
           |||
Sbjct 467    CTTCTTCTATAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTATTGAAAGAGGTTTACAACCCGA 408

Query 64     AGGCCGTATCCCTCACGGCGTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCC 123
           |||
Sbjct 407     AGGCCGTATCCCTCACGGCGTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCC 348

Query 124    CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACC 183
           |||
Sbjct 347     CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACC 288

Query 184    TCTCAGGCCGGTACCCGTCGCTCGCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAG 243
           |||
Sbjct 287     TCTCAGGCCGGTACCCGTCGCTCGCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAG 228

Query 244    GCCGCGGGCCATCCACACCGCAAAGCTTCCACCACACACCATGAAGCGGTGGTCA 303
           |||
Sbjct 227     GCCGCGGGCCATCCACACCGCAAAGCTTCCACCACACACCATGAAGCGGTGGTCA 168

Query 304    TATTCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAAAGTGCAGGGCAGATCACCACG 363
           |||
Sbjct 167     TATTCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAAAGTGCAGGGCAGATCACCACG 108

Query 364    TGTACTCACCGTTCGCCACTCGAGTACCCCGAAGGGCCTTCCGTCGACTTGCATGT 423
           |||
Sbjct 107     TGTACTCACCGTTCGCCACTCGAGTACCCCGAAGGGCCTTCCGTCGACTTGCATGT 48

Query 424    GTTAAGCAGCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCATGATCAAACCTCT 469
           |||
Sbjct 47     GTTAAGCAGCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCATGATCAAACCTCT 2

```

**Anexo 11. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 13 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 13 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *M. fortuitum* (No. Acceso GenBank EU370528.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. lentiflavum* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. fortuitum* (No. Acceso GenBank EU370528.1), con una puntuación máxima de 854 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 821 bits (444), Expect = 0.0
Identities = 454/458 (99%), Gaps = 3/458 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 6      CTCTCTCT-CAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTGGCGAAAGAGGTTTACAACCCGA 64
           |||
Sbjct 457    CTCTCTCTCAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTGGCGAAAGAGGTTTACAACCCGA 398

Query 65     AGGCCGTATCCCTCACGGCGTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCC 124
           |||
Sbjct 397     AGGCCGTATCCCTCACGGCGTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCC 338

Query 125    CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACC 184
           |||
Sbjct 337     CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACC 278

Query 185    TCTCAGGCCGGTACCCGTCGCTCGCCTTGGTAGGCCATACCCACCAACAAGCTGATAG 244
           |||
Sbjct 277     TCTCAGGCCGGTACCCGTCGCTCGCCTTGGTAGGCCATACCCACCAACAAGCTGATAG 218

Query 245    GCCGCGGGCCATCCACACCGCAAAGCTTCCACCACACACCATGCAGTGGGTAGTCC 304
           |||
Sbjct 217     GCCGCGGGCCATCCACACCGCAAAGCTTCCACCACACACCATGCAGTGGGTAGTCC 158

Query 305    TATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAAAGTGCAGGGCAGATCACCACG 364
           |||
Sbjct 157     TATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAAAGTGCAGGGCAGATCACCACG 98

Query 365    TGTTACTCACCGTTCGCCACTAACCCAAAGGGTCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCA 424
           |||
Sbjct 97     TGTTACTCACCGTTCGCCACTAACCCAAAGGGTCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCA 38

Query 425    CGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCATGA-CAAACCTCT 461
           |||
Sbjct 37     CGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCATGA-CTCT 1

```

**Anexo 12. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 14 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 14 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *Mycobacterium sp.* (No. Acceso GenBank AF491284.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. flavescens* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *Mycobacterium sp.* (No. Acceso GenBank AF491284.1), es decir, que puede ser cualquier especie de este género, con una puntuación máxima de 821 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 841 bits (455), Expect = 0.0
Identities = 462/465 (99%), Gaps = 2/465 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 4      GTATTACCCCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTCCTTCTTCTGTAGGTACCGTCACT 63
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 477     GTATTACC-CGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTCCTTCTTCTGTAGGTACCGTCACT 419

Query 64     TTCGCTTCGTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGGGGC 123
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 418     TTCGCTTCGTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGGGGC 359

Query 124    TCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 183
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 358     TCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 299

Query 184    CTGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTC 243
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 298     CTGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTC 239

Query 244    GCCTTGGTGGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGGGGCTATCCCACACCGC 303
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 238     GCCTTGGTGGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGGGGCTATCCCACACCGC 179

Query 304    AAAAGCTTTGCACCACTACCCATGAAGTGTGTGGTCCCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTC 363
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 178     AAAAGCTTTGCACCACTACCCATGAAGTGTGTGGTCCCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTC 119

Query 364    CCAGGCTTATCCCAGAGTGCAGGGCAGATCACCACGTTACTACCCGTTCCGCCACTC 423
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 118     CCAGGCTTATCCCAGAGTGCAGGGCAGATCACCACGTTACTACCCGTTCCGCCACTC 59

Query 424    GAGTACCCCGAAGGGCCTTTCGGTTCGACTTGCATG-GTAAGCAG 467
            ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 58     GAGTACCCCGAAGGGCCTTTCGGTTCGACTTGCATGTGTAAGCAG 14

```

**Anexo 13. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 15 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 15 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *Mycobacterium sp.* (No. Acceso GenBank FJ613370.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. massiliense* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *Mycobacterium sp.* (No. Acceso GenBank FJ613370.1), es decir, que puede ser cualquier especie de este género, con una puntuación máxima de 841 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

GGTTGCGTCTTCTTCTCACCTACCGTCAGTCCGAGAAAACCCGAACCTTCGGTCGATGGTGAAAGAGGTTT
ACAACCCGAAGGCCGTCATCCCCACGCGGCTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCT
CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGACACCCTCTCAGGCCG
GCTACCCGTCGTCGCCCTTGGTAGGCCATCACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGGGGCCCATCCCACA
CCGAAAAGCTTCCACAAAAGACATGCGTCTAAAGGTCCTATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCT
TATCCCGAAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCCACTCGAGTACCCCGAAGGG
GCCTTCCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAA

```

**Anexo 14. Secuencia nucleotídica de la muestra 16 obtenida por secuenciación.** La secuenciación de este gen no permitió su identificación debido a que comparte tanto el mismo valor máximo de identidad como de la máxima puntuación con los microorganismos: *M. chimaera* (No. Acceso GenBank GQ153281.1) y bacteria Corynebacterineae no cultivada (No. Acceso GenBank JF460982.1).

```

Score = 904 bits (489), Expect = 0.0
Identities = 496/499 (99%), Gaps = 2/499 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 6 GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGTACCGTCAAGA 65
Sbjct 516 GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGTACCGTCAAGA 457
Query 66 TGTGCACAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGATCCGAAAAC 125
Sbjct 456 TGTGCACAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGATCCGAAAAC 397
Query 126 CTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTAC 185
Sbjct 396 CTTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTAC 337
Query 186 TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGGCCGATCACCCCTCTC 245
Sbjct 336 TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGGCCGATCACCCCTCTC 277
Query 246 AGGTCGGCTACGTATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCG 305
Sbjct 276 AGGTCGGCTACGTATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCG 217
Query 306 CGGGTCCATCTATAAGTGATAGCAAAACCATCTTTTACTTTAGAACCATGCGGTTCCAAA 365
Sbjct 216 CGGGTCCATCTATAAGTGATAGCAAAACCATCTTTTACTTTAGAACCATGCGGTTCCAAA 157
Query 366 TGTATCCGGCATTAGCTCCGGTTTCCGGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCC 425
Sbjct 156 TGTATCCGGCATTAGCTCCGGTTTCCGGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCC 97
Query 426 ACGTGTACTCACCCGTCGCGGCTAACTTCAAAGGAGCAAGCTCCTTATCCCGTTCGCT 485
Sbjct 96 ACGTGTACTCACCCGTCGCGGCTAACTTCAAAGGAGCAAGCTCCTTATCCCGTTCGCT 38
Query 486 CGACTTGCA-GTATAGGCA 503
Sbjct 37 CGACTTGCATGTATAGGCA 19

```

**Anexo 15. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 17 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 17 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *Staphylococcus equorum* (No. Acceso GenBank DQ232735.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. sherrisii* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *Staphylococcus equorum* (No. Acceso GenBank DQ232735.1), una especie del Phylum *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden *Bacillales*, Familia *Staphylococcaceae*, Género *Staphylococcus* y por lo tanto no relacionada con el género *Mycobacterium*. Este resultado se obtuvo con una puntuación máxima de 904 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 865 bits (468), Expect = 0.0
Identities = 476/479 (99%), Gaps = 3/479 (1%)
Strand=Plus/Minus
Query 3 GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGTCTTCTCCACCTACCGTCAAT 62
Sbjct 487 GTATTA-CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGTCTTCTCCACCTACCGTCAAT 429
Query 63 CCGAGAAAACCCGAACCTTCGTGATGGTGAAGAGGTTTACAAACCCGAAGGCCGTCATC 122
Sbjct 428 CCGAGAAAACCCGAACCTTCGTGATGGTGAAGAGGTTTACAAACCCGAAGGCCGTCATC 369
Query 123 CCCCACGCGGCGTTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCC 182
Sbjct 368 CCCCACGCGGCGTTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCC 309
Query 183 TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGACACCCCTCTCAGGCCGG 242
Sbjct 308 TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGACACCCCTCTCAGGCCGG 249
Query 243 CTACCCGTCGTCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCCAACCAAGCTGATAGGCCGCGGGCCC 302
Sbjct 248 CTACCCGTCGTCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCCAACCAAGCTGATAGGCCGCGGGCCC 189
Query 303 ATCCACACCGCAAAAGCTTTCCACCACAGGACATGAATCCCGTGGTCCCTATCCGGTATT 362
Sbjct 188 ATCCACACCGCAAAAGCTTTCCACCACAGGACATGAATCCCGTGGTCCCTATCCGGTATT 129
Query 363 AGACCCAGTTTCCCAGGCTTATCCCGAAGTGCAGGGCAGATCGCCACGTTACTACC 422
Sbjct 128 AGACCCAGTTTCCCAGGCTTATCCCGAAGTGCAGGGCAGATCGCCACGTTACTACC 69
Query 423 CGTTCGCCACTCGAGTATCTCCGAAGAGACCTTCCCGTTCGACTTGCATG-GT-AGCA 479
Sbjct 68 CGTTCGCCACTCGAGTATCTCCGAAGAGACCTTCCCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCA 10

```

**Anexo 16. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr de la muestra 18 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen 16S ARNr de la muestra 18 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen 16S ARNr de *M. marinum* (No. Acceso GenBank AB548721.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. phlei* (No. Acceso GenBank AB548721.1), con una puntuación máxima de 865 y un valor máximo de identidad de 99%.



```

Score = 905 bits (490), Expect = 0.0
Identities = 492/493 (99%), Gaps = 0/493 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 5 CCCCAGGAGCGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCTCGCGAGGTCGCGGACAC 64
Sbjct 16 CCCCAGGAGCGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCTCGCGAGGTCGCGGACAC 75
Query 65 CTCCCTGAAGGTGCCGCACGGCGAGTCCGGAAAGGTTCATCGGCATCCGCGTGTCTCGCG 124
Sbjct 76 CTCCCTGAAGGTGCCGCACGGCGAGTCCGGAAAGGTTCATCGGCATCCGCGTGTCTCGCG 135
Query 125 TGATGACGACGACGATCTGCCTGCCGCGTGAATGAGCTCGTTCGCGTGTATGTGGCGCA 184
Sbjct 136 TGATGACGACGACGATCTGCCTGCCGCGTGAATGAGCTCGTTCGCGTGTATGTGGCGCA 195
Query 185 GAAGCGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTCAT 244
Sbjct 196 GAAGCGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTCAT 255
Query 245 CGGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCCCTGCCCGATGGCACCCCGGTGGACAT 304
Sbjct 256 CGGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCCCTGCCCGATGGCACCCCGGTGGACAT 315
Query 305 CATCCTGAACACCCACGGTGTGCCACGCCGTATGAACATCGGCCAGATCTTGGAAACCCA 364
Sbjct 316 CATCCTGAACACCCACGGTGTGCCACGCCGTATGAACATCGGCCAGATCTTGGAAACCCA 375
Query 365 CCTCGGGTGGATTGCCAAGACCGGCTGGAACATCGAGGGTGAGCCCGAGTGGCGGCCAA 424
Sbjct 376 CCTCGGGTGGATTGCCAAGACCGGCTGGAACATCGAGGGTGAGCCCGAGTGGCGGCCAA 435
Query 425 TCTGCCTGCAGACCTCACCTCTGCGCGCGCGATACCCGACGGCCACCCCGGTGTTCAA 484
Sbjct 436 TCTGCCTGCAGACCTCACCTCTGCGCGCGCGATACCCGACGGCCACCCCGGTGTTCAA 495
Query 485 CGGTGCCCGCGAG 497
Sbjct 496 CGGTGCCCGCGAG 508

```

**Anexo 19. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 2 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 2 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. abscessus* (No. Acceso GenBank HM807414.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. abscessus* (No. Acceso GenBank HM807414.1), con una puntuación máxima de 905 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 870 bits (471), Expect = 0.0
Identities = 486/492 (99%), Gaps = 6/492 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 6 CCCGAGGAGCGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGGAGGTTTCGCGACACC 65
Sbjct 19 CCCGAGGAGCGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGGAGGTTTCGCGACACC 78
Query 66 TCCCTGAAGGTGCCGCACGGTGGAGTCCGGCAAGGTTCATCGGCATCCGCGTCTTCTCGCGT 125
Sbjct 79 TCCCTGAAGGTGCCGCACGGTGGAGTCCGGCAAGGTTCATCGGCATCCGCGTCTTCTCGCGT 138
Query 126 GATGACGACGACGACCTGCCCGCCGCGTGAACGAGCTCGTTCGCGTGTACGTCCGCGCAG 185
Sbjct 139 GATGACGACGACGACCTGCCCGCCGCGTGAACGAGCTCGTTCGCGTGTACGTCCGCGCAG 198
Query 186 AAGCGCAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTGGCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTCATC 245
Sbjct 199 AAGCGCAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTGGCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTCATC 258
Query 246 GGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCCCTGCCCGATGGCACCCCGGTGGACATC 305
Sbjct 259 GGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCCCTGCCCGATGGCACCCCGGTGGACATC 318
Query 306 ATCCTGAACACCCACGGTGTGCCGCGTTCGATGAACATCGGCCAGATCCTGGGAGACCCA 365
Sbjct 319 ATCCTGAACACCCACGGTGTGCCGCGTTCGATGAACATCGGCCAGATCCTGG-AGACCCA 377
Query 366 CCTGGGGTGGGTGGCCAAAGACCGGCTGGAACATCGAGGGCAACCCCGAGTGGGCGCAGA 425
Sbjct 378 CCTGGGG-TGGTGGCCAAAGACCGGCTGGAACATCGAGGGCAACCCCGAGTGGGCGCAGA 436
Query 426 ACCTCCCGAGGATCTGCAGTCGGCCC-GGCCGACACCCCGACGGCCACCCCGGTGTTTC 484
Sbjct 437 ACCTCCCGAGGATCTGCAGTCGGCCC-GGCCGACACCCCGACGGCCACCCCGGTGTTTC 495
Query 485 CGACGGGCGCCC 496
Sbjct 496 -GACGG-CGCCC 505

```

**Anexo 20. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 3 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 3 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. chelonae* (No. Acceso GenBank EU109288.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. chelonae* (No. Acceso GenBank HM807414.1), con una puntuación máxima de 905 y un valor máximo de identidad de 99%.



```

Score = 856 bits (463), Expect = 0.0
Identities = 487/497 (98%), Gaps = 7/497 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 10 AGAGCGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTCCGCGACACCTCGCT 69
Sbjct 21 AGAGCGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTCCGCGACACCTCGCT 80
Query 70 GAAGGTGCCCCACGGCGAGTCCGGCAAGGTCATCGGCATCCGCGTGTCTCTCCGCGAGGA 129
Sbjct 81 GAAGGTGCCCCACGGCGAGTCCGGCAAGGTCATCGGCATCCGCGTGTCTCTCCGCGAGGA 140
Query 130 CGACGACGAGCTGCCCGCCGCGCTCAACGAGCTGGTCCGCGTGTACGTGGCCAGAAAGCG 189
Sbjct 141 CGACGACGAGCTGCCCGCCGCGCTCAACGAGCTGGTCCGCGTGTACGTGGCCAGAAAGCG 200
Query 190 CAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTCGCCGGACGCCACGGCAACAAAGGCGTCATCGGCAA 249
Sbjct 201 CAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTCGCCGGACGCCACGGCAACAAAGGCGTCATCGGCAA 260
Query 250 GATCCTGCCCGTTCGAGGACATGCCGTTCCCTGCCCGATGGCACCCCGGTGGACATCATCCT 309
Sbjct 261 GATCCTGCCCGTTCGAGGACATGCCGTTCCCTGCCCGATGGCACCCCGGTGGACATCATCCT 320
Query 310 GAACACCCACGGTGTGCGCGCTGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCACCTCGG 369
Sbjct 321 GAACACCCACGGTGTGCGCGCTGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCACCTCGG 380
Query 370 GGTGGGTGGCCAAGGCAGGCTGGAACATCGACGTCGCCCGGGGGACTCCGGGAGTGGGC 429
Sbjct 381 G-TGGGTGGCCAAGGCAGGCTGGAACATCGACGTCGCCCGGGGG-ACTCCGG-AGTGGGC 437
Query 430 GAGCAAGCTGCCCGAGCAGCTGTCTCGGGCCCCGGTTCGACAGCATCGTGGACACCCC 489
Sbjct 438 GAGCAAGCTGCCCGAGCAGCTGTCTCGGGCCCCGGTTCGACAGCATCGTGGACACCCC 494
Query 490 GGGTTTCGACGTGTGCC 506
Sbjct 495 GGTGTTTCGACG-GTGCC 510

```

**Anexo 23. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 6 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 6 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. senegalense* (No. Acceso GenBank AY684057.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. gordonae* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. senegalense* (No. Acceso GenBank AY684057.1), con una puntuación máxima de 856 y un valor máximo de identidad de 98%.

```

Score = 654 bits (354), Expect = 0.0
Identities = 455/500 (91%), Gaps = 22/500 (4%)
Strand=Plus/Plus
Query 5 GACGGGGACAAAGCTTCGCCGGGACGCCACGCAACAAGGGCGTCATCGGCAAGATCCTG 64
Sbjct 208 GACGGCGAC-AAGC-TCGCC-GGACGCCACGGCAACAAGGGCGTCATCGGCAAGATCCTG 264
Query 65 CCCGTCGAGGACATGCCGTTTCCTGCCGGACGGCACCCCGGTGGACATCATCCTGAACACC 124
Sbjct 265 CCCGTCGAGGACATGCCGTTTCCTGCCGGATGGCACCCCGGTGGACATCATCCTGAACACC 324
Query 125 CACGGTGTGCCGCTCGTATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCACCTCGGGTGGGTG 184
Sbjct 325 CACGGTGTGCCGCTCGTATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCACCTCGGGTGGGTG 384
Query 185 GCCAAGCCCGGTGGAACATCGAAG-GG-T-CG----C-CCG-AGTGGGCCG-GCAACCT 234
Sbjct 385 GCCAAGCCCGGTGGAACATCGAATGTGGCTGCGGGAAACCCCGAGTGGGC-GAGCAAGCT 443
Query 235 CCCCAGGAGCTGTG-TCCGCGCCGGCCGACAGCATCGTGTCCACCCCGGTGTTCGAGC 293
Sbjct 444 GCCCAGGAGCTG-TACTCGGCGCCGGTCGACAGCATCGTGTCCACCCCGGTGTTCGAGC 502
Query 294 GTGCCCGGAGGCGGAGCTG-CAGGGCCTGCTCGGCTCGACGCTGCCGAACCCGCGCGGT 352
Sbjct 503 GTGCCCGGAGGAGGAGCTGTGCCGGTC-TGCTCGGCTCGACGCTGCCGAACCGTGACGGC 561
Query 353 GAGGTCATGSGTCGAC-GCCGACGSCAAGGCG-CGGCTGTTTCGACGGACGAGTGGCGAAC 410
Sbjct 562 GACGTCATGGT-GAATGCCGACGGCAAGGCGACGT-TGTTTCGACGGCCGAGTGGCGAAC 619
Query 411 CGTTCCCGTACCCGGTGACGGTCCGCTACATGTACATCCTCAAGCTGCACCACCTGGTGG 470
Sbjct 620 CGTTCCCGTACCCGGTGACGGTCCGCTACATGTACATCCTCAAGCTGCACCACCTGGTGG 679
Query 471 ACGACAAGATCCACGCGCT 490
Sbjct 680 ACGACAAGATCCACGCCGT 699

```

**Anexo 24. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 7 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 7 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. fortuitum* (No. Acceso GenBank FJ418056.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. mucogenicum* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. fortuitum* (No. Acceso GenBank FJ418056.1), con una puntuación máxima de 654 y un valor máximo de identidad de 91%.



```

Score = 878 bits (475), Expect = 0.0
Identities = 487/492 (99%), Gaps = 3/492 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 6 CCGGAGGAGCGCCTGCTGCGTGCCTATCTTCGGTGAGAAGGCCCGGAGGTTTCGCGACAGC 65
Sbjct 2623 CCGGAGGAGCGCCTGCTGCGTGCCTATCTTCGGTGAGAAGGCCCGGAGGTTTCGCGACAGC 2682
Query 66 TCGCTGAAGGTGCCCCACGGTGAGTCCGGCAAGGTGATCGGCATCCGCGTGTTCCTCCCGC 125
Sbjct 2683 TCGCTGAAGGTGCCCCACGGTGAGTCCGGCAAGGTGATCGGCATCCGCGTGTTCCTCCCGC 2742
Query 126 GAGGACGACGACGAGCTGCCCGCCGGCGTCAACGAGCTGGTCCGCGTGTACGTGGCGCAG 185
Sbjct 2743 GAGGACGACGACGAGCTGCCCGCCGGCGTCAACGAGCTGGTCCGCGTGTACGTGGCGCAG 2802
Query 186 AAGCGCAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTCGCCGGACGCCACGGCAACAAAGGGCGTCATC 245
Sbjct 2803 AAGCGCAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTCGCCGGACGCCACGGCAACAAAGGGCGTCATC 2862
Query 246 GGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCTTCCCGATGGCACCCCGGTGGACATC 305
Sbjct 2863 GGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCTTCCCGATGGCACCCCGGTGGACATC 2922
Query 306 ATCCTGAACACCCACGGTGTGCCCGTGTGATGAACATCGCCAGATCCTGSAACCCAC 365
Sbjct 2923 ATCCTGAACACCCACGGTGTGCCCGTGTGATGAACATCGCCAGATCCTGSAACCCAC 2982
Query 366 CTCGGGTGGGTGGCCAAAGGCCGGCTGGAAATCGACGTCGCCCGAGGTACCCCGAATGG 425
Sbjct 2983 CTCGGGTGGGTGGCCAAAGGCCGGCTGGAAATCGACGTCGCCCGAGGTACCCCGAATGG 3042
Query 426 GCSTCCAAGCTGCCCGAGCAGCTGTACTCGGCTCCGGTTCGACAGCATCGTCAGCCCGCC 485
Sbjct 3043 GCSTCCAAGCTGCCCGAGCAGCTGTACTCGGCTCCGGTTCGACAGCATCGTCAGCACC-C 3100
Query 486 CGGGGGTTCGAC 497
Sbjct 3101 CGGTG-TTCGAC 3111

```

**Figura 25. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 8 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 8 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. porcinum* (No. Acceso GenBank AY262737.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. cosmeticum* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. porcinum* (No. Acceso GenBank AY262737.1), con una puntuación máxima de 878 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 852 bits (461), Expect = 0.0
Identities = 466/468 (99%), Gaps = 2/468 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 4 GCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTTCATCGGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCG 63
Sbjct 229 GCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTTCATCGGCAAGATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCG 288
Query 64 TTCCTGCGCTGACGGCACCCCGGTGGACATCATCTTGAACACCCACGGTGTGCCCGCTCG 123
Sbjct 289 TTCCTGCGCTGACGGCA-CGCCGGTGGACATCATCTTGAACACCCACGGTGTGCCCGCTCG 347
Query 124 TATGAACATCGGTGAGTCCGATCCTGGAGACCCACCTCGGGTGGGTGGCCAAAGAGCGGCTGGAA 183
Sbjct 348 TATGAACATCGGTGAGTCCGATCCTGGAGACCCACCTCGGGTGGGTGGCCAAAGAGCGGCTGGAA 407
Query 184 GATCAACGGTTCACCGGACTGGGCGAACCGCGCTGCCCAAGGAGCTGCTGGAGTCCGAGCC 243
Sbjct 408 GATCAACGGTTCACCGGACTGGGCGAACCGCGCTGCCCAAGGAGCTGCTGGAGTCCGAGCC 467
Query 244 GGGAAATATCGTTCGACACCGGTGTTTCGACGGTGCCTGGAGAACGAGCTGCAGGGTCT 303
Sbjct 468 GGGAAATATCGTTCGACACCGGTGTTTCGACGGTGCCTGGAGAACGAGCTGCAGGGTCT 527
Query 304 GCTGGGGTCCACGCTGCCCAACCGGACGGCGAGACGCTCGTTCGACGAGGACGGCAAGGC 363
Sbjct 528 GCTGGGGTCCACGCTGCCCAACCGGACGGCGAGACGCTCGTTCGACGAGGACGGCAAGGC 587
Query 364 GATGCTGTTTCGACGGTCCGAGTGGCGAGCCGTTCCCGTATCCGGTACCGGTGACGGTGGGCTACAT 423
Sbjct 588 GATGCTGTTTCGACGGTCCGAGTGGCGAGCCGTTCCCGTATCCGGTACCGGTGACGGTGGGCTACAT 647
Query 424 GTACATCCTCAAGCTGCACCACTTGGTGGACGACAAGAT-CACGCTCG 470
Sbjct 648 GTACATCCTCAAGCTGCACCACTTGGTGGACGACAAGATTCACGCTCG 695

```

**Figura 26. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 9 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 9 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. flavescens* (No. Acceso GenBank AY859698.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. scrofulaceum* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. flavescens* (No. Acceso GenBank AY859698.1), con una puntuación máxima de 852 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 804 bits (435), Expect = 0.0
Identities = 465/479 (98%), Gaps = 4/479 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 18 GGAGACGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGGAGGTCGCGACACGTCGC 77
Sbjct 12 GGAG-CGCCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGGAGGTCGCGACACGTCGC 70
Query 78 TGAAGGTGCCCCACGGTGTAGTCCGGCAAGGTCATCGGCATCCGCGTGTCTCCCGGAGG 137
Sbjct 71 TGAAGGTGCCCCACGGTGTAGTCCGGCAAGGTCATCGGCATCCGCGTGTCTCCCGGAGG 130
Query 138 ACGACGACGAGCTGCCCGCCGGCGTCAACGAGCTGGTCCGCGTCTACGTGGCCCAAGAAGC 197
Sbjct 131 ACGACGACGAGCTGCCCGCCGGCGTCAACGAGCTGGTCCGCGTGTACGTGGCCCAAGAAGC 190
Query 198 GCAAGATCTCCGACGCGCACAAGCTCGCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTCATCGGCA 257
Sbjct 191 GCAAGATCTCCGACGCGCACAAGCTCGCCGGACGCCACGGCAACAAGGGCGTCATCGGCA 250
Query 258 AGATCCTGCCCCGTCGAGGACATGCCGTTCTGCCCCGATGGCACCCCGGTGGACATCATCC 317
Sbjct 251 AGATCCTGCCCCGTCGAGGACATGCCGTTCTGCCCCGATGGCACCCCGGTGGACATCATCC 310
Query 318 TGAACACCCACGGTGTGCCCGCTGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCACCTCG 377
Sbjct 311 TGAACACCCACGGTGTGCCCGCTGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAGACCCACCTCG 370
Query 378 GGGTGGGTGGCCAAGGCCGGCTGGAAACATCGACGTCGCGCGGGGTACCCCGGAATGGCG 437
Sbjct 371 GG-TGGGTGGCCAAGGCCGGCTGGAAACATCGACGTCGCGCGGGGTACCCCGGAATGGCG 429
Query 438 CC-AAGCTGCCCGAGCAGCTGTACTCGGCTTCGGGCCAAAAGCATCGTCAGGAACCCCGG 495
Sbjct 430 TCTAAGCTGCCCGAGCAGCTGTACTCGGCTTCGGGCCAAAAGCATCGTCAGGAACCCCGG 487

```

**Figura 27. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 11 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 11 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. porcinum* (No. Acceso GenBank FJ418054.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. peregrinum* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. porcinum* (No. Acceso GenBank FJ418054.1), con una puntuación máxima de 804 y un valor máximo de identidad de 98%.

```

Score = 850 bits (460), Expect = 0.0
Identities = 499/499 (98%), Gaps = 11/499 (2%)
Strand=Plus/Plus
Query 12 TCTCCGACGGTGGACAAGCCTGCGCCCGGACCGCCACCCGGCAACAAGGGCGGTCAATC 71
Sbjct 207 TCT-CCGACGGT-GACAAG-CTG-G-CCGGA-CG-CCA-C-GGCAACAAGGGC-GTCATC 256
Query 72 GGCAAGAATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCTGCCCCGATGGCACCCCGGTGGACAT 131
Sbjct 257 GGCAAG-ATCCTGCCCGTCGAGGACATGCCGTTCTGCCCCGATGGCACCCCGGTGGACAT 315
Query 132 CATCCTGAACACCCACGGTGTGCCACGTCGTATGAACATCGGCCAGATCTTGGAAACCCA 191
Sbjct 316 CATCCTGAACACCCACGGTGTGCCACGTCGTATGAACATCGGCCAGATCTTGGAAACCCA 375
Query 192 CCTCGGGTGGATTGCCAAGACCGGCTGGAACATCGAGGGTGTATCCCGAGTGGCCGAGAA 251
Sbjct 376 CCTCGGGTGGATTGCCAAGACCGGCTGGAACATCGAGGGTGTATCCCGAGTGGCCGAGAA 435
Query 252 CCTGCCCGAGGACCTGCAGTCGGCTCCCGCCGACACCCGCACGGCCACCCCGGTGTTCGA 311
Sbjct 436 CCTGCCCGAGGACCTGCAGTCGGCTCCCGCCGACACCCGCACGGCCACCCCGGTGTTCGA 495
Query 312 CGGTGCCCGCGAGGAGGAGCTGACCCGACTGCTGTCTCGACGCTGCCCAACCCGGGACGG 371
Sbjct 496 CGGTGCCCGCGAGGAGGAGCTGACCCGACTGCTGTCTCGACGCTGCCCAACCCGGGACGG 555
Query 372 CGAGGTCATGGTGGACGGTGCAGGCAAGGCCCGGTTGTTTCAGCGCCGACGGCGAGCC 431
Sbjct 556 CGAGGTCATGGTGGACGGTGCAGGCAAGGCCCGGTTGTTTCAGCGCCGACGGCGAGCC 615
Query 432 GTTCCCGTACCCGGTGACCGTTCGGTTACATGTACATCCTGAAGTGCACCACTTGGTTCGA 491
Sbjct 616 GTTCCCGTACCCGGTGACCGTTCGGTTACATGTACATCCTGAAGTGCACCACTTGGTTCGA 675
Query 492 CGACAAGATCCACGCGCGT 510
Sbjct 676 CGACAAGATCCACGCGCGT 694

```

**Figura 28. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 15 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 15 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. massiliense* (No. Acceso GenBank HM807431.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. massiliense* (No. Acceso GenBank HM807431.1), con una puntuación máxima de 850 y un valor máximo de identidad de 98%.

```

Score = 905 bits (490), Expect = 0.0
Identities = 513/522 (99%), Gaps = 9/522 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 6 CCGGAGGAGCGGCTGCTGCGGGCGATCTTCGGCGAGAAGGCCCGGAGGTCCGCGACAC 65
Sbjct 16 CCGGAGGAGCGGCTGCTGCGGGCGATCTTCGGCGAGAAGGCCCGGAGGTCCGCGACAC 75
Query 66 CTCACCTGAAGGTGCCGCACGGCGAGTCCGGGAAGGTCATCGGAATCCGGGTGTTCTCCCG 125
Sbjct 76 CTCACCTGAAGGTGCCGCACGGCGAGTCCGGGAAGGTCATCGGAATCCGGGTGTTCTCCCG 135
Query 126 CGAGGACGACGACGAGCTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC GCGTCTACGTGGCCCA 185
Sbjct 136 CGAGGACGACGACGAGCTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC GCGTCTACGTGGCCCA 195
Query 186 GAAGCGGAAGATCTCCGACGGCGACAAGCTGGCCGACGGCACGGCAACAAGGTGTGAT 245
Sbjct 196 GAAGCGGAGATCTCCGACGGCGACAAGCTGGCCGACGGCACGGCAACAAGGTGTGAT 255
Query 246 CGGCAAGATCCTGCCCCAGGAGSACATSCCGTTCCTGCCGGACGGCAGCCGGTGGACAT 305
Sbjct 256 CGGCAAGATCCTGCCCCAGGAGGACATGCCGTTCCTGCCGGACGGCAGCCGGTGGACAT 315
Query 306 CATCCTGAACACCCACGGGGTGCCGCGACGGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCA 365
Sbjct 316 CATCCTGAACACCCACGGGGTGCCGCGACGGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCA 375
Query 366 CCTGGGGGTGGTTCGCCAAGTCCGGTGGAAACATCGACGGATCTCCGAGTGGGGCGGTG 425
Sbjct 376 CCTGGGG-TGGTTCGCCAAGTCCGGTGGAAACATCGACGGATCTCCGAGTGGG-CGGTG 433
Query 426 AACCTGCCCGAGGGAGCTGCCGACGGCAGCCGACCCAGATCGTGTCCGACGGGGTGT 485
Sbjct 434 AACCTGCCCGAGG-AGCTGCCGACGGCAGCCGACCCAGATCGTGTCCGACGGGG-TGT 491
Query 486 TTCGACGGCCCAAAGGAAGGAGGAGTGCAGGGCAATGCT 527
Sbjct 492 T-CGACGGCGCCAA-GGA-GGAGGA-GCTGCAGGGCA-TGCT 528

```

**Figura 29. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 16 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 16 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. timonense* (No. Acceso GenBank EF584435.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. intracellulare* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. timonense* (No. Acceso GenBank FJ418054.1), con una puntuación máxima de 905 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 876 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 481/484 (99%), Gaps = 2/484 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 16 GCGGCTGCTGCGGGCGATCTTCGGCGAGAAGGCCCGGAGGTCCGCGACACCTCACTGAA 75
Sbjct 25 GCGGCTGCTGCGGGCGATCTTCGGCGAGAAGGCCCGGAGGTCCGCGACACCTCACTGAA 84
Query 76 GGTGCCGCACGGCGAGTCCGGGAAGGTCATCGGAATCCGGGTGTTCTCCCGCAGGACGA 135
Sbjct 85 GGTGCCGCACGGCGAGTCCGGGAAGGTCATCGGAATCCGGGTGTTCTCCCGCAGGACGA 144
Query 136 CGACGAGCTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC GCGTCTACGTGGCCAGAAAGCGGAA 195
Sbjct 145 CGACGAGCTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC GCGTCTACGTGGCCAGAAAGCGGAA 204
Query 196 GATCTCCGACGGCGACAAGCTGGCCGACGGCACGGCAACAAGGTTGTATCGGCAAGAT 255
Sbjct 205 GATCTCCGACGGCGACAAGCTGGCCGACGGCACGGCAACAAGGTTGTATCGGCAAGAT 264
Query 256 CTTGCCCCAGGAGGACATGCCGTTCCTGCCGGACGGCACGGCCGGTGGACATCATCTGAA 315
Sbjct 265 CTTGCCCCAGGAGGACATGCCGTTCCTGCCGGACGGCACGGCCGGTGGACATCATCTGAA 324
Query 316 CACCCACGGGGTGC CCGCAGCGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCACCTGGGGGT 375
Sbjct 325 CACCCACGGGGTGC CCGCAGCGATGAACATCGGCCAGATCCTGGAAACCCACCTGGGG-T 383
Query 376 GGGTCCCAAAGTCCGGCTGGAAACATCGACGGATCTCCGAGTGGGCGGTGAACCTGCCCG 435
Sbjct 384 GGGTCCCAAAGTCCGGCTGGAAACATCGACGGATCTCCGAGTGGGCGGTGAACCTGCCCG 443
Query 436 AGGAGCTGCCGCACGGCAGCCGACCGGACAGATCGTGTCCGACGGCCG-TGTTCCGACGGCCCA 494
Sbjct 444 AGGAGCTGCCGCACGGCAGCCGACCGGACAGATCGTGTCCGACGGCCGTGTTCCGACGGCCCA 503
Query 495 AGGA 498
Sbjct 504 AGGA 507

```

**Figura 30. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 17 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast.** Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 17 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. timonense* (No. Acceso GenBank EF584435.1). La secuencia analizada no coincide con ninguna de las secuencias del GenBank que corresponden a la especie *M. sherrisii* (especie bajo la cual fue inicialmente identificada). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. timonense* (No. Acceso GenBank EF584435.1), con una puntuación máxima de 876 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 870 bits (471), Expect = 0.0
Identities = 486/492 (99%), Gaps = 6/492 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 16 CCGGA-GAGCGGCTGCTGCGGGCGATCTTCGGTGAGAAGGCCCGAGGTCGCGACACC 74
Sbjct 1215445 CCGGAGGAGCGGCTGCTGCGGGCGATCTTCGGTGAGAAGGCCCGAGGTCGCGACACC 1215504
Query 75 TCCTGAAAGGTGCCGCACGGTGAAGTCCGGCAAGGTGATCGGCATTCCGGTGTCTCCCGC 134
Sbjct 1215505 TCCTGAAAGGTGCCGCACGGTGAAGTCCGGCAAGGTGATCGGCATTCCGGTGTCTCCCGC 1215564
Query 135 GAGGACGACGACGAGCTGCCGGCCGGTGTCAACGAACTGGTCCGCGTCTACGTGGCCAG 194
Sbjct 1215565 GAGGACGACGACGAGCTGCCGGCCGGTGTCAACGAACTGGTCCGCGTCTACGTGGCCAG 1215624
Query 195 AAGCCGAAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGTGTGACGGCAACAGGGCGTCATC 254
Sbjct 1215625 AAGCCGAAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGTGTGACGGCAACAGGGCGTCATC 1215684
Query 255 GGCAAGATCCTGCCCGCCGAGGACATGCCGTTCTTCCGCGGATGGCACGCCGGTTCGACATC 314
Sbjct 1215685 GGCAAGATCCTGCCCGCCGAGGACATGCCGTTCTTCCGCGGATGGCACGCCGGTTCGACATC 1215744
Query 315 ATCCTGAACCCACGGTGTGCCGCGACGGATGAACATCGGTGAGATTCTGGAAACCCAC 374
Sbjct 1215745 ATCCTGAACCCACGGTGTGCCGCGACGGATGAACATCGGTGAGATTCTGGAAACCCAC 1215804
Query 375 CTITGGTTGGGTGCGCAAGTCCGGGCTGGAACATCGACGTCGCCAACGGAGTGCCTGGAGT 434
Sbjct 1215805 CTITGGTTGGGTGCGCAAGTCCGGGCTGGAACATCGACGTCGCCAACGGAGTGCCTGGAGT 1215862
Query 435 GGGGGGGGCAAGTGCCTGCAAAACCTGCTCTCGGCTCAACCGGACAGCATCGTGGTCCAC 494
Sbjct 1215863 GGGGGGGGCAAGTGCCTGCAAAACCTGCTCTCGGCTCAACCGGACAGCATCGTGGTCCAC 1215920
Query 495 CCGGTTGGTTCG 506
Sbjct 1215921 CCGGTTGGTTCG 1215931

```

Figura 31. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 18 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast. Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 18 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. marinum* (No. Acceso GenBank CP000854.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. marinum* (No. Acceso GenBank CP000854.1), con una puntuación máxima de 870 y un valor máximo de identidad de 99%.

```

Score = 832 bits (450), Expect = 0.0
Identities = 477/488 (98%), Gaps = 9/488 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 10 ACG-CGGAGGAGCGGCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGAGGTCGCGAC 68
Sbjct 764001 ACGCCGAGGAGCGGCTGCTGCGTGCCATCTTCGGTGAGAAGGCCCGAGGTCGCGAC 764060
Query 69 ACTTCGCTGAAAGGTGCCGCACGGTGAAGTCCGGCAAGGTGATCGGCATTCCGGTGTITTTCC 128
Sbjct 764061 ACTTCGCTGAAAGGTGCCGCACGGTGAAGTCCGGCAAGGTGATCGGCATTCCGGTGTITTTCC 764120
Query 129 CGCGAGGACGAGGACGAGTGTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGCCTGTGTATGTGGCT 188
Sbjct 764121 CGCGAGGACGAGGACGAGTGTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGCCTGTGTATGTGGCT 764180
Query 189 CAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGGCACGGCAACAAGGGCGTG 248
Sbjct 764181 CAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGGCACGGCAACAAGGGCGTG 764240
Query 249 ATCGGCAAGATCCTGCCGGTGTGAGGACATGCCGTTCTTCCGCGACGGCACCCCGGTGGAC 308
Sbjct 764241 ATCGGCAAGATCCTGCCGGTGTGAGGACATGCCGTTCTTCCGCGACGGCACCCCGGTGGAC 764300
Query 309 AITATTTTGAACACCCACGGCGTGCCTGCGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGGAGGAC 368
Sbjct 764301 AITATTTTGAACACCCACGGCGTGCCTGCGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGGAG-AC 764359
Query 369 CCACCTGGGGTGTGTGCCACAGCGGCTGGGAAGGTGACGCGCCCAAGGGGT-CCG 427
Sbjct 764360 CCACCTGGG-TTGTGTGCCACAGCGGCTGG-AAAGTGCAGCGCCCAAGGGGTTCG 764417
Query 428 GACTGGGCGCCAGGCTGCC-GACGAACTGCTCGAGGCGCCACCCGAAC-CCATTGTGTT 485
Sbjct 764418 GACTGGGCGCCAGGCTGCCCGACGAACTGCTCGAGGCGCCACCCGAAC-CCATTGTGTT- 764475
Query 486 CAACGCCG 493
Sbjct 764476 CGACGCCG 764483

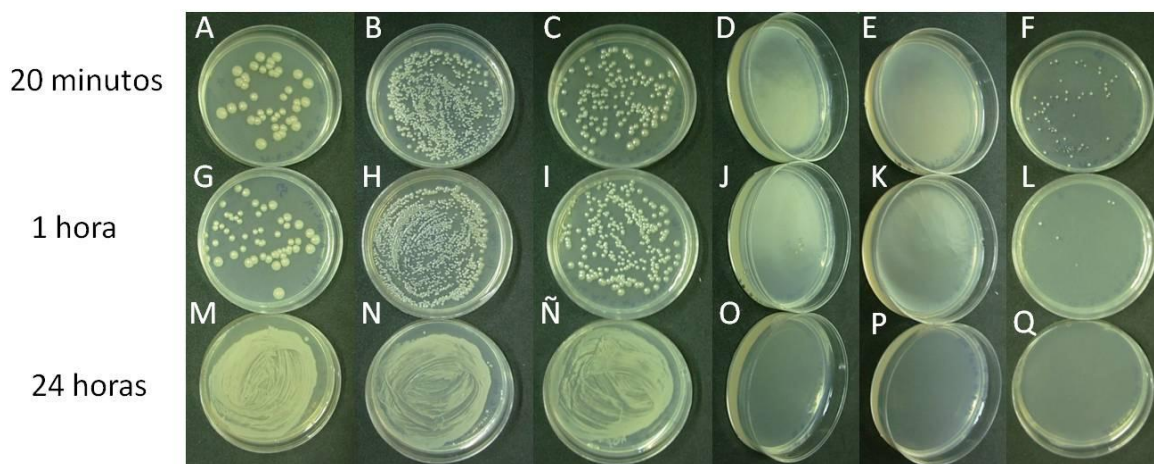
```

Figura 32. Análisis de la secuencia del gen *rpoB* de la muestra 19 mediante la herramienta de alineamiento múltiple Blast. Query indica la secuencia obtenida de la secuenciación del gen *rpoB* de la muestra 19 mientras que el Sbjct indica la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *rpoB* de *M. bovis* BCG (No. Acceso GenBank CP000854.1). Esta secuencia coincide con la secuencia nucleotídica de *M. bovis* BCG (No. Acceso GenBank AP010918.1), con una puntuación máxima de 832 y un valor máximo de identidad de 98%.

**Anexo 33.** Ensayo dilución – neutralización con BDBA de *M. abscessus* (muestra # 2).

	Controles			Ensayo		
Dilución	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	48	41	Césped	0	0	0
	33	35	Césped	0	0	0
	30	18	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	37	31,33	-----	0	0	0
<b>Título</b>	7,40x10 <sup>9</sup>	6,26x10 <sup>9</sup>	-----	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	1292	1026	Césped	0	0	0
	1204	1266	Césped	0	0	0
	1214	1018	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	1236,66	1103,33	-----	0	0	0
<b>Título</b>	2,47x10 <sup>9</sup>	2,20x10 <sup>9</sup>	-----	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	31	4	0
	Césped	Césped	Césped	15	2	0
	Césped	Césped	Césped	57	1	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	44	2,5	0
<b>Título</b>	4,13x10 <sup>8</sup>	6,80x10 <sup>8</sup>	6,81x10 <sup>9</sup>	8,80x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				<b>2,70x10<sup>-6</sup></b>	<b>3,19x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;2,94x10<sup>-6</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



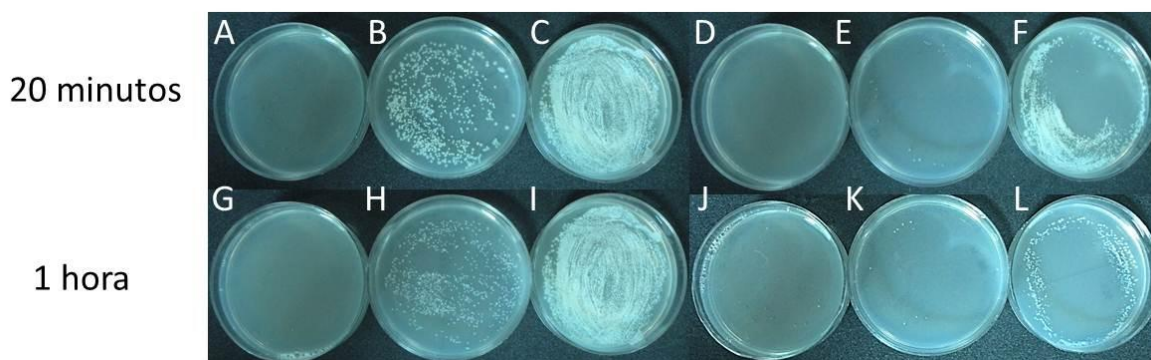
**Anexo 34.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. abscessus* (muestra # 2).

**A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **M:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **N:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **Ñ:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **O:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **P:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **Q:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 35.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. abscessus* (muestra # 2).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	1	1	0	0
	27	17	0	0
<b>Promedio</b>	14	9	0	0
<b>Título</b>	2,80x10 <sup>9</sup>	1,80x10 <sup>9</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	1200	816	47	10
	808	866	25	1
<b>Promedio</b>	1004	841	36	5,5
<b>Título</b>	2x10 <sup>9</sup>	1,68x10 <sup>9</sup>	7,20x10 <sup>-7</sup>	1,10x10 <sup>7</sup>
<b>Frecuencia</b>			<b>3,59x10<sup>-2</sup></b>	<b>6,54x10<sup>-3</sup></b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	0
	Césped	Césped	Césped	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	0
<b>Título</b>	7,60x10 <sup>8</sup>	1,12x10 <sup>9</sup>	-----	0
<b>Frecuencia</b>			-----	<b>0</b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

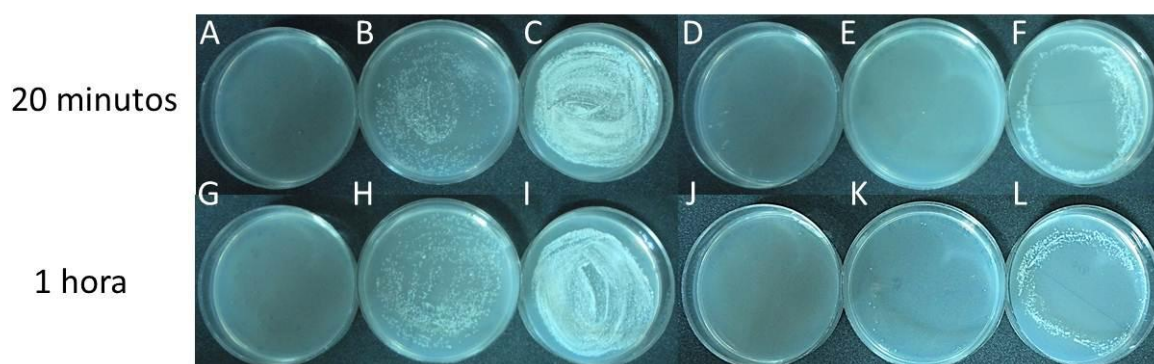


**Anexo 36.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. abscessus* (muestra # 2). A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 37.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. abscessus* (muestra # 2)

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	51	48	0	0
	65	21	0	0
<b>Promedio</b>	58	34,5	0	0
<b>Título</b>	1,16x10 <sup>10</sup>	6,90x10 <sup>9</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	1176	1224	5	27
	1274	1488	4	31
<b>Promedio</b>	1225	1356	4,5	29
<b>Título</b>	2,45x10 <sup>9</sup>	2,71x10 <sup>9</sup>	9x10 <sup>6</sup>	5,80x10 <sup>7</sup>
<b>Frecuencia</b>			<b>3,67x10<sup>-3</sup></b>	<b>2,14x10<sup>-2</sup></b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	972
	Césped	Césped	Césped	950
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	961
<b>Título</b>	1,50x10 <sup>9</sup>	1,96x10 <sup>9</sup>	-----	1,92x10 <sup>10</sup>
<b>Frecuencia</b>			-----	<b>2,79x10<sup>-3</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

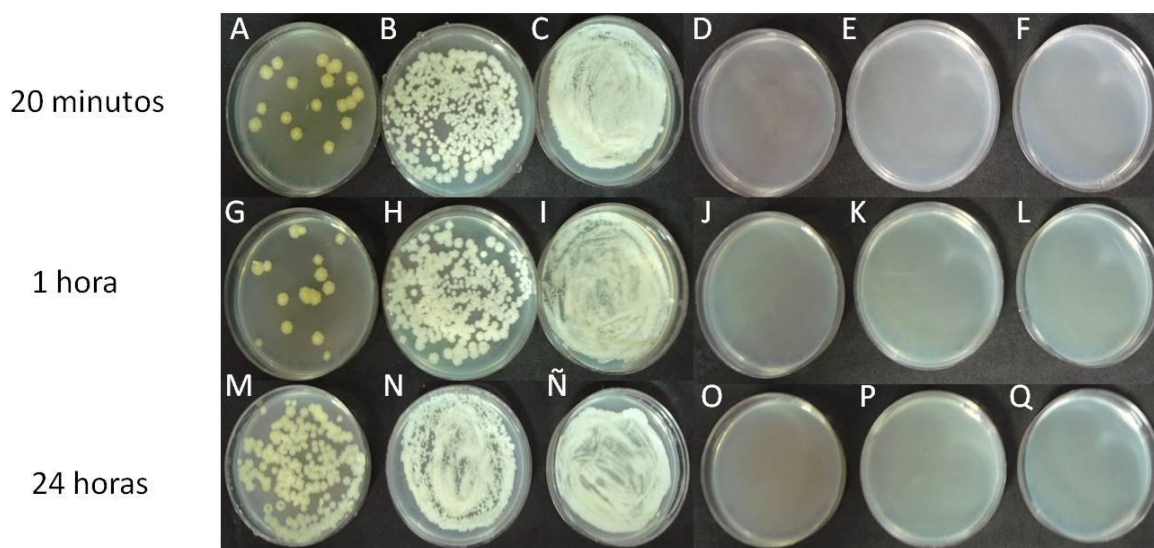


**Anexo 38.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. abscessus* (muestra # 2). **A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 39.** Ensayo dilución – neutralización con BDBA de *M. senegalense* (muestra # 4).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	27	15	238	0	0	0
	18	5	208	0	0	0
<b>Promedio</b>	22,5	10	223	0	0	0
<b>Título</b>	4,50x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>9</sup>	4,46x10 <sup>10</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	656	540	Césped	0	0	0
	556	522	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	606	531	-----	0	0	0
<b>Título</b>	1,21x10 <sup>9</sup>	1,06x10 <sup>9</sup>	-----	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	0	0	0
	Césped	Césped	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	0	0	0
<b>Título</b>	7,20x10 <sup>8</sup>	1,30x10 <sup>9</sup>	8x10 <sup>9</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>&lt;4,44x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;1x10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;4,48x10<sup>-7</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



**Anexo 40.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. senegalense* (muestra # 4).

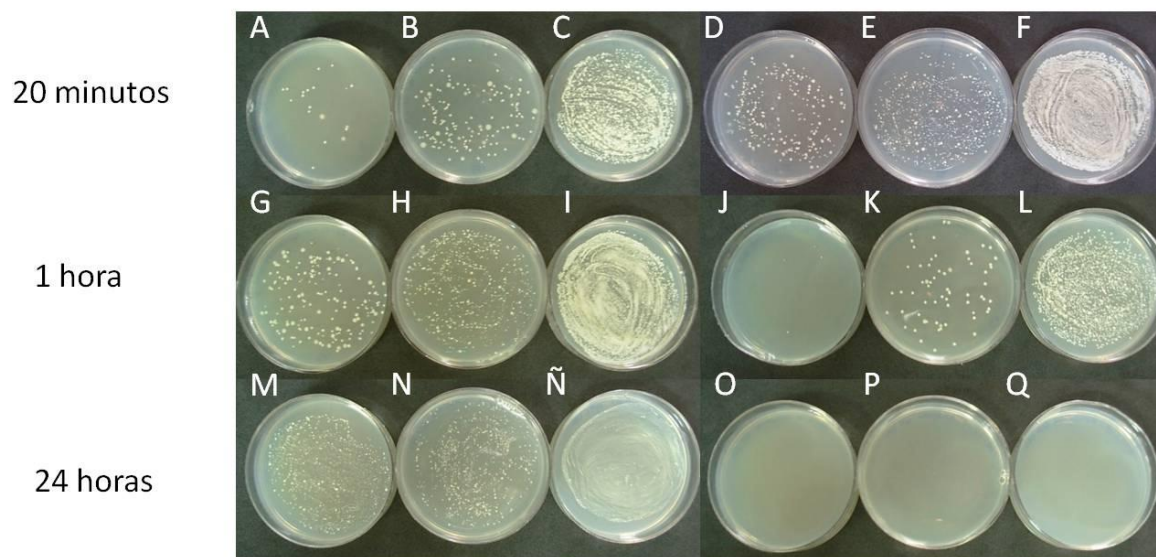
**A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **M:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **N:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **Ñ:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **O:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **P:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **Q:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.



**Anexo 41.** Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. senegalense* (muestra # 6).

	Controles			Ensayo		
Dilución	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	276	250	Césped	18	7	0
	287	182	Césped	24	4	0
<b>Promedio</b>	281,5	216	-----	21	5,5	0
<b>Título</b>	5,63x10 <sup>10</sup>	4,32x10 <sup>10</sup>	-----	4,20x10 <sup>9</sup>	1,10x10 <sup>9</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				<b>7,46x10<sup>-2</sup></b>	<b>2,55x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	1136	1124	Césped	155	86	0
	1000	1128	Césped	156	65	0
<b>Promedio</b>	1068	1126	Césped	155,5	75,5	0
<b>Título</b>	2,13x10 <sup>9</sup>	2,25x10 <sup>9</sup>	-----	3,11x10 <sup>8</sup>	1,51x10 <sup>8</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				<b>1,46x10<sup>-1</sup></b>	<b>6,71x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	Césped	Césped	0
	Césped	Césped	Césped	Césped	Césped	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	Césped	Césped	0
<b>Título</b>	2,58x10 <sup>9</sup>	2,60x10 <sup>9</sup>	9,60x10 <sup>9</sup>	Césped	Césped	0
<b>Frecuencia</b>				-----	-----	<b>&lt;2,08x10<sup>-6</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



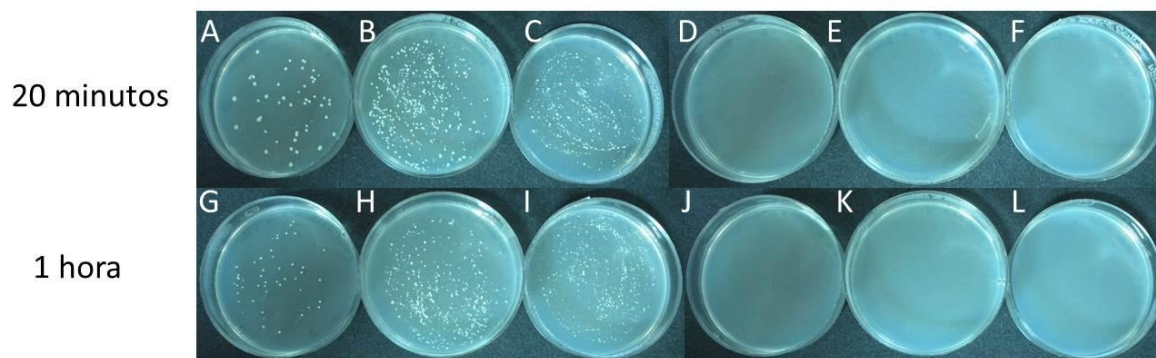
**Anexo 42.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. senegalense* (muestra # 6).

**A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **M:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **N:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **Ñ:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **O:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **P:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **Q:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 43.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. senegalense* (muestra # 6).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	61	54	0	0
	53	55	0	0
<b>Promedio</b>	57	54,5	0	0
<b>Título</b>	1,14x10 <sup>10</sup>	1,09x10 <sup>10</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	878	800	0	0
	832	839	0	0
<b>Promedio</b>	855	819,5	0	0
<b>Título</b>	1,71x10 <sup>9</sup>	1,63x10 <sup>9</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	0	0
	Césped	Césped	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	0	0
<b>Título</b>	4x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>7</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>&lt;1,75x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;1,83x10<sup>-6</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

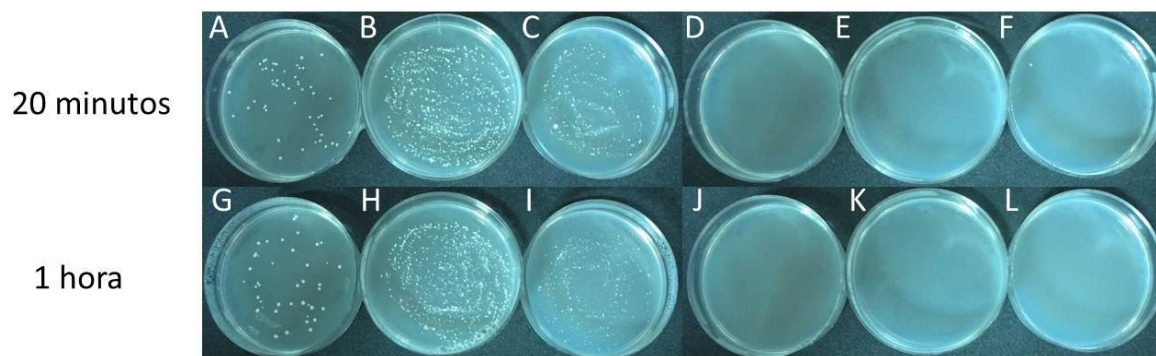


**Anexo 44.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. senegalense* (muestra # 6). **A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 45.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 de *M. senegalense* (muestra # 6).

	Controles		Ensayo	
Dilución	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	60	43	0	0
	58	38	0	0
<b>Promedio</b>	59	40,5	0	0
<b>Título</b>	1,18x10 <sup>10</sup>	8,10x10 <sup>9</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	800	735	0	0
	900	740	0	0
<b>Promedio</b>	850	737,5	0	0
<b>Título</b>	1,70x10 <sup>9</sup>	1,47x10 <sup>9</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	1	0
	Césped	Césped	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	0,5	0
<b>Título</b>	2x10 <sup>-7</sup>	2x10 <sup>-7</sup>	1x10 <sup>7</sup>	0
<b>Frecuencia</b>			<b>8,47x10<sup>-7</sup></b>	<b>&lt;2,47x10<sup>-6</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

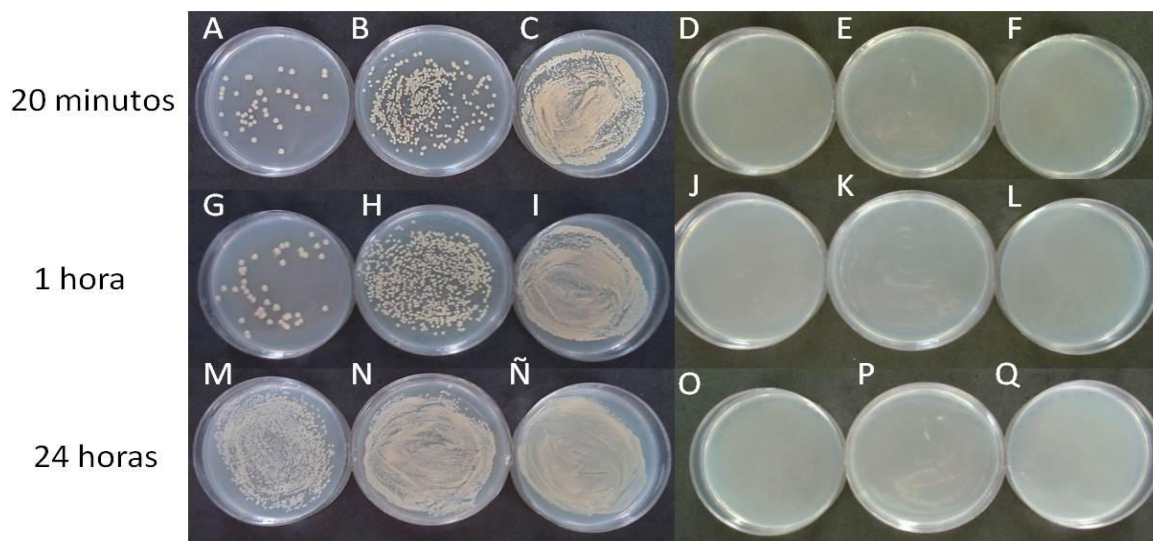


**Anexo 46.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. senegalense* (muestra # 6). **A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 47.** Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. cosmeticum* (muestra # 7).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10-7</b>	20	42	Césped	0	0	0
	42	50	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	31	46	-----	0	0	0
<b>Título</b>	6,20x10 <sup>9</sup>	9,20x10 <sup>9</sup>	-----	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10-5</b>	639	979	Césped	0	0	0
	691	1156	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	665	1067,5	-----	0	0	0
<b>Título</b>	1,33x10 <sup>9</sup>	2,13x10 <sup>9</sup>	-----	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10-3</b>	Césped	Césped	Césped	0	0	0
	Césped	Césped	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	0	0	0
<b>Título</b>	1,68x10 <sup>9</sup>	2,18x10 <sup>9</sup>	2,12x10 <sup>10</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>&lt;3,23x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;2,17x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;9,43x10<sup>-7</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



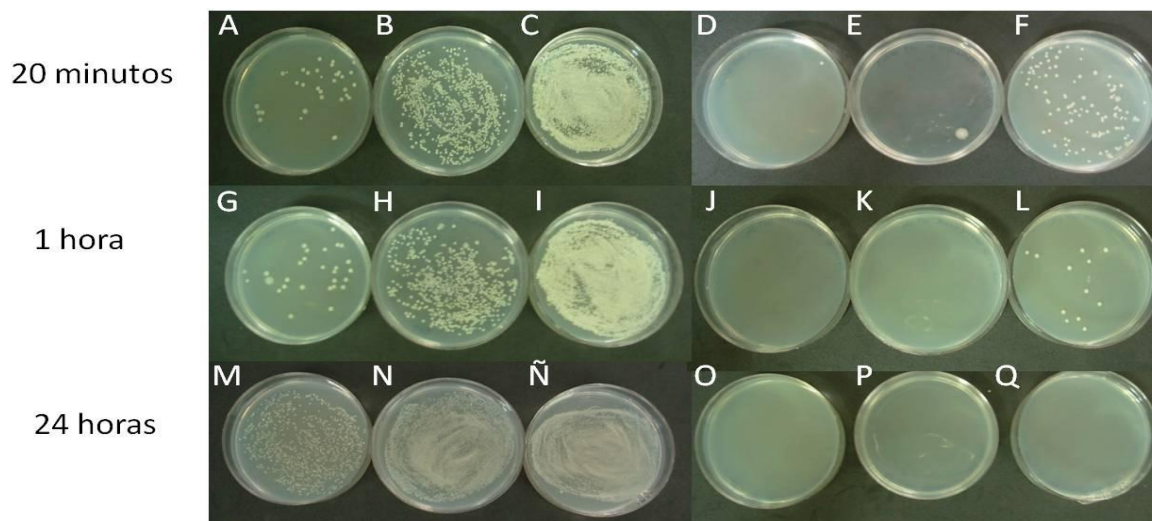
**Anexo 48.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. cosmeticum* (muestra # 7).

**A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **M:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **N:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **Ñ:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **O:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **P:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **Q:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 49.** Ensayo dilución – neutralización con BDBA de *M. porcinum* (muestra # 8).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	34	12	1146	1	0	0
	26	28	1200	0	0	0
<b>Promedio</b>	30	20	1173	0,5	0	0
<b>Título</b>	6x10 <sup>9</sup>	4x10 <sup>9</sup>	2,34x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>8</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>1,67x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	890	932	Césped	1	0	0
	1008	900	Césped	2	0	0
<b>Promedio</b>	949	916	-----	1,5	0	0
<b>Título</b>	1,89x10 <sup>9</sup>	1,83x10 <sup>9</sup>	-----	3x10 <sup>6</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>1,58x10<sup>-3</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	111	12	0
	Césped	Césped	Césped	108	8	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	109,5	10	0
<b>Título</b>	5,60x10 <sup>8</sup>	7,80x10 <sup>8</sup>	2,28x10 <sup>9</sup>	2,19x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>8</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				<b>3,33x10<sup>-6</sup></b>	<b>5x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;8,53x10<sup>-8</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

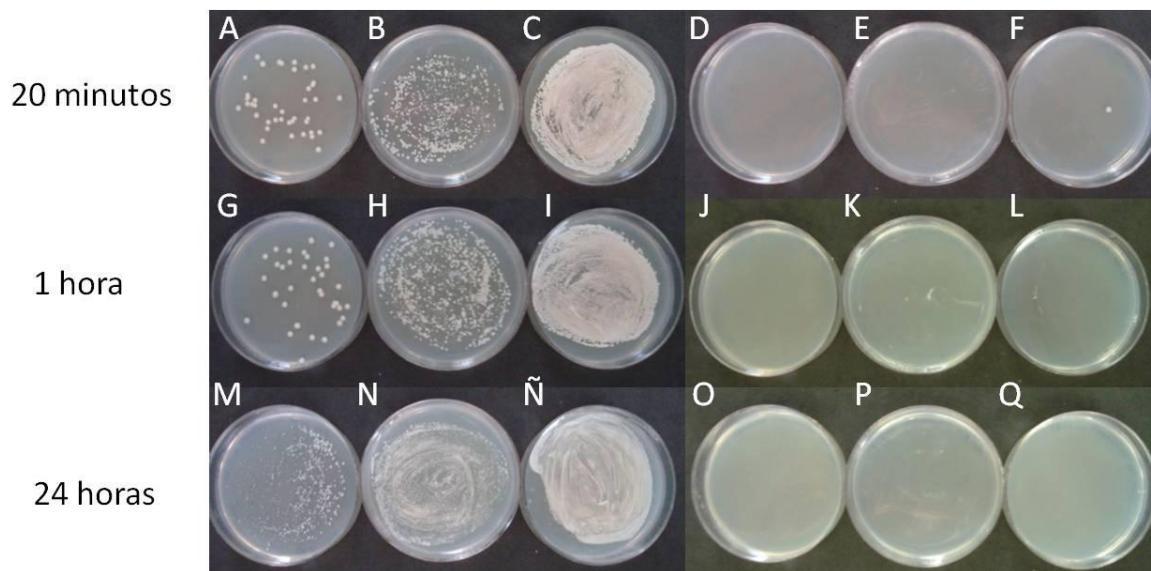


**Anexo 50.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. porcinum* (muestra # 8). **A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **M:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **N:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **Ñ:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **O:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **P:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **Q:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 51.** Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. porcinum* (muestra # 11).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	41	21	420	0	0	0
	23	36	320	0	0	0
<b>Promedio</b>	32	28,5	370	0	0	0
<b>Título</b>	6,40x10 <sup>9</sup>	5,70x10 <sup>9</sup>	7,4x10 <sup>10</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	639	979	Césped	0	0	0
	691	1156	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	665	1067,5	-----	0	0	0
<b>Título</b>	1,33x10 <sup>9</sup>	2,13x10 <sup>9</sup>	-----	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	1	0	0
	Césped	Césped	Césped	1	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	1	0	0
<b>Título</b>	3,20x10 <sup>9</sup>	3,24x10 <sup>9</sup>	2,04x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>5</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>3,13x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;3,51x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;2,70x10<sup>-7</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



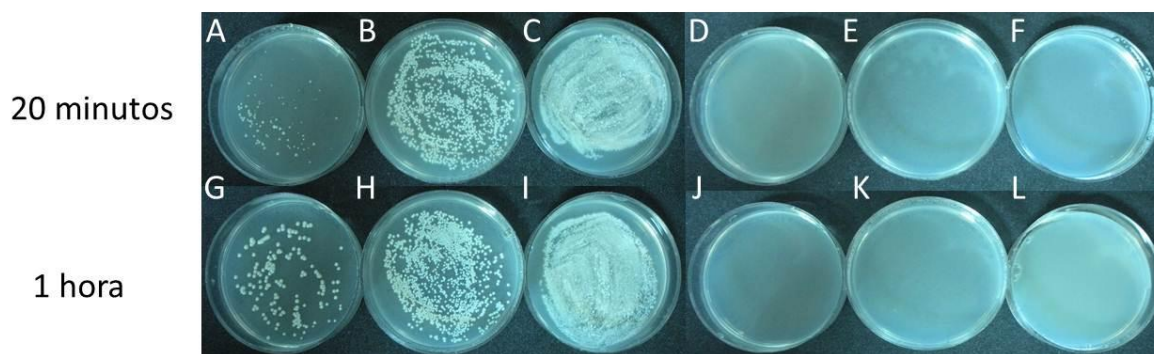
**Anexo 52.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. porcinum* (muestra # 11).

**A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **M:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **N:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **Ñ:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **O:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **P:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **Q:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 53.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. porcinum* (muestra # 11).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	150	166	0	0
	138	154	0	0
<b>Promedio</b>	144	160	0	0
<b>Título</b>	2,88x10 <sup>10</sup>	3,20x10 <sup>10</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	1110	1200	0	0
	998	1130	0	0
<b>Promedio</b>	1054	1165	0	0
<b>Título</b>	2,10x10 <sup>9</sup>	2,33x10 <sup>9</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	0	0
	Césped	Césped	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	0	0
<b>Título</b>	5x10 <sup>8</sup>	6x10 <sup>8</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>&lt;6,94x10<sup>-7</sup></b>	<b>&lt;6,25x10<sup>-7</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

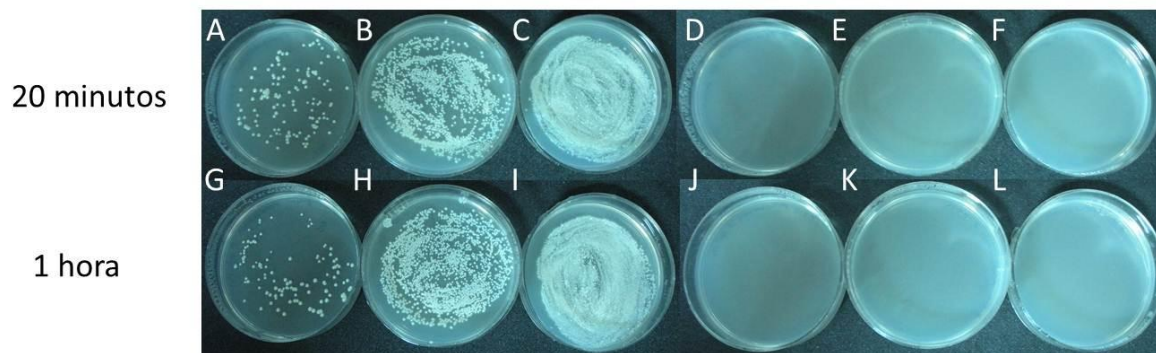


**Anexo 54.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. porcinum* (muestra # 11). **A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 55.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. porcinum* (muestra # 11).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	110	116	0	0
	130	114	0	0
<b>Promedio</b>	120	115	0	0
<b>Título</b>	2,40x10 <sup>10</sup>	2,30x10 <sup>10</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	1233	1220	0	0
	983	1000	0	0
<b>Promedio</b>	1108	1110	0	0
<b>Título</b>	2,21x10 <sup>9</sup>	2,22x10 <sup>10</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	0	0
	Césped	Césped	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	0	0
<b>Título</b>	5x10 <sup>8</sup>	5,40x10 <sup>8</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>&lt;8,33x10<sup>-7</sup></b>	<b>&lt;8,70x10<sup>-7</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



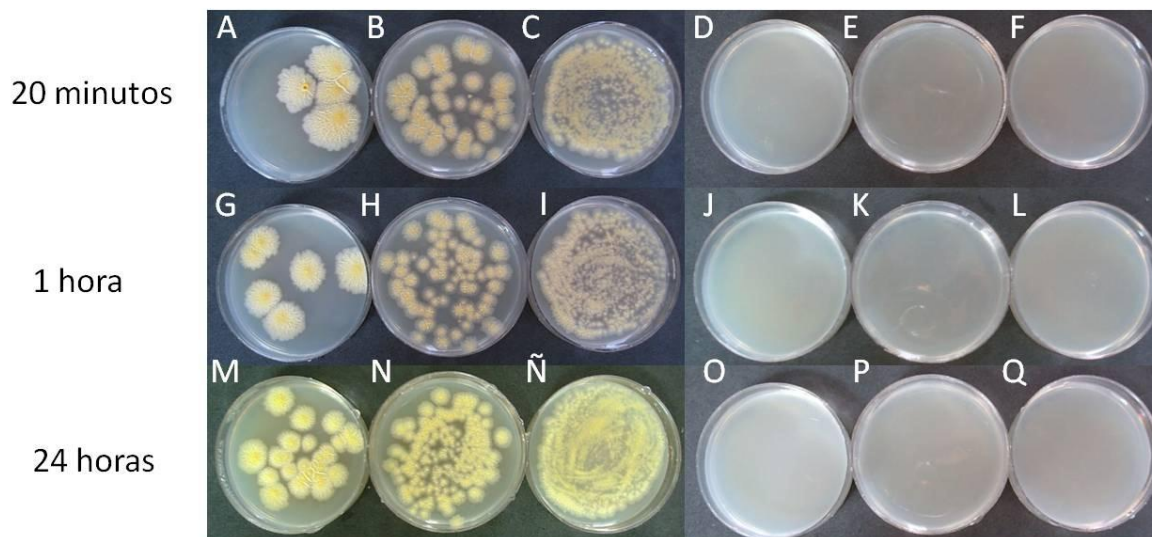
**Anexo 56.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. porcinum* (muestra # 11). **A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.



Anexo 57. Ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. phlei* (muestra # 12).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	5	2	24	0	0	0
	1	6	21	0	0	0
<b>Promedio</b>	3	4	22,5	0	0	0
<b>Título</b>	6x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>8</sup>	4,50x10 <sup>9</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	54	76	150	0	0	0
	45	40	130	0	0	0
<b>Promedio</b>	49,5	58	140	0	0	0
<b>Título</b>	9,90x10 <sup>7</sup>	1,16x10 <sup>8</sup>	2,80x10 <sup>8</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	0	0	0
	Césped	Césped	Césped	0	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	0	0	0
<b>Título</b>	1,60x10 <sup>8</sup>	1,60x10 <sup>8</sup>	3x10 <sup>8</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>&lt;3,33x10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;2,50x10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;4,44x10<sup>-6</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

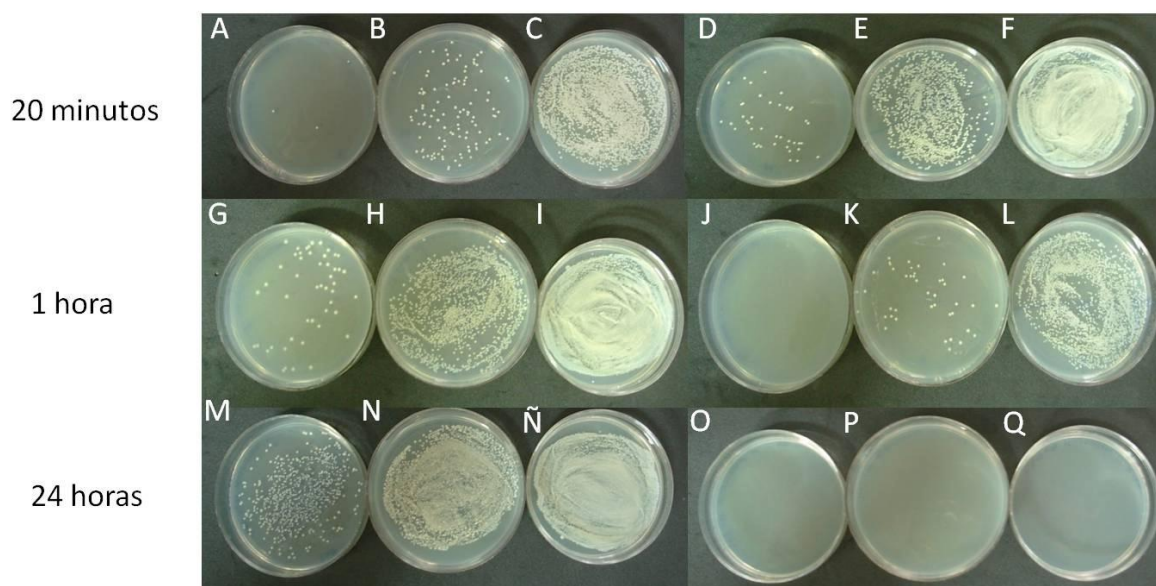


Anexo 58. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. phlei* (muestra # 12). A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; M: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; N: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; Ñ: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; O: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; P: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; Q: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

Anexo 59. Ensayo dilución – neutralización con BDBA de *M. massiliense* (muestra # 15).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	20	49	1027	3	0	0
	42	30	843	1	0	0
<b>Promedio</b>	31	39,5	935	2	0	0
<b>Título</b>	6,20x10 <sup>9</sup>	7,90x10 <sup>9</sup>	1,87x10 <sup>11</sup>	4x10 <sup>8</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>6,45x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	1170	1600	Césped	114	30	0
	1382	1580	Césped	90	41	0
<b>Promedio</b>	1276	1590	-----	102	35,5	0
<b>Título</b>	2,55x10 <sup>9</sup>	3,18x10 <sup>9</sup>	-----	2,04x10 <sup>8</sup>	7,10x10 <sup>7</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				<b>7,99x10<sup>-2</sup></b>	<b>2,23x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	Césped	1308	0
	Césped	Césped	Césped	Césped	1400	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	-----	1354	0
<b>Título</b>	4,26x10 <sup>9</sup>	5,70x10 <sup>9</sup>	9,18x10 <sup>9</sup>	-----	2,70x10 <sup>10</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				-----	<b>3,43x10<sup>-3</sup></b>	<b>&lt;1,07x10<sup>-7</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



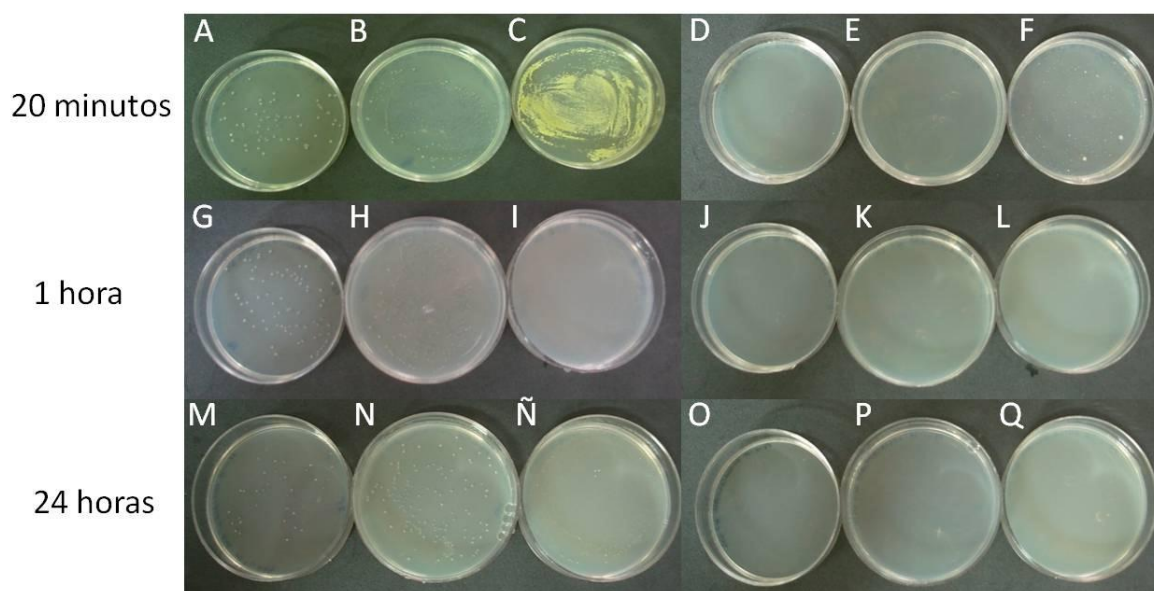
Anexo 60. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. massiliense* (muestra # 15). A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; M: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; N:

control de la dilución 10<sup>-5</sup>; Ñ: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; O: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; P: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; Q: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 61.** Ensayo dilución – neutralización con BDBA de *M. timonense* (muestra # 16)

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	50	72	36	0	0	0
	67	76	38	0	0	0
<b>Promedio</b>	58,5	74	37	0	0	0
<b>Título</b>	1,17x10 <sup>10</sup>	1,48x10 <sup>10</sup>	7,40x10 <sup>9</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	400	432	147	0	0	0
	441	435	116	0	0	0
<b>Promedio</b>	420,5	433,5	131,5	0	0	0
<b>Título</b>	8,41x10 <sup>8</sup>	8,67x10 <sup>8</sup>	2,63x10 <sup>8</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	160	0	0
	Césped	Césped	Césped	180	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	170	0	0
<b>Título</b>	3,30x10 <sup>9</sup>	3,44x10 <sup>9</sup>	6,60x10 <sup>8</sup>	3,40x10 <sup>6</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>2,91x10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;1,35x10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;2,70x10<sup>-6</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



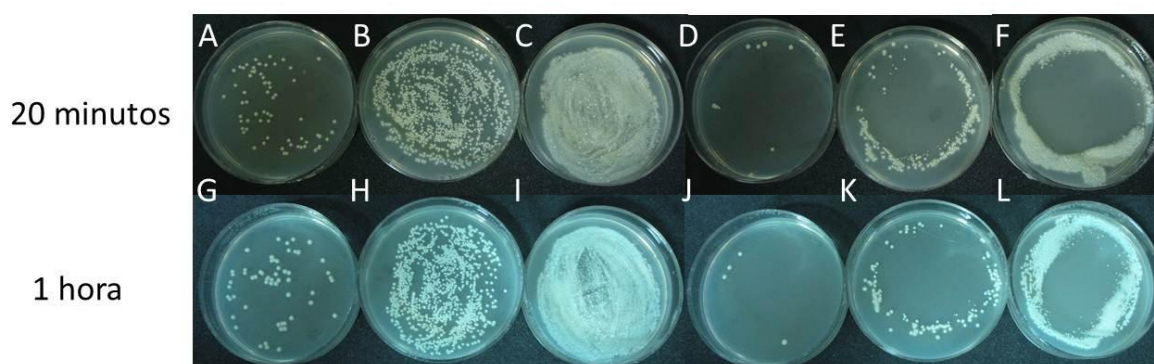
**Anexo 62.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. timonense* (muestra # 16). A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; M: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; N: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; Ñ: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; O: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; P: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; Q: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; M: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; N: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; Ñ: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; O: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; P: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; Q: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 63.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. timonense* (muestra # 16)

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
10 <sup>-7</sup>	65	53	1	4
	54	58	8	2
<b>Promedio</b>	59,5	55,5	4,5	3
<b>Título</b>	1,19x10 <sup>10</sup>	1,11x10 <sup>10</sup>	9x10 <sup>8</sup>	6x10 <sup>8</sup>
<b>Frecuencia</b>			<b>7,56x10<sup>-2</sup></b>	<b>5,41x10<sup>-2</sup></b>
10 <sup>-5</sup>	1036	982	61	122
	1078	1134	193	80
<b>Promedio</b>	1057	1058	127	101
<b>Título</b>	2,11x10 <sup>9</sup>	2,11x10 <sup>9</sup>	2,54x10 <sup>8</sup>	2,02x10 <sup>8</sup>
<b>Frecuencia</b>			<b>1,20x10<sup>-1</sup></b>	<b>9,55x10<sup>-2</sup></b>
10 <sup>-3</sup>	Césped	Césped	Césped	Césped
	Césped	Césped	Césped	Césped
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	-----
<b>Título</b>	2,40x10 <sup>9</sup>	2,10x10 <sup>9</sup>	-----	-----
<b>Frecuencia</b>			-----	-----

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

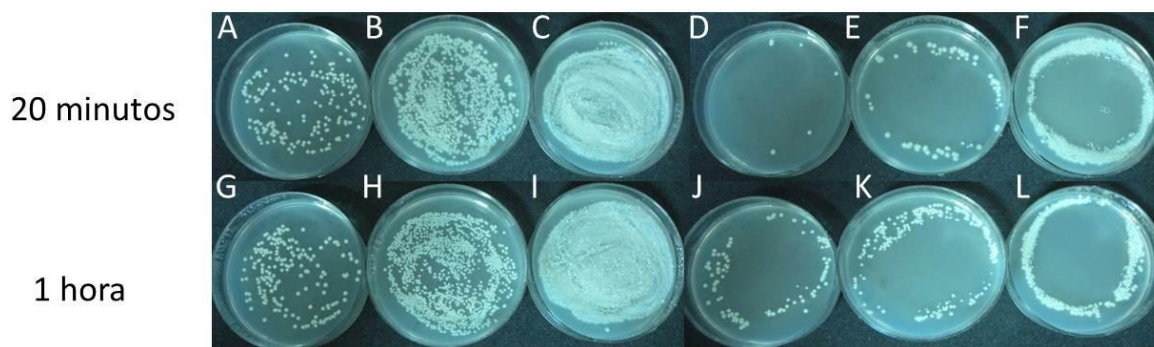


**Anexo 64.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. timonense* (muestra # 16). A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 65.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. timonense* (muestra # 16)

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
$10^{-7}$	168	184	6	88
	175	211	5	42
<b>Promedio</b>	171,5	197,5	5,5	65
<b>Título</b>	$3,43 \times 10^{10}$	$3,95 \times 10^{10}$	$1,10 \times 10^9$	$1,30 \times 10^{10}$
<b>Frecuencia</b>			<b><math>3,21 \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>3,29 \times 10^{-1}</math></b>
$10^{-5}$	1000	1132	68	199
	1306	1200	89	113
<b>Promedio</b>	1153	1166	78,5	156
<b>Título</b>	$2,30 \times 10^9$	$2,33 \times 10^9$	$1,57 \times 10^8$	$3,12 \times 10^8$
<b>Frecuencia</b>			<b><math>6,81 \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>1,34 \times 10^{-1}</math></b>
$10^{-3}$	Césped	Césped	Césped	Césped
	Césped	Césped	Césped	Césped
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	-----
<b>Título</b>	$1,80 \times 10^9$	$1,34 \times 10^9$	-----	-----
<b>Frecuencia</b>			-----	-----

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

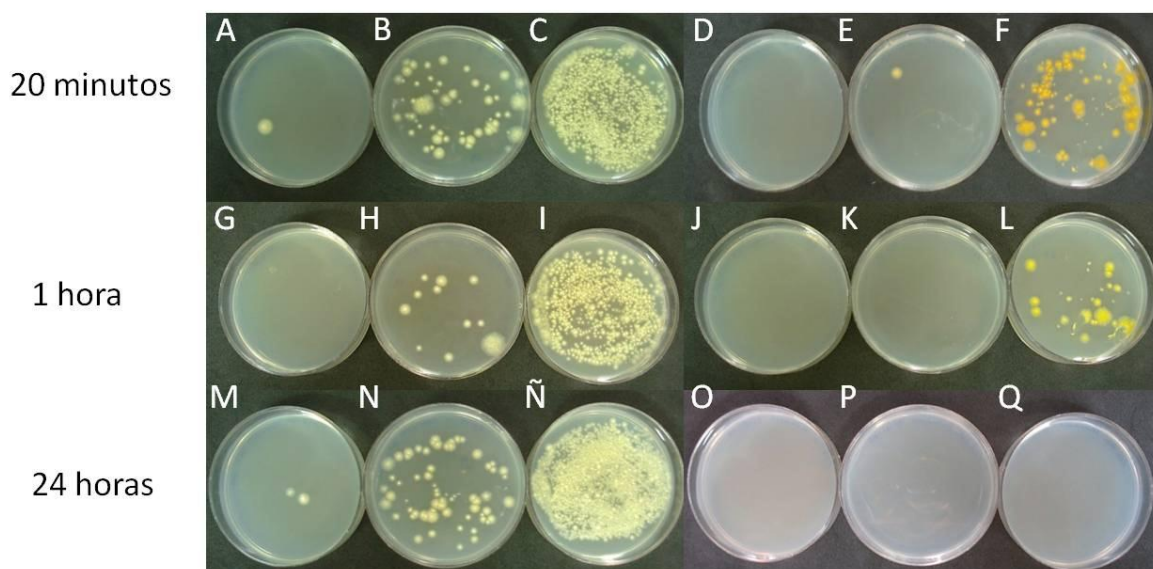


**Anexo 66.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. timonense* (muestra # 16). **A:** control de la dilución  $10^{-7}$ ; **B:** control de la dilución  $10^{-5}$ ; **C:** control de la dilución  $10^{-3}$ ; **D:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; **E:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; **F:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; **G:** control de la dilución  $10^{-7}$ ; **H:** control de la dilución  $10^{-5}$ ; **I:** control de la dilución  $10^{-3}$ ; **J:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; **K:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; **L:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ .

Anexo 67. Ensayo dilución – neutralización con BDBA de *M. marinum* (muestra # 18).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	1	0	2	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	1	0	1	0	0	0
<b>Título</b>	2x10 <sup>8</sup>	0	2x10 <sup>8</sup>	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>0</b>	-----	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	54	10	63	1	0	0
	30	10	60	0	0	0
<b>Promedio</b>	42	10	61,5	0,5	0	0
<b>Título</b>	8,40x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>7</sup>	1,23x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>6</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>				<b>1,19x10<sup>-2</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	95	21	0
	Césped	Césped	Césped	96	28	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	95,5	24,5	0
<b>Título</b>	4x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>8</sup>	1,91x10 <sup>6</sup>	4,90x10 <sup>5</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				<b>2,27x10<sup>-2</sup></b>	<b>2,45x10<sup>-2</sup></b>	<b>&lt;1,63x10<sup>-4</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



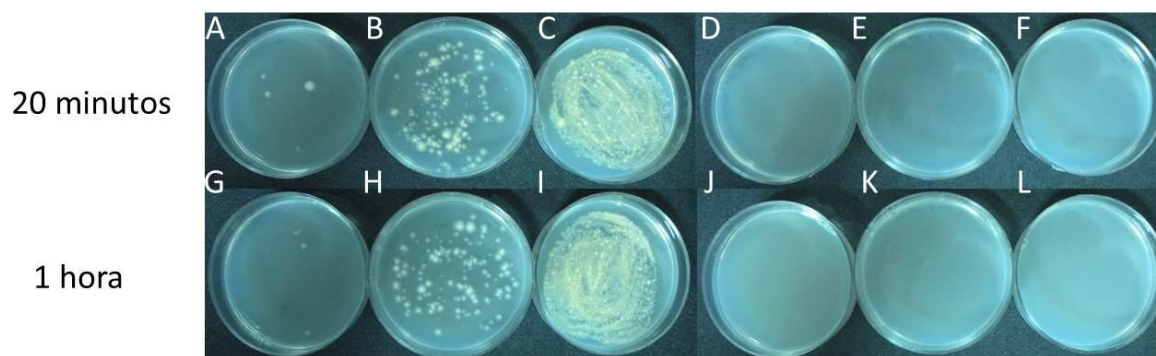
Anexo 68. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. marinum* (muestra # 18). A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; M: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; N: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; Ñ: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; O: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; P: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; Q: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; M: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; N: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; Ñ: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; O: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; P: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; Q: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 69.** Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. marinum* (muestra # 18).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	5	5	0	0
	8	7	0	0
<b>Promedio</b>	6,5	6	0	0
<b>Título</b>	1,30x10 <sup>9</sup>	1,20x10 <sup>9</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	162	158	0	0
	158	145	0	0
<b>Promedio</b>	160	151,5	0	0
<b>Título</b>	3,20x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>8</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	0	0
	Césped	Césped	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	0	0
<b>Título</b>	2x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>7</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>&lt;1,54x10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;1,67x10<sup>-5</sup></b>

(--- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).

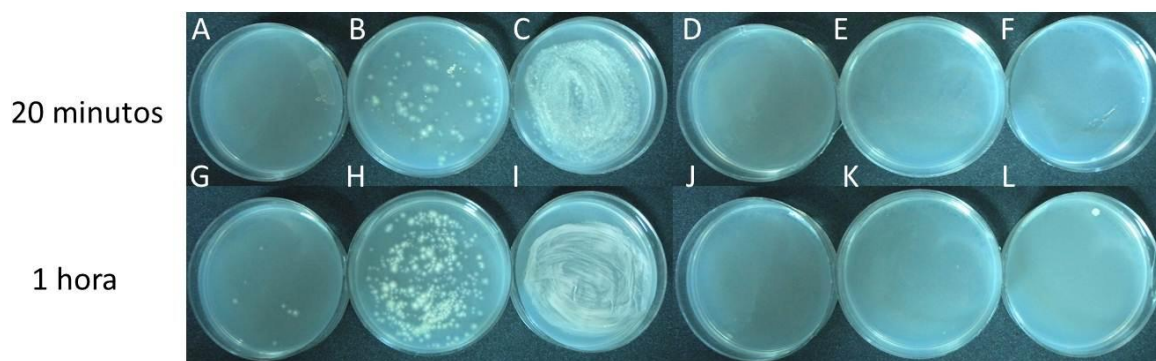


**Anexo 70.** Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 1 resistente de *M. marinum* (muestra # 18). A: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; B: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; C: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; D: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; E: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; F: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; G: control de la dilución 10<sup>-7</sup>; H: control de la dilución 10<sup>-5</sup>; I: control de la dilución 10<sup>-3</sup>; J: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; K: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; L: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

Anexo 71. Ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. marinum* (muestra # 18).

Dilución	Controles		Ensayo	
	20 minutos	1 hora	20 minutos	1 hora
<b>10<sup>-7</sup></b>	5	1	0	0
	8	1	0	0
<b>Promedio</b>	6,5	1	0	0
<b>Título</b>	1,30x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>8</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	51	100	0	0
	85	265	0	0
<b>Promedio</b>	68	182,5	0	0
<b>Título</b>	1,36x10 <sup>8</sup>	3,65x10 <sup>8</sup>	0	0
<b>Frecuencia</b>			<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	0	1
	Césped	Césped	0	0
<b>Promedio</b>	-----	-----	0	0,5
<b>Título</b>	3,40x10 <sup>8</sup>	3,60x10 <sup>8</sup>	0	1x10 <sup>7</sup>
<b>Frecuencia</b>			<b>&lt;1,54x10<sup>-5</sup></b>	<b>5x10<sup>-5</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



Anexo 72. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con CTAP de la colonia 2 resistente de *M. marinum* (muestra # 18). **A:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **B:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **C:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **D:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **E:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **F:** ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>; **G:** control de la dilución 10<sup>-7</sup>; **H:** control de la dilución 10<sup>-5</sup>; **I:** control de la dilución 10<sup>-3</sup>; **J:** ensayo

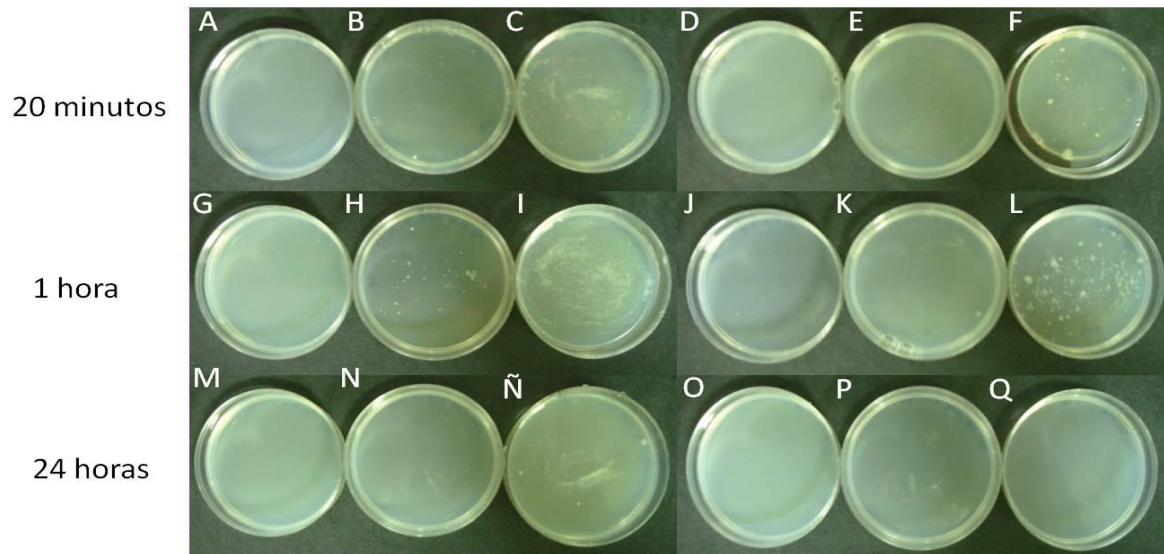


correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup>; **K**: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-5</sup>; **L**: ensayo correspondiente a la dilución 10<sup>-3</sup>.

**Anexo 73.** Ensayo dilución – neutralización con BDBA de *M. bovis* BCG (muestra # 2).

Dilución	Controles			Ensayo		
	20 minutos	1 hora	24 horas	20 minutos	1 hora	24 horas
<b>10<sup>-7</sup></b>	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Título</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Frecuencia</b>				-----	-----	-----
<b>10<sup>-5</sup></b>	67	84	0	2	3	0
	79	90	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	73	87	0	1	1,5	0
<b>Título</b>	1,46x10 <sup>8</sup>	1,74x10 <sup>8</sup>	0	2x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>6</sup>	0
<b>Frecuencia</b>				<b>1,37x10<sup>-2</sup></b>	<b>1,72x10<sup>-2</sup></b>	-----
<b>10<sup>-3</sup></b>	Césped	Césped	Césped	34	368	0
	Césped	Césped	Césped	75	267	2
<b>Promedio</b>	-----	-----	-----	54,5	317,5	1
<b>Título</b>	1,46x10 <sup>9</sup>	1,74x10 <sup>9</sup>	1,53x10 <sup>9</sup>	1,09x10 <sup>6</sup>	6,35x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>4</sup>
<b>Frecuencia</b>				<b>7,47x10<sup>-3</sup></b>	<b>3,65x10<sup>-2</sup></b>	<b>1,31x10<sup>-5</sup></b>

(---- Indica los cálculos que no se pudieron realizar, los números en negritas representan las frecuencias de aparición de resistentes).



**Anexo 74. Registro fotográfico del ensayo dilución – neutralización con BLDBA de *M. bovis* BCG (muestra # 19).**  
**A:** control de la dilución  $10^{-7}$ ; **B:** control de la dilución  $10^{-5}$ ; **C:** control de la dilución  $10^{-3}$ ; **D:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; **E:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; **F:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; **G:** control de la dilución  $10^{-7}$ ; **H:** control de la dilución  $10^{-5}$ ; **I:** control de la dilución  $10^{-3}$ ; **J:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; **K:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; **L:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ ; **M:** control de la dilución  $10^{-7}$ ; **N:** control de la dilución  $10^{-5}$ ; **Ñ:** control de la dilución  $10^{-3}$ ; **O:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$ ; **P:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ ; **Q:** ensayo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$ .