



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS  
NO TUBERCULOSAS BASADO EN EL  
POLIMORFISMO DEL GEN *hsp65* POR  
PCR-RFLP**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**CAROL SISETH MARTÍNEZ CABALLERO**



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente:** Prof. Rodolfo Pastelin Palacios

**Vocal:** Prof. Luciano Hernández Gómez

**Secretario:** Dra. Yolanda López Vidal

**1er Suplente:** Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes

**2do Suplente:** Prof. Estrella Cervantes García

**Sitio en donde se desarrolló el tema:** Programa de Inmunología Molecular Microbiana, 4º piso del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

---

Dra. Yolanda López Vidal  
**Asesor**

---

Dra. Antonia I. Castillo Rodal  
**Supervisor Técnico**

---

Carol Siseth Martínez Caballero  
**Sustentante**

---

---

**AGRADECIMIENTOS:**

Al “Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas” del Macroproyecto “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública”.

El Proyecto fue financiado por SDEI.PTID.05.4. y DGAPA IN225506-2, UNAM.

A la Dra. Yolanda López Vidal por la confianza que me brindó para formar parte de su equipo de investigación, así como por sus enseñanzas, asesoría y apoyo para la realización de esta tesis.

A la Dra. Antonia I. Castillo Rodal por sus consejos, enseñanzas, apoyo y asesoría.

Al Dr. Gonzalo Castillo por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

Al jurado asignado para la evaluación de esta tesis, gracias por su participación y sus comentarios.

---

---

## **DEDICATORIAS:**

*A Dios:* Gracias por permitirme vivir este momento, por estar siempre conmigo, por darme la vida que he tenido y por enseñarme que cada etapa tiene su momento y su porqué.

*A mis padres:* Papá y mamá gracias por ser parte de mi vida, por estar siempre conmigo, por su confianza, apoyo y porque siempre han creído en mí.

*A mis hermanas:* Graciela y Perla gracias por su apoyo y por la maravillosa infancia que vivimos juntas.

*A mi tía Rosario:* Gracias por preocuparte siempre por mi, por brindarme tu apoyo y por ser parte importante en mi vida.

*A Rodrigo:* Por todo el apoyo que me diste, por ser mi amigo y formar parte de mi vida. Gracias por creer en mí.

*A Sara y Marcela:* Gracias por ser mis amigas, por escucharme y por todos los momentos que hemos pasado juntas.

*A todos mis compañeros de la carrera:* Angélica (gracias por tu confianza y apoyo), Norma, Jorge, Ma. Elena, Rodrigo Martínez, Selene, Brenda, Andrea, Jacqueline, Noel,

---

---

Anahíd, Juan, Héctor, Angélica Juárez, Yola, Ara, Ulises, entre otros; gracias por su apoyo y por todos los momentos que pasamos juntos.

*A mis compañeros del Laboratorio:* Mauricio Rodríguez, Mauricio Castañón, Arcelia, Hugo, Martha, Rox, Elizabeth, Paty, Tere, Ileana, Gustavo, Jacqueline, Adriana, Neli, Mari, Karina; gracias por su apoyo, confianza y por hacer del laboratorio un lugar muy agradable.

*A la Universidad Nacional Autónoma de México:* por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios de este país y de toda Latinoamérica.

*A la Facultad de Química:* por la formación académica que recibí. A todos mis profesores muchas gracias por todos sus conocimientos, experiencias y consejos.

---

---

*Damos siempre gracias a Dios por todos vosotros, haciendo memoria de vosotros en nuestras oraciones, acordándonos sin cesar delante del Dios y Padre nuestro de la obra de vuestra fe, del trabajo de vuestro amor y de vuestra constancia en la esperanza en nuestro Señor Jesucristo.*

1 Tes 1:2

---

---

**INDICE**

	Página
Abreviaturas	i
Resumen	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El género <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.1 Características microbiológicas	1
1.1.2 Clasificación	5
1.2 Micobacterias No Tuberculosas	6
1.2.1 Generalidades	6
1.2.2 Clasificación de Micobacterias No Tuberculosas	8
1.2.3 Importancia clínica	9
1.3 Métodos de identificación	14
1.3.1 Métodos convencionales	14
1.3.2 Métodos cromatográficos	18
1.3.3 Métodos moleculares	22
2. Justificación	30
3. Objetivos	31
4. Metodología	32
4.1 Aislamientos de Micobacterias No Tuberculosas	32
4.2 Evaluación de velocidad de crecimiento y formación de pigmento	34
4.3 Estandarización del método de identificación de Micobacterias No Tuberculosas por PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	34
4.3.1 Estandarización de las condiciones de amplificación	34
4.3.2 Estandarización del tiempo de corrimiento en electroforesis para visualización de los fragmentos de restricción	35
4.4. Validación del método de identificación de Micobacterias No Tuberculosas por PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	35
4.5. Identificación de Micobacterias No Tuberculosas por PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	36
4.5.1 Esquema general de trabajo	36
4.5.2 Extracción de ADN micobacteriano por el método de la lisozima-proteínasa k	36
4.5.3 Amplificación (PCR)	37
4.5.4 Digestión enzimática y análisis de los productos de restricción	38
5. Resultados	40
5.1 Frecuencia de MNT en agua subterránea y de re-uso para riego basada en su velocidad de crecimiento y producción de pigmento	40
5.2 Estandarización del método de identificación de MNT por PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	41



5.2.1 Condiciones de amplificación	41
5.2.2 Tiempo de corrimiento de electroforesis	43
5.3 Validación del método de identificación de Micobacterias No Tuberculosas por PCR- RFLP del gen <i>hsp65</i>	44
5.4 Identificación de MNT por PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	47
6. Discusión	51
7. Conclusiones	59
8. Perspectivas	60
9. Bibliografía	61

## ABREVIATURAS

MNT	Micobacterias No Tuberculosas
<i>hsp</i>	Proteína de choque térmico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
G	Guanina
C	Citosina
µm	Micrometros ( $1 \cdot 10^{-6}$ metros)
°C	Grados Celsius
MAC	Complejo <i>M. avium-M. intracellulare</i>
MOTT	Micobacterias diferentes al bacilo de la tuberculosis
ATS	Sociedad de Toráx Americana
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
AAR	Ácido alcohol resistencia
TLC	Cromatografía en capa fina
GLC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
UV	Luz ultravioleta
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
Da	Dalton
BCG	Bacilo de Calmette y Güerin
pb	Pares de bases
ATCC	American Type Cultura Collection
ZMCM	Zona Metropolitana de la Ciudad de México
rpm	Revoluciones por minuto
min	minutos
mL	mililitros
SDS	Dodecil sulfato de sodio
CPC	Cloruro de cetil piridinio
LJ	Lowenstein-Jensen
ZN	Ziehl-Neelsen
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
M7H10	Middlebrook 7H10
M7H9	Middlebrook 7H9
DO	Densidad óptica
mM	milimolar
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
pmol	picomol
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
V	Volts
MPM	Marcador de peso molecular

## RESUMEN

**Antecedentes:** Las MNT incluyen todas aquellas especies de micobacterias que no forman parte del complejo *M. tuberculosis*. Son ubicuas y están distribuidas en una gran variedad de ecosistemas en regiones templadas y tropicales. Estas se caracterizan por un menor poder patógeno que varía de especie a especie comparado con las del complejo *M. tuberculosis*, pudiendo ser oportunistas o simplemente saprofitas. Debido al gran número de MNT hasta ahora conocidas se ha hecho impredecible contar con un método de identificación que pueda diferenciar a estas micobacterias a nivel especie. Existen diferentes técnicas de identificación micobacteriana como pruebas bioquímicas, cromatografía de gases y líquidos; así como técnicas moleculares que incluyen la secuenciación del gen ARNr *16S* o PCR-RFLP del gen *hsp65*.

**Objetivo:** Realizar la identificación de MNT aisladas de muestras de agua para uso y consumo humano y de re-uso para riego mediante el análisis del polimorfismo del gen *hsp65* por PCR-RFLP.

**Metodología:** Se partió de una colección de aislamientos del Laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM provenientes de muestras de agua subterránea (ZMCM) y agua de re-uso para riego (canales de Xochimilco). Los cuales se identificaron amplificando un fragmento de aproximadamente 441 pb del gen *hsp65*, para realizar una digestión enzimática con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*, finalmente los fragmentos de restricción se separaron utilizando geles de agarosa al 3%. La validación se realizó utilizando el mismo tratamiento a cepas provenientes del ATCC.

**Resultados:** Algunas de las especies que se identificaron fueron *M. nonchromogenicum*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. flavescens*, entre otras; siendo algunas de ellas consideradas como patógenos potenciales en el desarrollo de enfermedad. Los patrones de digestión obtenidos experimentalmente fueron muy semejantes a los reportados en el algoritmo de interpretación utilizado. Para la mayor parte de los aislamientos las características fenotípicas coincidieron con las especies reportadas.

**Conclusiones:** El análisis del polimorfismo del gen *hsp65* para la identificación de MNT demostró ser una buena alternativa, ya que en comparación con otros métodos convencionales o moleculares una vez que se ha estandarizado es más rápida y sencilla. Dicha técnica puede llegar a presentar problemas en la interpretación de los resultados, pero al auxiliarse en las características fenotípicas de los aislamientos proporciona un mayor poder de discriminación.

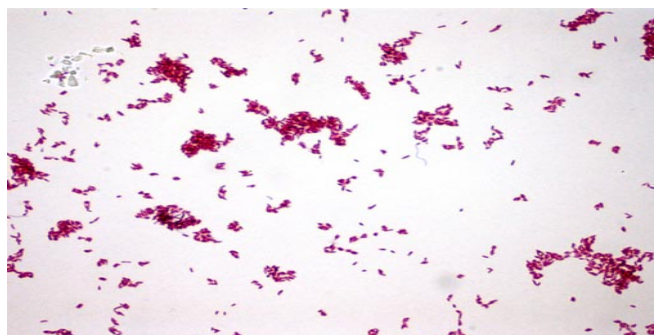
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El género *Mycobacterium*

#### 1.1.1 Características microbiológicas

El género *Mycobacterium* se encuentra constituido por bacterias que pertenecen al orden *Actinomycetales* y a la familia *Mycobacteriaceae*. Las especies de este género presentan un elevado contenido de G+C (61-71%) en su ADN, siendo esta característica compartida por otros géneros relacionados que también poseen ácidos micólicos en la pared celular, como son *Gordona*, *Tsukamurella*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (17).

El género *Mycobacterium* está integrado por bacterias pleomórficas (curvas y/o rectas), miden de 0.2 o 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2 a 7  $\mu\text{m}$  de largo, no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula (Figura 1) (19).



**Figura 1.** *Mycobacterium* sp. Tinción de Ziehl Neelsen.

Las micobacterias, poseen una pared celular gruesa con un elevado contenido lipídico que constituye el 60% del peso seco de la misma (Figura 2). Esta pared consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina o glicina en el caso de *M. leprae*. Esta capa da rigidez y forma a la bacteria. La segunda capa esta

constituída por arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa la cual esta formada por ácidos grasos de cadena larga (60 a 90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como la trehalosa 6,6'-dimicolato. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficiencia de múltiples agentes antimicrobianos, así como la característica de ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomana, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (7, 15, 17).

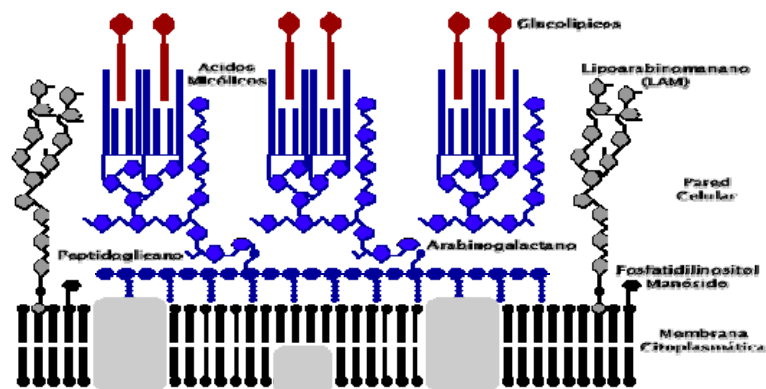


Figura 2. Esquema de la envoltura celular del género *Mycobacterium* (Infection and Immunity. Marzo de 1996)

#### ◆ Condiciones de incubación

Las micobacterias son aerobias estrictas, aunque hay algunas que crecen en bajas tensiones de  $O_2$ . Su incubación adecuada incluye la necesidad de proporcionarle ambientes húmedos con 5 a 10% de  $CO_2$  (19).

La gran mayoría de las micobacterias de interés clínico son de crecimiento lento con un tiempo de generación de 15 a 18 horas en condiciones favorables. De ahí que son necesarias de 1 a 3 ó más semanas de incubación para obtener un crecimiento apreciable en los medios de cultivo convencionales. No obstante existe un grupo de micobacterias de crecimiento rápido (menos de 7 días) cuya característica permite, entre otras cosas, diferenciarlas del resto (17).

Aunque la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las micobacterias es de 35 a 37° C, algunas especies precisan temperaturas de 30° C (*M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*), 42° C (*M. xenopi*) o 52° C (*M. thermoresistible*) para obtener una mejor tasa de crecimiento (17).

#### ◆ Cultivo microbiológico

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas continúa siendo fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos, ya que permite la identificación de la especie, la realización de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, el seguimiento del tratamiento y curación del paciente (Figura 3).

#### Medios de cultivo sólidos

Se dividen en dos grupos básicos: medios a base de huevo y medios con agar.

- Medios sólidos a base de huevo

Son medios ricos que contienen huevo (entero o sólo yema), fécula de papa, sales minerales, glicerol y un agente inhibidor de la flora acompañante como

es el verde de malaquita. Las ventajas fundamentales radican en la buena recuperación de gran parte de las especies micobacterianas y su capacidad inhibidora de la flora contaminante. El medio más utilizado es el Löwenstein-Jensen, aunque existen otros como Coletso y Ogawa Kudoh (50).

- Medios sólidos con agar

Estos medios sintéticos, como el Middlebrook 7H10 y 7H11, son translúcidos y permiten una detección temprana del crecimiento micobacteriano (10-12 días). Además de que son utilizados para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (17).

#### Medios líquidos

En general, son medios muy enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y de manera más rápida que los medios sólidos. Por ello se aconseja incluirlos siempre para el aislamiento primario de muestras clínicas. Además estos medios se utilizan como base para diversas pruebas de identificación bioquímica y de sensibilidad a los antimicrobianos. Por otro lado, tienen la desventaja de no visualizar la morfología de la colonia ni valorar los posibles cultivos mixtos como sucede con los medios Middlebrook 7H9, Dubos, Youmans, Proskauer-Beck, entre otros (17).

#### Medios bifásicos

El medio más conocido es el sistema Septi-Check que consiste en una botella con un medio líquido (Middlebrook 7H9) con suplementos de antibióticos y enriquecimiento, al que se le añade en la parte superior de la botella diversos medios sólidos (agar

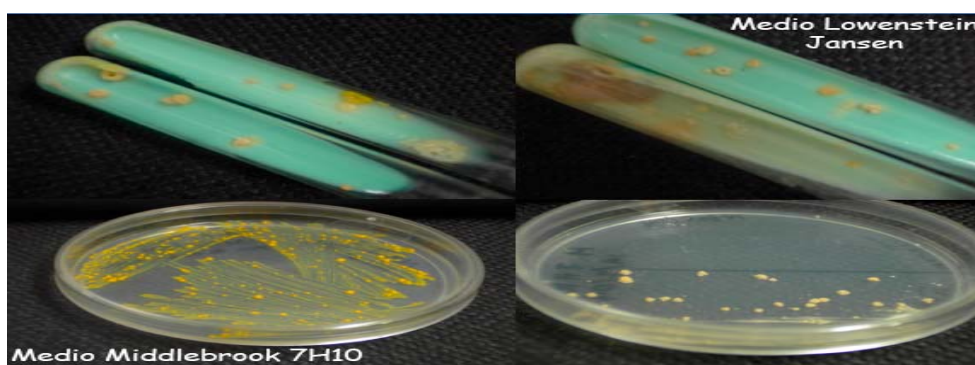
chocolate, Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 ó 7H11). Esto permite distinguir las contaminaciones y los cultivos mixtos (40).

### Medios selectivos

Son medios no rutinarios con o sin huevo que contienen agentes inhibitorios para otras bacterias (penicilina, polimixina, lincomicina, ácido nalidíxico, cicloheximida y anfotericina) a los que *Mycobacterium* es resistente (19).

### Medios especiales

Algunas micobacterias requieren enriquecimientos especiales, como ocurre con *M. haemophilum* o *M. genavense* que requieren de suplementos especiales como son micobactina, hemina u otros componentes férricos. Un caso especial es *M. leprae* que sólo es capaz de crecer en cultivos de células de armadillo (17).



**Figura 3.** Cultivo de micobacterias en medios Löwenstein-Jensen y Middlebrook 7H10

### 1.1.2 Clasificación

Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito 117 especies (48), sin embargo con fines prácticos se clasifica en base a su importancia clínica y tipo de enfermedades producidas:



1. Importancia clínica: a) Patógenos obligados en humanos y animales, por ejemplo el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti* y más recientemente se han propuesto las especies *M. pinnipedii* y *M. caprae*) (28), *M. leprae* y *M. lepraemorium*. b) Micobacterias que son potencialmente patógenas en humanos y animales; la mayoría de estas especies han sido aisladas de ambientes terrestres, acuáticos, de animales e infecciones en humanos y son capaces de causar enfermedad bajo ciertas circunstancias como traumatismo en piel, enfermedades pulmonares (Enfermedad Pulmonar obstructiva Crónica o Fibrosis Quística), deficiencia en el sistema inmune y enfermedades crónicas como la Diabetes, las micobacteria que se aislan con frecuencia son parte del complejo *M. avium* (MAC). c) Especies saprofitas que no son patógenas o son patógenas excepcionales (48).

2. Enfermedades producidas: a) La tuberculosis producida por micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. b) La lepra, causada por *M. leprae*. c) Las micobacteriosis, que están producidas por el resto de micobacterias distintas de las anteriores, denominadas Micobacterias no Tuberculosas (17).

## **1.2 Micobacterias no tuberculosas (MNT)**

### 1.2.1 Generalidades

Las micobacterias no tuberculosas han recibido a lo largo de los años diferentes nombres como micobacterias atípicas (término concedido por Pinner en 1935), anónimas, no clasificadas, ambientales, oportunistas, micobacterias diferentes al bacilo

de la tuberculosis (MOTT) y Micobacterias no tuberculosas (MNT), (término acuñado por la Sociedad de Tórax Americana (ATS), (22).

Las MNT incluyen todas aquellas especies de micobacterias que no forman parte del complejo *M. tuberculosis*. Son ubicuas y están distribuidas en una gran variedad de ecosistemas en regiones templadas y tropicales (35). Estas se caracterizan por una menor capacidad patógena que varía de especie a especie comparado con las del complejo *M. tuberculosis*, siendo las MNT oportunistas o simplemente saprofitas. El reservorio de las MNT es ambiental ya que han sido aisladas de polvo, suelo y agua (dulce y/o salada) y se sugiere que la transmisión es por ingestión, inhalación e inoculación de fuentes ambientales ya que hasta el momento no se ha demostrado la transmisión de persona a persona (48).

Existen diversos reportes que han evidenciado la presencia de micobacterias en agua para uso y consumo humano, en sistemas de agua de hospitales y clínicas, suministros de agua en centros de hemodiálisis, sistemas industriales de agua caliente, máquinas de hielo, piscinas, construcciones para suministros de agua dañados (1). Las especies *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* y *M. xenopi* han sido las micobacterias con mayor frecuencia encontradas en agua para uso y consumo humano (48).

La exposición continua de las micobacterias a desinfectantes como el cloro y otros químicos de uso frecuente para el tratamiento de agua o material quirúrgico ha dado como resultado resistencia a diversos descontaminantes, siendo capaces de colonizar

una amplia variedad de superficies en tuberías o conductos de diferente material en hospitales, fábricas y áreas residenciales (1). Phillips y col. (35), evidenciaron una gran densidad de MNT en superficies de plásticos y caucho en tuberías de distribución de agua potable comparado con otros materiales.

La pared celular gruesa con alto contenido en lípidos hace a las micobacterias más resistentes a su muerte por desinfección con cloro, temperatura elevada y luz ultravioleta comparada con otras bacterias patógenas que colonizan el agua potable. Además, las MNT frecuentemente forman biopelículas que cubren la superficie interna de los tubos de los sistemas de distribución de agua y tanques de almacenamiento (35). Una biopelícula es una comunidad microbiana caracterizada por células que son unidas a un substrato o interfase, éstas células son incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellas mismas y que muestran un fenotipo alterado; así como su tasa de crecimiento y transcripción genética (48). Las biopelículas mantienen el crecimiento bacteriano y protegen al microorganismo, lo que trae como consecuencia la difícil erradicación de las micobacterias de los sistemas de tratamiento de agua potable. La efectividad de los desinfectantes contra las micobacterias dependerá de la composición y concentración del agente activo, presencia de materia orgánica, tiempo de contacto, resistencia del microorganismo y duración de la potencia del desinfectante (35).

Además del agua como principal medio de distribución de las MNT, se ha observado que los insectos y protozoarios pueden servir como vectores de dichas micobacterias (1).

### 1.2.2 Clasificación de MNT

En los últimos 50 años se han propuesto diferentes clasificaciones para las micobacterias. La clasificación más popular continúa siendo la propuesta por Runyon en 1959, basada en la velocidad de crecimiento y la capacidad de las micobacterias para sintetizar un pigmento no hidrosoluble, de color amarillo-naranja brillante que se presenta dependiendo de su incubación en presencia o ausencia de luz (Tabla 1) (46).

La clasificación de Runyon propone cuatro grupos, que son:

**GRUPO I: FOTOCROMÓGENOS.** A este grupo pertenecen las MNT cuyas colonias producen pigmento cuando se les ha incubado en presencia de luz. La especie representante es *M. kansasii*, cuya frecuencia en la enfermedad infección pulmonar suele igualar o superar a la de *M. tuberculosis* en algunas zonas geográficas.

**GRUPO II: ESTOCROMÓGENOS.** Se encuentra integrado por las MNT que producen pigmento tanto en presencia como en ausencia de luz. Su especie más relevante es *M. scrofulaceum*.

**GRUPO III: NO CROMÓGENOS.** Incluye a las MNT que no sintetizan pigmento. Su especie más representativa es *M. intracellulare*.

**GRUPO IV: DE CRECIMIENTO RÁPIDO.** Agrupa a las micobacterias cuyas colonias aparecen dentro de los primeros 7 días de incubación. Su representante de mayor relevancia en salud pública es *M. fortuitum* (19).

### 1.2.3 Importancia clínica

Las MNT colonizan, persisten, se replican y causan infecciones en humanos. Las enfermedades por estas micobacterias son llamadas micobacteriosis (22). La presentación clínica dependerá de la especie de MNT involucrada, ruta de infección y de las condiciones médicas de base que presente cada individuo (infecciones quirúrgicas, pacientes inmunocomprometidos, infecciones relacionadas a hemodiálisis, etc.) (35).

**Tabla 1.** Clasificación de Runyon de algunas especies de MNT, patogenicidad y frecuencia de aislamiento.

CLASIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS				
GRUPO RUNYON	DEFINICIÓN	ESPECIES	PATOGENICIDAD	FRECUENCIA DE AISLAMIENTO
I	Crecimiento lento y fotocromógenos: formación de pigmento amarillo si se expone a la luz	<i>M. kansasii</i>	generalmente patógenos	Frecuente
		<i>M. marinum</i>		Raro
II	Crecimiento lento y escotocromógenos: formación pigmento amarillo, naranja a rojo, si se expone a la luz y también en la oscuridad	<i>M. gordonae</i>	No patógeno	Frecuente
		<i>M. szulgai</i>	generalmente patógeno	Raro
III	Crecimiento lento y no cromógenos: pigmentación muy lenta o ausente	Complejo <i>M. avium – intracellulare*</i>	Patógeno	Frecuente
IV	Micobacterias de crecimiento rápido	<i>M. fortuitum**</i> <i>M. chelonae**</i>	A veces patógeno	Frecuente

\* También se conoce como complejo MAIS: *M. avium – intracellulare - scrofulaceum*

\*\* También se conoce como complejo *M. fortuitum – chelonae*

La distribución de las MNT y la incidencia de las enfermedades causadas por estas no son completamente conocidas en el mundo, aunque de las especies de MNT hasta ahora conocidas, cerca de una tercera parte es asociada con enfermedades en humanos (22). El complejo MAC (*M. avium* y *M. intracellulare*), *M. kansasii*, y miembros del complejo *M. fortuitum* son los agentes causantes del mayor porcentaje de infecciones

por MNT. Otras especies de MNT raramente causan infección a pesar de su prevalencia en el ambiente; como *M. gordonae* aislada prácticamente en todo tipo de agua (34).

El estado inmunológico de los individuos es un factor decisivo en las infecciones por MNT, sujetos inmunocompetentes están expuestos constantemente a las MNT y su sistema inmune es capaz de controlar eficientemente esta exposición. En caso de que se desarrolle la enfermedad (en cualquier órgano), esta es localizada como la linfadenitis, infecciones de tejido blando, infecciones en articulaciones y huesos, úlceras en piel y con tratamiento adecuado la infección es fácilmente controlada, mientras que en sujetos inmunocomprometidos las enfermedades son localizadas o diseminadas y de difícil control, siendo dichas infecciones una importante causa de morbilidad y mortalidad en países occidentales (22).

Las MNT han sido asociadas a enfermedades ocupacionales como en trabajadores expuestos a aerosoles generados en el molido de metales lo que les causa hipersensibilidad, neumonitis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (39).

Las pseudo-epidemias y epidemias nosocomiales causadas por MNT han sido asociadas a la contaminación de abastecimientos de agua en hospitales (6), ya que numerosas especies de MNT, especialmente las de rápido crecimiento han causado diferentes patologías como abscesos cutáneos, infecciones renales en el tratamiento de hemodiálisis, infecciones respiratorias en sujetos con padecimientos pulmonares crónicos, todos relacionados al uso de agua potable o a soluciones acuosas contaminadas (35).

En pacientes sanos los casos de infección diseminada ocurren después de la inyección con soluciones contaminadas. Infecciones diseminadas cutáneas por *M. chelonae* han ocurrido en mujeres inmunocompetentes después de la inyección de células embrionarias bovinas. Las infecciones en pacientes con cirugía fueron reportadas en una gran variedad de sitios. El uso de soluciones acuosas contaminadas y esterilizaciones o desinfección de equipo quirúrgico inadecuados son frecuentemente factores responsables de las infecciones (35).

Las infecciones por MNT incrementaron en incidencia e importancia clínica durante la década pasada, lo cual en parte es explicado, por el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento microbiológico, detección e identificación por técnicas moleculares, así como la experiencia clínica (Tabla 2) (17). Algunas enfermedades clínicas causadas por MNT son frecuentemente indistinguibles de las causadas por el complejo *M. tuberculosis* y por lo tanto es importante su rápida y precisa identificación, ya que existen diferencias con respecto a su tratamiento (10, 18, 26, 42).

El criterio de diagnóstico y tratamiento es generalmente el mismo para todas las especies de MNT (8); debido a que la epidemiología de las infecciones producidas por estas es pobremente conocida por la falta de datos con respecto a los reservorios primarios, cuadro clínico y conocimiento de la fisiopatología de cada especie micobacteriana (1). Por lo tanto una rápida y precisa diferenciación entre las especies de micobacterias debe ser un prerrequisito para la evaluación de su patogenicidad (20).

En algunos laboratorios clínicos se ha evidenciado que, la presencia de MNT en el agua de la llave, causa falsos positivos en diagnósticos histopatológicos al observar la

presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes; causando un problema en el control de calidad de exámenes clínicos, especialmente los histológicos (6).

**Tabla 2.** Micobacterias no tuberculosas de reciente aparición y potencialmente patógenas (17).

<b>Especie (año)</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Afectación clínica</b>
<i>M. branderi</i> (1995)	Muestras respiratorias	Enfermedad pulmonar, tenosinovitis ulcerativa
<i>M. heidelbergense</i> (1997)	Ganglios linfáticos	Linfadenitis cervical en niños
<i>M. lacus</i> (2002)	Agua, tejido sinovial	Bursitis postraumática
<i>M. triplex</i> (1996)	Espudo, LCR, ganglios linfáticos	Enfermedad pulmonar crónica, infección diseminada en SIDA, linfadenitis cervical en niños
<i>M. bohemicum</i> (1998)	Espudo, ganglios linfáticos, agua	Linfadenopatía en niños
<i>M. celatum</i> (1993)	Muestras respiratorias, ganglios linfáticos	Enfermedad pulmonar, enfermedad diseminada en SIDA, linfadenopatía en niños
<i>M. conspicuum</i> (1995)	Espudo, líquido pleural, piel, heces, sangre	Enfermedad diseminada en inmunodeprimidos
<i>M. heckeshornense</i> (2000)	Espudo, biopsia de pulmón	Enfermedad pulmonar (cavitación e infiltrado)
<i>M. interjectum</i> (1993)	Ganglios linfáticos	Linfadenitis cervical crónica en niños
<i>M. lentiflavum</i> (1996)	Ganglios linfáticos, esputo, aspirado gástrico, biopsia disco vertebral, orina, sangre	Linfadenitis cervical en niños, enfermedad pulmonar cavitada, espondilodiscitis, infección diseminada (SIDA)
<i>M. palustre</i> (2002)	Espudo, ganglios linfáticos, agua	Linfadenopatía en niños
<i>M. tusciae</i> (1999)	Ganglios linfáticos, agua	Linfadenitis cervical en niños inmunodeprimidos
<i>M. intermedium</i> (1993)	Espudo	Bronquitis crónica en inmunodeprimidos
<i>M. bonickei</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de heridas postraumáticas
<i>M. brisbanense</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de heridas postraumáticas
<i>M. goodii</i> (1999)	Exudados, biopsias, muestras respiratorias	Celulitis, bursitis, osteomielitis, infecciones de heridas postraumáticas, infección quirúrgica, infección pulmonar crónica
<i>M. houstonense</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de herida postraumáticas
<i>M. immunogenum</i>	Sangre, exudados, muestras	Infecciones relacionadas con catéter,



(2001)	respiratorias, raspado corneal, líquido sinovial,	infección diseminada, queratitis, infección respiratoria, artritis
<i>M. mageritense</i> (1997)	Espujo, sangre, exudados	Infecciones quirúrgicas y de catéter, sinusitis grave
<i>M. neworleansense</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de herida postraumáticas
<i>M. septicum</i> (2000)	Sangre	Bacteriemia relacionada con catéter
<i>M. wolinskyi</i> (1999)	Exudados, biopsias	Celulitis, osteomielitis, infecciones de heridas quirúrgicas

### 1.3 Métodos de identificación

#### 1.3.1 Métodos convencionales

##### a) Microscopia

En los últimos años la micobacteriología ha experimentado importantes avances tecnológicos y a pesar de ello el diagnóstico presuntivo de infección por micobacterias se sigue apoyando en el examen microscópico de las muestras clínicas teñidas de manera adecuada. En la actualidad, es el procedimiento más simple, barato y rápido en proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar (17).

##### Tinciones

Las micobacterias son microorganismos difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales. Para lograr la penetración del colorante primario al interior de la micobacteria se debe recurrir al calor o a determinados detergentes según el método utilizado. Una vez dentro, el colorante no podrá ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido o ácidos minerales. Esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y es útil para la visualización de este grupo específico de bacterias. Además, los componentes de la pared celular de las micobacterias son capaces de formar complejos estables con ciertos colorantes arilmetanos como la fucsina o la auramina O (17).

### Sensibilidad y especificidad

La microscopía presenta una sensibilidad inferior al cultivo, oscilando entre un 22% y un 80%. Existen diversos factores condicionantes que intervienen en la misma: a) Tipo de muestra; b) Volumen de muestra procesada; c) Concentración de bacterias en la muestra; d) Tipo de tinción utilizada y e) Experiencia del observador (17).

Por otro lado, no hay que olvidar que existen otros microorganismos que presentan diferentes grados de AAR como son: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei* y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora* (17).

### b) Cultivo

Se basa en la velocidad de crecimiento y las características macroscópicas de las colonias (17).

### c) Pruebas bioquímicas

El número de estas pruebas es muy amplio, lo que origina muchos problemas de interpretación de las mismas. En 1992 se propusieron los requisitos mínimos para la definición de especies de **micobacterias de crecimiento lento**. Entre estos requisitos se encuentra un número limitado de pruebas bioquímicas entre las que se encuentran: la catalasa semicuantitativa y termotolerancia de la misma, hidrólisis del Tween 80, ureasa, producción de niacina, reducción de nitratos, actividad fosfatasa ácida, actividad arilsulfatasa, pirazinamidasa, e esterasa, resistencia a la isoniacida, crecimiento a la hidrazida del ácido 2-tiofeno carboxílico (T2H), a hidroxilamina, ácido *p*-nitrobenzoico, NaCl, tiacetazona, picrato y oleato, así como la capacidad de crecer a diversas temperaturas (Tabla 3) (17)

**Tabla 3.** Identificación bioquímica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes (17).

Especie	NIA	NIT	AS	Tw80	URE	NaCl	C-SQ	C-68°	INH 1	INH 10	HIDRO	P-NB	OLE	PZA	22° C	30° C	37° C	42° C	PIGMENTO
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	NO
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	V	-	-	-	+	V	+	V	-	-	+	+	V	-	NO
<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	+	-	+	+	+	+	NO
<i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	-	NO
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	V	V	+	+	+	+	V	NO
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	+	+	-	NO
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-	+	ND	+	+	+	-	-	NO
<i>M. celatum</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	ND	ND	-	+	+	+	NO
<i>M. terrae</i>	-	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	-	NO
<i>M. triples</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	NO
<i>M. triviale</i>	-	+	-	V	-	+	+	+	+	+	ND	+	ND	-	+	+	+	-	NO
<i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	+	V	NO
<i>M. microti</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	+	-	NO
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+	V	-	-	V	+	-	V	+	-	+	+	+	+	-	NO
<i>M. kansasii</i>	-	+	V	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	FOTO
<i>M. marinum</i>	-	-	V	+	+	-	V	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	V	-	FOTO
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	+	-	+	-	+	+	+	-	FOTO
<i>M. simiae</i>	v	-	-	-	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	+	FOTO
<i>M. lentiflavum</i>	-	-	-	-	-	ND	V	V	+	ND	+	+	V	V	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. scrofulaceum</i>	-	V	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	ESCOTO
<i>M. gordonae</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	V	+	V	-	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	+	-	V	+	+	ESCOTO
<i>M. szulgai</i>	-	+	-	V	+	-	+	+	-	ND	-	+	+	+	+	+	+	-	ESCOTO

NIA: Niacina; NIT: Nitratos; AS: Arilsulfatasa (3 días); Tw80: Tween 80; URE: Ureasa; NaCl: NaCl 5%; C-SQ: Catalasa semicuantitativa; C-68°: Catalasa termoestable (68° C); INH 1: Isoniacida 1 µg/ml; INH 10: Isoniacida 10 µg/ml; HIDRO: Hidroxilamina; P-NB: ácido p-nitrobenzoato; OLE: Oleato; PZA: Pirazinamidasa; 22° C, 30° C, 37° C, 42° C: Temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: no determinado; FOTO: Fotocromógeno; ESCOTO: Escotocromógeno; NO: No cromógeno.

En el caso de las **micobacterias de crecimiento rápido**, la variabilidad de los resultados dentro de una misma especie (o la falta de la misma entre distintas especies) hace inútiles muchas de estas pruebas para su identificación. Recientemente se ha propuesto un esquema de identificación para las especies no pigmentadas de crecimiento rápido basado fundamentalmente en la capacidad de crecer en medios con determinados azúcares como única fuente de carbono. Sin embargo, este esquema no es válido para el amplio grupo de MNT de crecimiento rápido pigmentadas, ya que la variabilidad de los resultados hace virtualmente imposible una caracterización correcta, debiendo recurrirse a técnicas moleculares (Tabla 4) (17).

**Tabla 4.** Identificación bioquímica de las micobacterias de crecimiento rápido más frecuentes (17).

	AS	NaCl	McC	Captación de hierro	Manitol	Inositol	Sorbitol	Citrato	Nitratos	30°	37°	42°	Pigmento
<i>M. thermoresistibile</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	ESCOTO
<i>M. aurum</i>	V	V	-	+	+	+	-	+	V	+	+	-	ESCOTO
<i>M. neoaurum</i>	-	ND	-	ND	+	+	ND	+	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. gadium</i>	-	ND	ND	-	ND	+	+	-	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. flavescens</i>	-	+	-	-	V	-	+	-	+	+	+	V	ESCOTO
<i>M. novocastrense</i>	-	+	+	-	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	FOTO
<i>M. alves</i>	+	-	-	-	-	-	ND	-	+	+	+	+	NO
<i>M. brumae</i>	-	-	-	+	-	+	ND	+	+	+	+	-	NO
<i>M. elephantis</i>	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	+	+	NO
<i>M. porcinum</i>	+	+	ND	ND	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. peregrinum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	NO
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	NO
<i>M. boenickei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. houstonense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NO
<i>M. neworleansense</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. brisbanense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NO
<i>M. mucogenicum</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	V	+	+	-	NO
<i>M. mageritense</i>	+	+	+	V	+	V	ND	V	V	+	+	+	NO
<i>M. canariense</i>	+	-	+	-	+	+	ND	-	-	+	+	-	NO
<i>M. abscessus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	NO
<i>M. chelonae</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	NO
<i>M. immunogenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	NO
<i>M. septicum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. smegmatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. wolinskyi</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	NO
<i>M. goodii</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	NO/ESCOTO

AS: Arilsulfatasa (3 días); NaCl: crecimiento en 5% de NaCl; McC: crecimiento en agar de McConkey sin cristal violeta; 30° C, 37 °C y 42° C: temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: No determinado; ESCOTO: Escotocromógeno; FOTO: Fotocromógeno; NO: No cromógeno.

El alcance de las pruebas bioquímicas dependerá de la fácil caracterización y actividad bioquímica de la micobacteria en estudio (8), ya que la ineficiencia de las pruebas bioquímicas para la identificación micobacteriana sugiere que las especies de MNT genéticamente distintas tienen un perfil bioquímico igual o similar (34).

Otros aspectos negativos de estas técnicas son la necesidad de un gran inóculo (cultivos muy crecidos) y la lentitud en la obtención de resultados, usualmente están limitadas por la variabilidad en el fenotipo, falta de reproducibilidad y el lento crecimiento de algunas micobacterias (12). Sin embargo la realización de pruebas bioquímicas no es un hecho obsoleto en el laboratorio de bacteriología. La aplicación de algunas pruebas bioquímicas relativamente sencillas permitiría, en este caso, conseguir

la identificación de especie, además de ser baratas, sencillas y que no se requiere un gran equipo comparado con otras técnicas (17).

La identificación de las micobacterias mediante pruebas bioquímicas exige experiencia y el conocimiento de su fundamento. Además, debe tenerse en cuenta que la identificación no se apoya sólo en una prueba, por muy específica que parezca sino en los resultados coherentes de un conjunto de ellas (17).

### 1.3.2 Métodos cromatográficos

Los ácidos micólicos son  $\alpha$ -alquil  $\beta$ -hidroxiácidos de cadenas largas que constituyen la mayor parte del contenido lipídico de la pared celular de las micobacterias. Estos difieren en el número de átomos de carbono (60 a 90) y en la presencia de diferentes grupos funcionales. Los patrones de los ácidos micólicos en la pared celular varían dependiendo de la especie, por lo que su análisis ha sido usado para la identificación de micobacterias (46). Existen tres tipos de técnicas cromatográficas utilizadas en la identificación: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En todas ellas se obtiene la muestra adecuada a partir de la cepa, después de una extracción y separación de los lípidos del resto de componentes celulares y de un tratamiento que posibilite su migración o volatilidad. En general son técnicas que permiten la identificación de especie, en un periodo razonablemente rápido (1-2 días) (17).

a) Cromatografía en capa fina (TLC)

Es la de menor capacidad de discriminación, y por tanto, escasamente utilizada. Los extractos de las muestras se depositan en placas de cristal o de aluminio, que actúan de soporte de una capa de gel de sílice y se someten a un proceso de difusión utilizando uno o dos eluyentes. Posteriormente, se revelan evidenciando de 1 a 3 manchas cromatográficas que definen patrones de migración de seis tipos de ácidos micólicos (I-VI) (17, 46).

El principal inconveniente es que es una técnica con baja discriminación, sobre todo para las especies de crecimiento lento. Así, especies como *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* y *M. tuberculosis* comparten el mismo patrón. Su principal ventaja es la fácil estandarización y la necesidad de una infraestructura mínima (17).

b) Cromatografía de gases (GLC)

Permite la detección cualitativa de metil-ésteres de ácidos grasos de los ácidos micólicos. Consiste en la inyección de la muestra previamente tratada en un cromatógrafo equipado con una columna capilar o semicapilar. La muestra, volatilizada por efecto de la temperatura de inyección, viaja con un gas transportador a través de la columna, que a su vez no es inerte, sino que consta de un relleno interior, la fase estacionaria, capaz de interaccionar con diversos componentes de la muestra, de forma que sustancias que no interesen queda retenidas en la columna (17, 46).

En la identificación de micobacterias, los ácidos grasos son los productos a analizar. En la columna se separan según la longitud de su cadena, siendo al final expulsados en orden de menor a mayor tamaño. Un sistema de detección permite establecer el tiempo de retención que cada ácido graso ha tenido en el interior de la columna. Los resultados

se registran en forma de una línea continua interrumpida por picos, de mayor o menor amplitud o altura dependiendo de su concentración y rapidez de salida, indicando cada uno a un ácido graso. Todos los picos de una muestra constituyen su cromatograma (17, 46).

Aproximadamente una docena de especies, incluyendo a la mayoría de las más frecuentes en clínica, tienen un patrón específico propio (*M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. chelonae*, *M. agri*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. simiae*) o característico compartido por más de una especie (*M. intracellulare*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*). El resto de especies, entre ellas las del complejo *M. tuberculosis*, muestran patrones inespecíficos que únicamente tienen valor de exclusión. Esta inespecificidad es más patente en las micobacterias de crecimiento rápido (17).

Es una técnica muy útil en la identificación de los aislamientos clínicos, pero compleja en su estandarización. Precisa de un equipo costoso en su adquisición y de uso complejo, que obliga a estandarizar el método en cada centro. Las condiciones de funcionamiento del cromatógrafo (temperaturas de inyección, de columna, de detección) y el tipo de columna utilizado, condicionan en gran medida el resultado. Estas dificultades impidieron su difusión generalizada en un momento en que se ofrecía como una buena alternativa en la identificación, sobre todo al combinar la cromatografía en capa fina y las características de crecimiento y pigmentación de las cepas (17).

### c) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

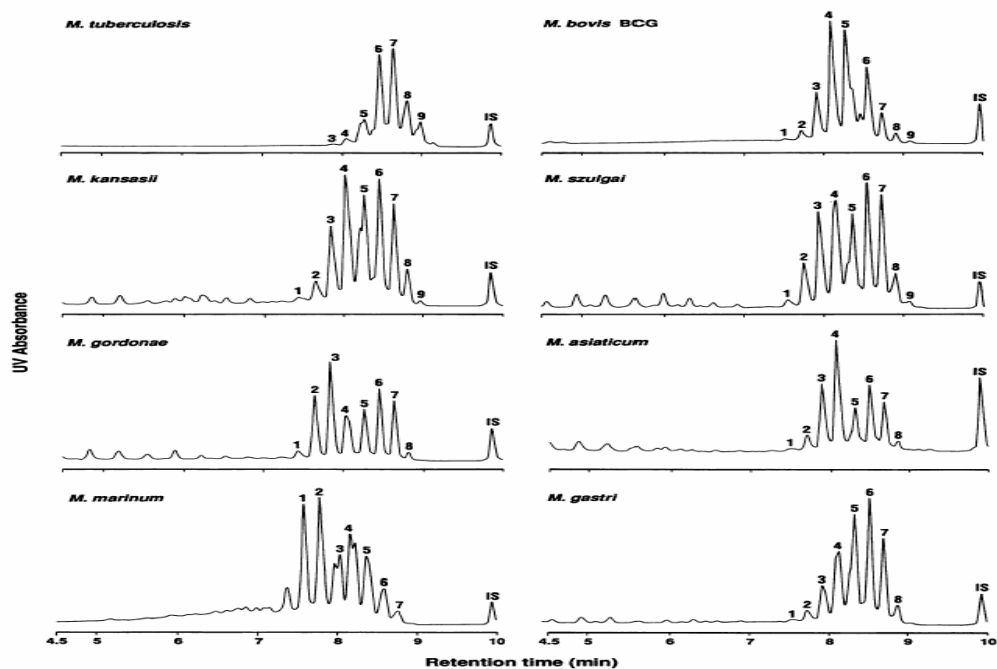
En 1988 Butler y Kilburn desarrollaron un sistema de identificación de especies micobacterianas basado en el análisis de ácidos micólicos por HPLC (3), que guarda muchas similitudes con la cromatografía de gases (GLC), con algunas diferencias técnicas y una mayor rentabilidad diagnóstica, por lo que su difusión es mayor, sobre todo en América del Norte y Europa. El proceso de extracción de los ácidos grasos de la muestra varía, presentándose éstos como ésteres de bromofenacil. A través de una fase móvil líquida (metanol y diclorometano) las muestras son transportadas a lo largo de la columna, produciéndose la separación de los ácidos grasos. Éstos son detectados al final por un espectrofotómetro UV al igual que en la cromatografía de gases (GLC) (17, 46).

La interpretación de los resultados se realiza por inspección visual del cromatograma y su comparación con patrones conocidos. En los últimos años se están desarrollando programas informáticos para identificar los cromatogramas obtenidos. Diversos estudios han corroborado su utilidad, con una especificidad del 70 al 95% según las especies. Su inconveniente principal son las posibles variaciones interespecie y las similitudes entre algunas especies. Ello obliga a mantener estos programas permanentemente actualizados e introducir las variantes de especies. Actualmente, lo más recomendado es utilizarlos junto con la inspección visual (Figura 4) (17, 46).

La existencia de un mayor número de picos posibles respecto a la GLC, le confiere una mayor potencialidad diagnóstica. Existen patrones de referencia validados en estudios multicéntricos para la identificación de aproximadamente 23 especies (las más



frecuentes en clínica) aunque en la literatura se han reportado patrones específicos de más de 40 especies micobacterianas (17).



**Figura 4.** Patrones representativos de ésteres de bromofenacil de ácidos micólicos determinados por HPLC. IS es el estándar interno (3).

Los inconvenientes de esta técnica son prácticamente similares a los de la GCL: equipo costoso, necesidad de estandarización en cada centro, precisa aprendizaje y se requiere tener un patrón propio de referencia (17).

### 1.3.3 Métodos moleculares

#### a) Sondas de ácidos nucleicos

Existen diferentes pruebas comerciales basadas en sondas cortas de ácidos nucleicos específicas de especie que se encuentran adheridas en formatos convencionales como lo son: microplacas, tiras de nitrocelulosa o nylon, micromatrices, entre otros (17).

Entre las más utilizadas para la identificación de especies del género *Mycobacterium* se encuentran: AccuProbe system (Genprobe, San Diego, Calif.) que identifica cuatro grupos: el complejo *M. tuberculosis* (MTBC), el complejo *M. avium* (*M. avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. intracellulare*) (MAC), *M. gordonae* y *M. kansasii* (8) basándose en la hibridación del ARN micobacteriano con su ADN complementario adherido a la prueba comercial, de forma rápida (2 horas) y específica (17).

El INNO-LiPA (Innogenetics, Ghent, Belgium) se basa en la amplificación de la región espaciadora del ARN ribosómico (ARNr) 16S-23S de las especies del género *Mycobacterium* la cual se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizadas sobre tiras de nitrocelulosa (31). Este kit permite la identificación del complejo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. celatum* y *M. malmoense*. A este se añade el nuevo INNO-LiPA que agrega *M. simiae*, *M. marinum/ulcerans*, *M. haemophilum* y *M. smegmatis* (30).

El GenoType Mycobacteria assay (Hain Diagnostika, Nehren, Germany) se basa en la amplificación del gen ARNr 23S. Este método permite la identificación de las mismas especies que el primer INNO-LiPA además de incluir *M. peregrinum* y *M. phlei* (17).

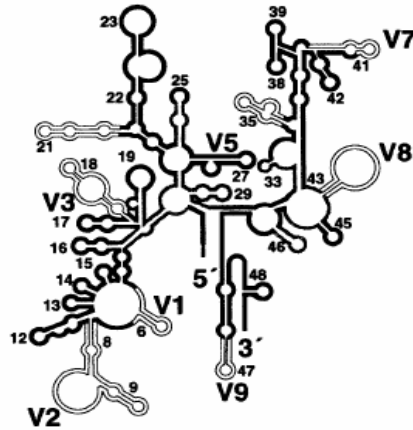
En los pocos estudios realizados se ha observado que estos dos últimos sistemas son muy similares, con una buena sensibilidad y especificidad a partir de cultivos líquidos y sólidos de estudio clínico, obteniéndose los resultados en 5-6 h. Además de la variedad

de especies que identifica en una sola prueba, otra ventaja de estos métodos es la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Los principales inconvenientes son la laboriosidad y el costo de ambos, aunque inicialmente el GenoType es más económico (17); así como el número limitado de especies que se identifica con este tipo de pruebas y la falta de especificidad ya que existen cruzamientos genéticos de los fragmentos analizados entre algunas especies (30).

#### b) Secuenciación del gen ARNr *16S*

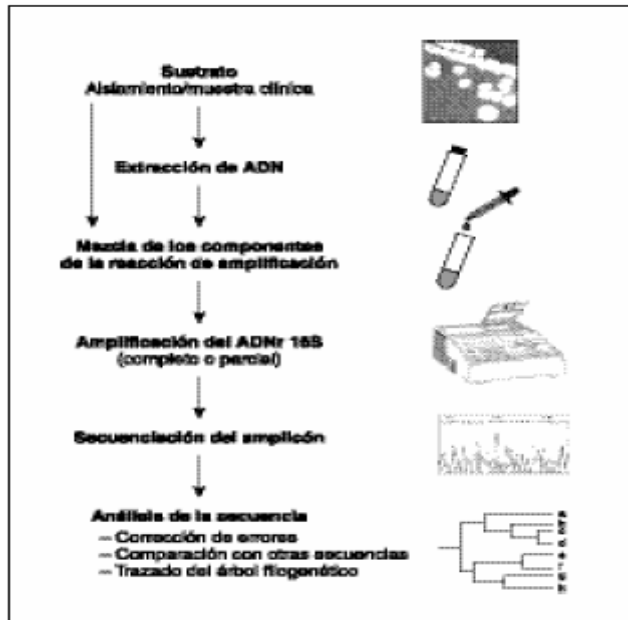
El ARNr *16S* es una secuencia de aproximadamente 1,500 nucleótidos, el cual es codificado por el gen ADNr *16S*. Este último es un gen altamente conservado en el cual hay regiones comunes a todas las formas de vida, aunque existen variaciones de nucleótidos concentradas en áreas específicas (46).

El ARNr *16S* se encuentra altamente conservado debido a las represiones en su estructura y funcionamiento, pero algunas regiones dentro de este son altamente variables y específicas para especies micobacterianas. Esta variabilidad es importante en la determinación de las relaciones filogenéticas e identificación de micobacterias (27); ya que existen dos regiones hipervariables, conocidas como regiones A y B, que corresponden a las posiciones 130-210 y 430-500, respectivamente, de *Escherichia coli*, que son los sitios de diferenciación entre la mayoría de las especies micobacterianas (Figura 5) (46).



**Figura 5.** Modelo de la estructura secundaria del gen *ARNr 16S*. Las líneas dobles indican regiones variables o hipervariables, las líneas gruesas indican regiones altamente conservadas, V1 a V9 indican regiones de mayor variabilidad. Las hélices 8, 9, 10 y 11 corresponden a la región A, mientras que la hélice 18 corresponde a la región B (46).

Por lo anterior, la secuencia del *ADNr 16S* fue utilizada para determinación de especies de micobacterias; llegando a ser el “estándar de oro” para la identificación de bacterias durante la década de 1980s (Figura 6) (34).



**Figura 6.** Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del gen *ARNr 16S* (38).

Este gen además reveló la existencia de micobacterianas no antes descritas como *M. cookii*, *M. confluentis* y *M. genavense*, ya que fueron las primeras especies en las que se encontró una secuencia única en una parte del gen ARNr *16S*. Debido a esto, la secuenciación de dicho gen ha sido una herramienta efectiva que ha contribuido al establecimiento de más de 35 nuevas especies y subespecies de micobacterias (34).

La caracterización molecular de miembros del género *Mycobacterium* fue provista por Dostal *et al.* (20) y se encuentra disponible en el sitio web: <http://www.ridom-rdna.de/>, el cual combina diferentes aproximaciones para la exacta diferenciación de estas micobacterias.

El número de copias del gen ARNr *16S* varía entre las especies bacterianas. Los miembros del género *Mycobacterium* de rápido crecimiento generalmente tienen dos copias idénticas, mientras que las micobacterias de lento crecimiento generalmente tienen una copia (37). La identificación de micobacterias por este método ha sido limitada debido a la existencia, aunque rara de dos copias del gen pero con diferente secuencia en la misma micobacteria o a las secuencias idénticas presentes en *M. kansasii* y *M. gastri*, que son especies diferentes. Otro ejemplo de identidad de secuencias entre dos especies es entre *M. avium* y *M. paratuberculosis* (24).

Algunas especies estrechamente relacionadas no son discriminadas por medio de la diversidad en secuencia de este locus, por ejemplo miembros del complejo *M. tuberculosis* (Mtbc-complejo), *M. avium-intracellulare* (MAI), *M. abscessus-chelonae*, *M. marinum-ulcerans* y *M. septicum-peregrinum* (20).

c) Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del gen de la proteína de choque térmico de 65 kDa (*hsp65*) por PCR-RFLP

La proteína de choque térmico de 65-kDa, esta presente en las especies micobacterianas y ha sido más intensamente estudiado como antígeno de *M. leprae*. Este antígeno fue designado como antígeno de 65K o antígeno proteínico de pared celular (CWP-a), ya que parece ser co-purificado en algunos procedimientos de aislamiento de la pared celular (41).

El antígeno 65K es una de las proteínas más inmunoreactivas de las micobacterias. Esta proteína contiene epítomos únicos en cada especie de micobacteria y epítomos que son comunes a varias especies micobacterianas. El antígeno purificado de 65 kDa induce una fuerte respuesta de hipersensibilidad tipo tardía en animales infectados con *M. tuberculosis*. Los anticuerpos dirigidos contra esta proteína son detectados en el suero de pacientes con tuberculosis o lepra y las células T reactivas contra este antígeno son aisladas de pacientes con lepra o tuberculosis los cuales han sido vacunados con BCG. De manera general, el antígeno de 65 kDa parece ser un importante inmunógeno de células B y T y antígeno en humanos (41).

El gen *hsp65* fue seleccionado como blanco de amplificación porque se encuentra altamente conservado entre las especies micobacterianas. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de los genes *hsp65* de *M. tuberculosis* Erdman y *M. bovis* BCG son idénticas. Estos genes comparten el 87% de identidad con el gen *hsp65* de *M. leprae*; sin embargo, el genoma de *M. leprae* es homólogo únicamente de 20 a 30% con el genoma de *M. tuberculosis*. La proteína de 65-kDa presenta una secuencia de

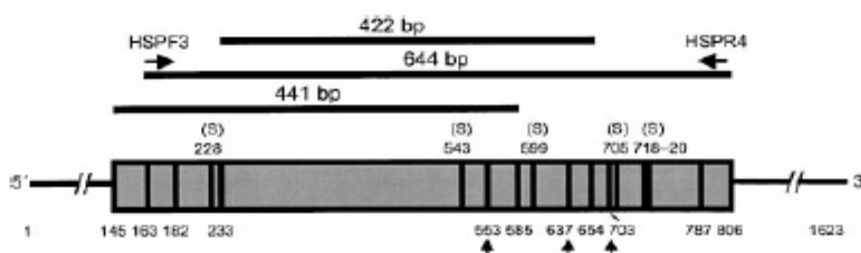
aminoácidos del 40 al 60% de identidad en todas las bacterias, y células de mamíferos (36).

El uso del gen que codifica para la proteína de choque térmico de 65 kDa (*hsp65*) se ha propuesto como un instrumento de uso potencial para la identificación de micobacterias ya que está presente en las especies y aunque se encuentra altamente conservado muestra mayor diversidad alélica que el gen ARNr *16S* (20) (posiciones 624 a 664 y 683 a 725 del gen de *M. tuberculosis*) (46).

Se conoce también que todas las especies de micobacterias tienen una sola copia del gen *hsp65* en su genoma y que este gen no es fácilmente transferido de una bacteria a otra (24).

En 1989, Hance y col. (21) desarrollaron unos iniciadores que amplificaron una región de 338 pb del gen *hsp65* de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. fortuitum* y *M. paratuberculosis*, así como tres pruebas de hibridación de oligonucleótidos para distinguir los productos de amplificación por PCR (amplicones) de *M. tuberculosis*, *M. fortuitum* y *M. avium*. Posteriormente, en 1992 Plikaytis y col. (36) realizaron un ensayo en donde un segmento del gen de la proteína de 65-kDa altamente conservado y específico del género *Mycobacterium* (~ 1380 pb) fue amplificado por PCR y el producto resultante fue digerido con las enzimas de restricción *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*NI) y *Xanthomonas holcicola* (*Xho*I), ya que una comparación de los patrones de los fragmentos de restricción de las especies micobacterianas conocidas versus las desconocidas permitió obtener su identificación a nivel especie, por lo tanto la variación en las cepas de dichos patrones fue usada como marcador

epidemiológico (36); por su parte en el mismo año Telenti y col. (45) desarrolló un método similar amplificando un segmento del gen *hsp65* de ~ 441 pb con las enzimas de restricción *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*EII) y *Haemophilus aegyptius* (*Hae*III) (Figura 7), con esto obtuvo exitosos resultados separando especies en sub-especies que por métodos bioquímicos y por secuenciación del gen ARNr *16S* no fue posible y elaboró un algoritmo para la diferenciación de micobacterias de mayor importancia médica.



**Figura 7.** Representación esquemática de los 441 pb utilizados para la identificación de micobacterias y sus posiciones (24). Los fragmentos de 442 pb y 644 pb fueron utilizados en otro estudio para identificación micobacteriana. (25).

Este método posteriormente fue utilizado por otros investigadores, conduciendo a un algoritmo para la identificación de nuevas especies y subespecies o variantes, además de nuevos patrones descritos recientemente (2, 10, 12, 13, 14, 20, 43, 45), demostrando que este método es más confiable que los métodos convencionales (27).



## **2. JUSTIFICACIÓN**

El incremento en los reportes de infecciones causadas por MNT, ha llevado al estudio del aislamiento e identificación de estas Micobacterias en agua para uso y consumo humano; así como a la búsqueda de una técnica de identificación micobacteriana que proporcione el mayor número de especies posibles, que sea rápida, precisa, relativamente barata comparada con otras técnicas y que se implemente en los laboratorios clínicos como un diagnóstico de rutina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

- ❖ Realizar la identificación de MNT aisladas de muestras de agua para uso y consumo humano y de re-uso para riego mediante el análisis del polimorfismo del gen *hsp65* por PCR-RFLP.

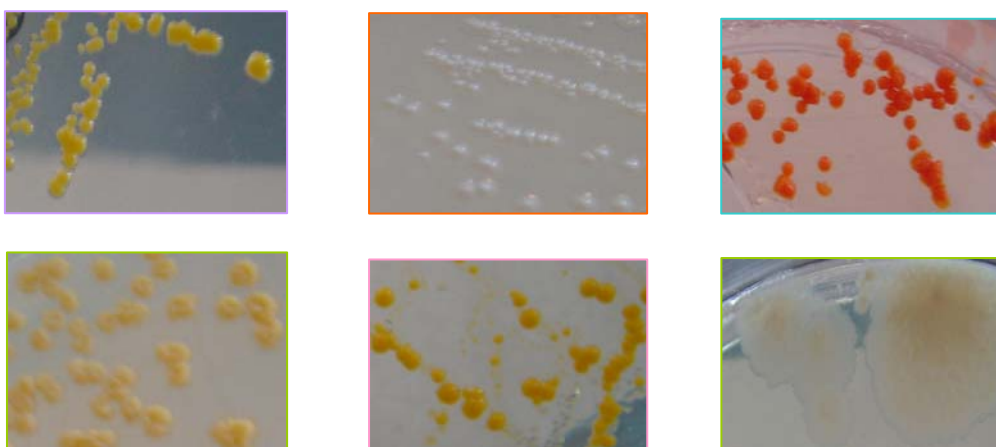
#### 3.2 Objetivos particulares

- ❖ Evaluar las características macroscópicas de las MNT aisladas de agua para uso y consumo humano y de re-uso para riego.
- ❖ Estandarizar el método de identificación de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65*.
- ❖ Validar el método de identificación de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65* con cepas provenientes del ATCC.
- ❖ Relacionar la identificación de los aislamientos obtenidos por PCR-RFLP del gen *hsp65* con las características macroscópicas observadas.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Aislamientos de Micobacterias No Tuberculosas

Se partió de una colección de Micobacterias No Tuberculosas del Laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana, de la Facultad de Medicina de la UNAM; las cuales fueron aisladas a partir de muestras de agua subterránea y de re-uso para riego (Figura 8). Las micobacterias obtenidas del agua subterránea para uso y consumo humano se aislaron de tres subsistemas de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM): a) Ciudad de México, b) Texcoco y c) Xochimilco. Los aislamientos de agua de riego fueron obtenidos de los canales de Xochimilco.



**Figura 8:** Morfologías coloniales de algunas de las Micobacterias No Tuberculosas aisladas de agua subterránea y de re-uso para riego, pertenecientes a la colección de MNT del Laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, UNAM.

Los aislamientos utilizados se encontraban almacenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio líquido Middlebrook 7H9 (M7H9) adicionado con ADC.

## 4.2 Evaluación de velocidad de crecimiento y formación de pigmento

Se trabajaron 20 aislamientos de MNT provenientes de agua subterránea en los cuales se observaron cinco morfologías coloniales diferentes y 81 aislamientos con 19 morfologías coloniales diferentes pertenecientes a muestras de agua de riego (Tabla 5).

**Tabla 5:** Número de aislamientos trabajados en los dos diferentes tipos de agua estudiados y número de morfologías coloniales obtenidas en cada uno de ellos. \* Los aislamientos se obtuvieron utilizando dos técnicas de tratamiento: a) dodecil sulfato de sodio (SDS) al 3 % y solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 1 % y 2 % y b) cloruro de cetil piridinio (CPC) al 0.05 % y 0.5 %.

Zona estudiada	Tipo de agua	Aislamientos BAAR*	Morfología colonial
ZMCM	Subterránea	20	5
Canales de Xochimilco	Re-uso para riego	81	19

Para cada aislamiento obtenido se evaluó velocidad de crecimiento y formación de pigmento.

### 4.2.1 Velocidad de crecimiento

La prueba de velocidad de crecimiento es el tiempo que se requiere para formar colonias maduras, visiblemente aisladas sin magnificación sobre medio sólido. Se preparó una suspensión de cultivo estándar de cada uno de los aislamientos de MNT en medio M7H9 hasta alcanzar una  $DO_{280}$  de 0.25. Con esta suspensión se realizó la dilución correspondiente hasta  $10^{-4}$  y se inoculó 0.1 mL en medio Löwenstein-Jensen (LJ). Los cultivos fueron incubados a 37 °C y observados diariamente hasta el séptimo día y posteriormente por semana hasta la formación de colonias visibles. Esto permitió diferenciar a los aislamientos en micobacterias de rápido y lento crecimiento (30).

#### 4.2.2 Formación de pigmento

Con la misma dilución del cultivo estándar utilizada en la velocidad de crecimiento se sembraron 0.1 mL de cada aislamiento en dos tubos conteniendo medio LJ, uno de los tubos fue protegido de la luz utilizando papel aluminio. Cuando se detectó crecimiento en el tubo no cubierto, se revisó el tubo cubierto (30).

### **4.3 Estandarización del método de identificación de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65***

#### 4.3.1 Estandarización de las condiciones de amplificación

##### ◆ Curva de magnesio

Se realizó una curva con diferentes concentraciones de magnesio (0, 0.5, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0 y 2.5 mM de  $Mg^{2+}$ ), para obtener la concentración óptima y evitar la presencia de productos inespecíficos.

##### ◆ Taq polimerasa

Se utilizaron dos tipos diferentes de polimerasas: taq polimerasa (Platinum, Invitrogen) y taq polimerasa (Gold, Roche), para evaluar la especificidad de la enzima a las diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  utilizadas en la curva anterior.

En ambos ensayos se utilizó 10 mM de dNTPs, 20 pmol de cada oligonucleotido, y 1.5 U de Taq Polimerasa. El ADN utilizado fue de la cepa de *M. tuberculosis* H37RV.

#### 4.3.2 Estandarización del tiempo de corrimiento en electroforesis para visualización de los fragmentos de restricción.

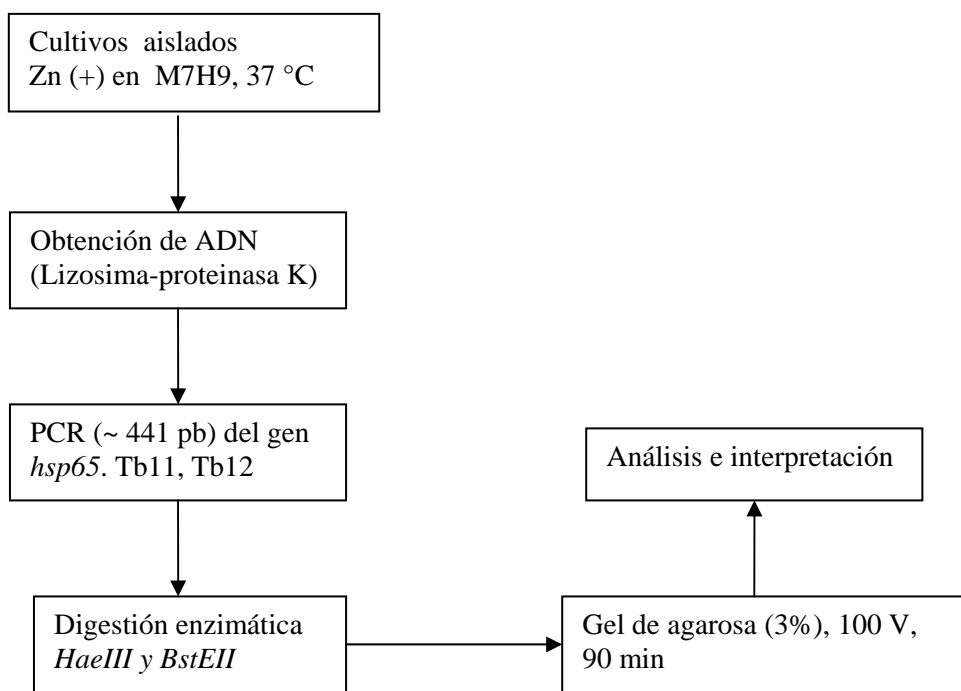
Los fragmentos de restricción de *M. tuberculosis* H37Rv, se corrieron en un gel de agarosa (Biogel, Q·Biogene) al 3 %, a un voltaje de 100 V a diferentes tiempos (60, 90, 120 y 150 min). Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (MPM XIII, Roche). Los fragmentos de restricción fueron visualizados bajo luz UV después de teñirse con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se analizaron utilizando el programa GeneTools (Syngene, 1998-2000) para posteriormente realizar la interpretación con el algoritmo disponible en Internet (<http://app.chuv.ch/prasite>) PRASITE.

#### **4.4 Validación del método de identificación de MNTs por PCR-RFLP del gen hsp65.**

Se utilizaron 11 cepas de MNT provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC): *M. avium* ATCC 25291, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. gordonae* ATCC 14470, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. mucogenicum* ATCC 49650, *M. nonchromogenicum* ATCC 19530, *M. scrofulaceum* ATCC 35785, *M. terrae* ATCC 15755 y *M. xenopi* ATCC 19250; las cuales se analizaron por este mismo método como controles positivos de especie.

## 4.5 Identificación de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65*

### 4.5.1 Esquema general de trabajo



**Figura 9.** Esquema general del método de identificación de MNT basado en el polimorfismo del gen *hsp65* por PCR-RFLP

### 4.5.2 Extracción de ADN micobacteriano por el método de la lizosima-proteinasa k

El sedimento de 1 mL de cultivo líquido (M7H9) ajustado a una  $DO_{600}$  de 0.6 fue suspendido en 1 mL de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM [pH= 8]). La suspensión bacteriana fue incubada en baño maría 1 hora a 80° C para inactivación de las micobacterias, se centrifugó a 14000 rpm/ 2 min, se descartó el sobrenadante y al precipitado se agregó 100  $\mu$ L de buffer TE y lizosima a una concentración final de 2

mg/mL. La mezcla se incubó 1 hora a 37° C y posteriormente se agregó 89 µL de una solución preparada con 700 µL de SDS al 10% y 60 µL de proteinasa K (10 mg/mL), se incubó 10 min a 65° C. Se agregó 100 µL de NaCl 5M y se incubó por 10 min más a la misma temperatura. A esta mezcla se adicionó fenol y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) en un volumen 1:1, se agitó por 30 seg con ayuda de un vortex y se centrifugó a 14000 rpm/ 15 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen 1:1 de cloroformo/alcohol isoamílico, se agitó por 30 seg y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm/ 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se agregó un volumen de isopropanol para precipitación del DNA. Después de una incubación de 30 min a -20° C se centrifugó a 14000 rpm/ 15 min, el botón fue lavado con 500 µL de etanol al 70 %, se volvió a centrifugar a 14000 rpm/15 min. el sobrenadante se decantó, se dejó secar el precipitado por inmersión del tubo, se suspendió en agua para PCR y se almacenó a -20° C hasta su uso.

#### 4.5.3 Amplificación (PCR)

Un fragmento de aproximadamente 441 pb del gen *hsp65* se amplificó con los iniciadores específicos (Tb11 [5`ACCAACGATGGTGTGTCCAT] y Tb12 [5`CTTGTCGAACCGCATACCCT]) descritos por Telenti y col. (45). La composición de la mezcla de reacción (50 µL) fue de 50 mM KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTPs, 20 pmol de cada iniciador, 1.5 U de Taq polimerasa y 100 ng de ADN suspendidos en agua para PCR. Las condiciones de amplificación consistieron en un primer ciclo a 94 °C por 3 min, seguido de 45 ciclos a 94 °C por 1 min, 56° C por 1 min, 72° C por 1 min, el paso final de extensión consistió en un ciclo a 72° C por 5 min (Applied Biosystems, PCR System 9700). La presencia del producto

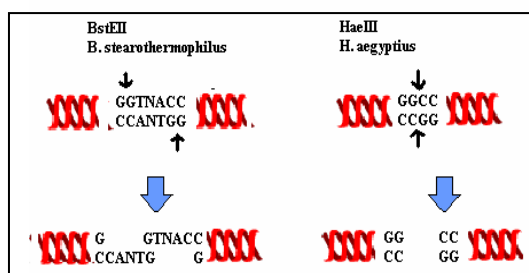


amplificado se confirmó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 2% por 1 hora a 100 Volts (V) en buffer TBE.

#### 4.5.4 Digestión enzimática y análisis de los productos de restricción.

Para la obtención de los productos de restricción se utilizaron dos enzimas de digestión, la enzima *BstEII* (10 U/μL, Roche) y la enzima *HaeIII* (10 U/μL, Boehringer Mannheim, Germany).

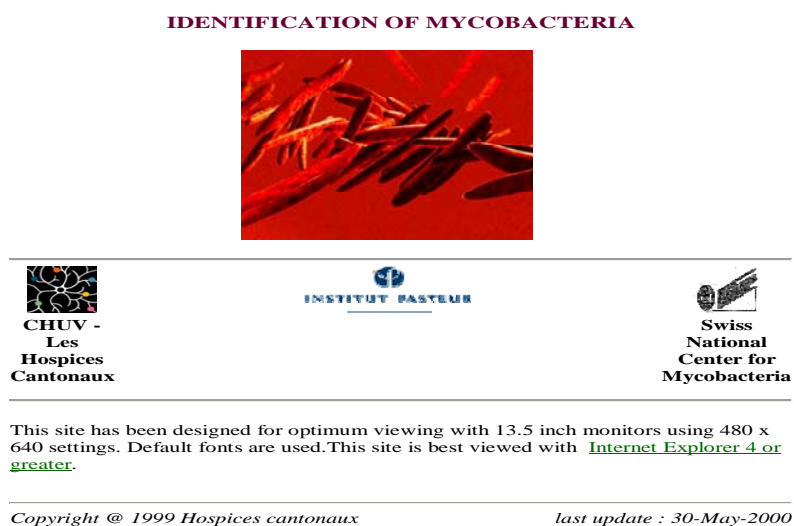
A una mezcla conteniendo 8 μL de agua para PCR, 2 μL de buffer de restricción y 10 μL del producto de PCR se agregó 0.5 μL de cada enzima. Las mezclas fueron incubadas por 2 horas a 60° C para la enzima *BstEII* y a 37° C para la enzima *HaeIII* (Figura 10).



**Figura 10.** Sitios de corte de las enzimas utilizadas para la obtención de los fragmentos de restricción.

La separación de los fragmentos de restricción se observó en un gel de agarosa al 3% (Biogel, Q-Biogene) mediante una electroforesis (Amersham Biosciences Corp, submarine electrophoresis unit HE 99X) en buffer TBE 0.5X (0.045 M tris-borato y 0.001 M EDTA [pH 8.0]), a un voltaje de 100 V por 90 min en una cámara de electroforesis horizontal, utilizando un marcador de peso molecular de 50 pb (MPM XIII, Roche). Los fragmentos de restricción fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 μg/ml) y visualizados bajo luz UV. El análisis se llevó a cabo con el programa

GeneTools (Syngene, 1998-2000) y la interpretación se realizó con base en el algoritmo disponible en Internet (<http://app.chuv.ch/prasite>) PRASITE (Figura 11). Como control positivo se utilizaron los fragmentos de restricción de *M. tuberculosis* H37Rv.

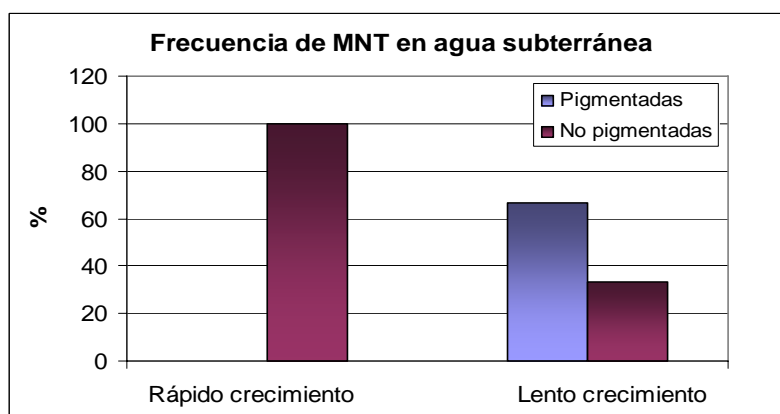


**Figura 11.** Representación gráfica del sitio de internet en el cual se realizó la interpretación de la identificación de micobacterias.

## 5. RESULTADOS

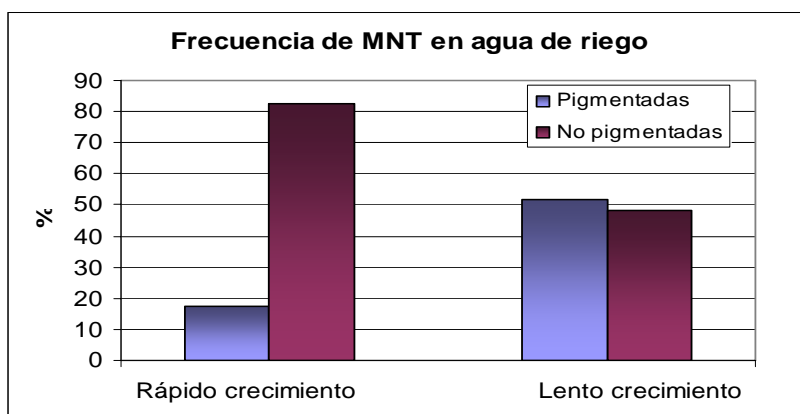
### 5.1 Frecuencia de MNT en agua subterránea y de re-uso para riego basada en su velocidad de crecimiento y producción de pigmento

Los aislamientos de MNT de crecimiento rápido (11/20) y lento (9/20) se encontraron prácticamente con la misma frecuencia en agua subterránea, siendo todas las primeras no pigmentadas, mientras que para los aislamientos de lento crecimiento se encontró el doble de cepas pigmentadas con relación a las no pigmentadas (Figura 12).



**Figura 12:** Frecuencia de aislamientos de MNT de rápido y lento crecimiento en muestras de agua subterránea

En agua de riego los aislamientos de MNT de lento crecimiento (52/81) fueron los más frecuentes encontrándose en estas cepas pigmentadas y no pigmentadas casi en la misma proporción; mientras que, en los aislamientos de rápido crecimiento (29/81) las cepas no pigmentadas fueron las más frecuentes (Figura 13).



**Figura 13:** Frecuencia de aislamientos de MNT de rápido y lento crecimiento en muestras de agua de reuso para riego.

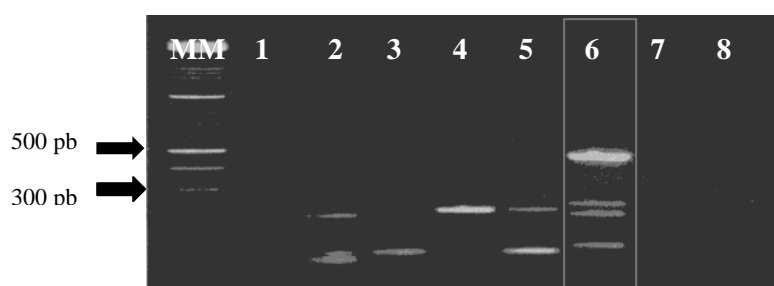
## 5.2 Estandarización del método de identificación de MNT por PCR-RFLP del gen

### *hsp65*

#### 5.2.1 Condiciones de amplificación

##### ◆ Curva de magnesio

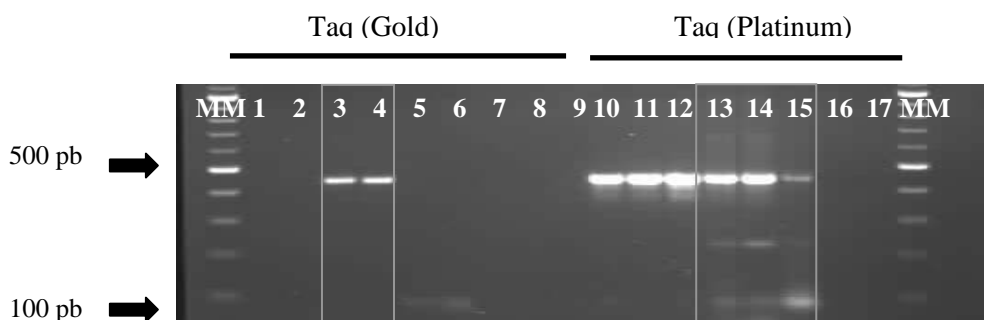
Se utilizó una curva a diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  para la amplificación específica del fragmento esperado de 441 pb (Figura 14). En la única concentración de  $Mg^{2+}$  en la que se observó la banda esperada fue 2.5 mM (carril 6), aunque también en esta misma se observó la presencia de mayor número de productos inespecíficos.



**Figura 14.** Fragmentos de PCR a diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  de *M. tuberculosis* H37Rv. Electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio. Líneas: MM, marcador de peso molecular (100 pb); 1, 0.5 mM; 2, 1 mM; 3, 1.2 mM; 4, 1.5 mM; 5, 2.0 mM; 6, 2.5 mM; 7, 0 mM; 8, Control negativo.

◆ Taq polimerasa

Se utilizaron dos tipos de polimerasa: taq polimerasa (Platinum) con la que se realizó el ensayo previo y la taq polimerasa (Gold) incluida en este ensayo (Figura 15). Para ambas enzimas se realizó una curva a diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$ .



**Figura 15.** Comparación de dos tipos de taq polimerasa para la amplificación de 441 pb del gen de la *hsp65* de *M. tuberculosis* H37Rv, a diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio. Líneas: MM, marcador de peso molecular (100 pb); 1 y 10, 0.5 mM; 2 y 11, 1 mM; 3 y 12, 1.2 mM; 4 y 13, 1.5 mM; 5 y 14, 2.0 mM; 6 y 15, 2.5 mM; 7 y 16, 0 mM; 8 y 17, control negativo.

La enzima con la que se observó mayor especificidad de amplificación fue la taq polimerasa Gold a concentraciones de 1.2 y 1.5 mM de  $Mg^{2+}$  (carriles 3 y 4); ya que para la taq polimerasa Platinum se observó el producto de amplificación en todas las concentraciones de  $Mg^{2+}$  utilizadas, pero en todas ellas se observaron productos inespecíficos, estando éstos presentes en mucho mayor cantidad número a 1.5, 2.0 y 2.5 mM de  $Mg^{2+}$  (carriles 13, 14 y 15). Por lo tanto la enzima taq polimerasa Gold fue seleccionada para realizar las amplificaciones a una concentración de 1.5 mM de  $Mg^{2+}$ .

## 5.2.2 Tiempo de corrimiento de electroforesis

El tiempo de corrimiento de la electroforesis se determinó obteniendo los pesos moleculares de los patrones de restricción de *M. tuberculosis* H37Rv a diferentes tiempos en un gel de agarosa al 3%, 100 V; debido a las indicaciones proporcionadas en el inserto perteneciente a la agarosa utilizada (Biogel, Q-Biogene) y a las condiciones señaladas por el algoritmo de interpretación PRASITE.

En los tiempos estudiados no se observó variación entre los valores de los fragmentos de restricción con respecto al tiempo; por lo que se decidió calcular el promedio y compararlo con los valores de referencia (PRASITE). El tiempo óptimo fue de 90 min, ya que fue el más cercano a los valores calculados en el promedio, con una diferencia no mayor de 1 pb (Tabla 6).

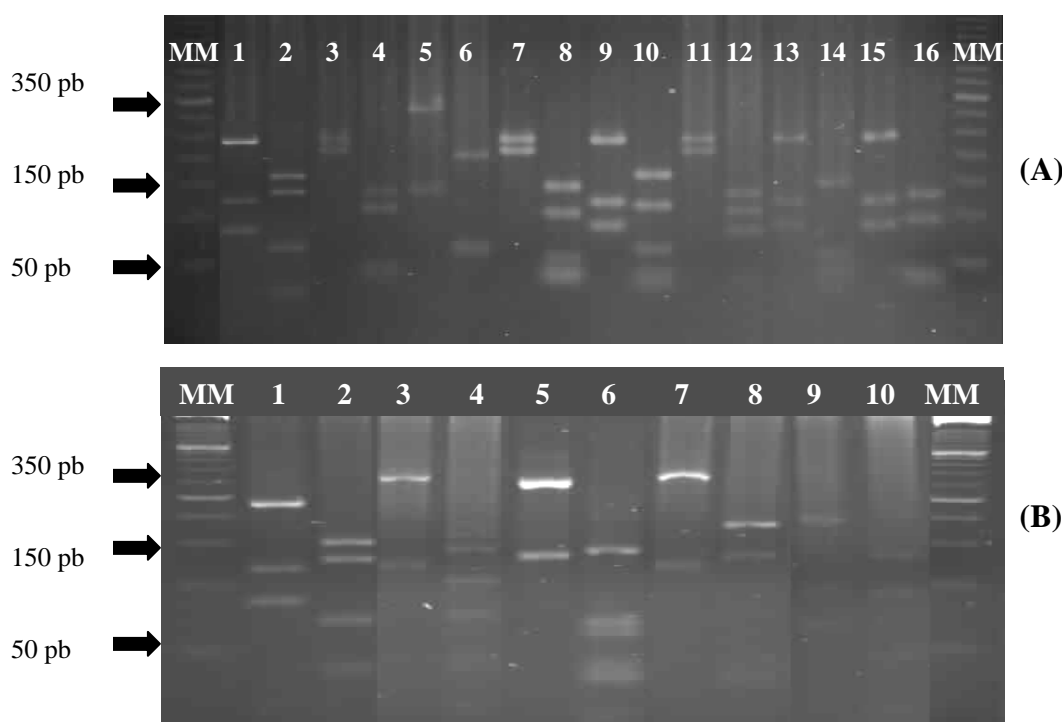
**Tabla 6.** Patrones de restricción de *M. tuberculosis* H37Rv a diferentes tiempos comparados con los valores de referencia.

Tiempo (min)	60	90	120	150	Promedio	Desviación estándar ( $\pm$ )	Referencia
<b><i>BstEII</i> (pb)</b>	243	242	238	241	241	2	240
	117	118	118	117	118	1	120
	82	84	84	84	84	1	85
<b><i>HaeIII</i> (pb)</b>	157	155	151	152	154	3	150
	132	128	128	128	129	2	130
	69	70	68	68	69	1	70

### 5.3 Validación del método de identificación de MNTs por PCR-RFLP del gen

#### *hsp65*

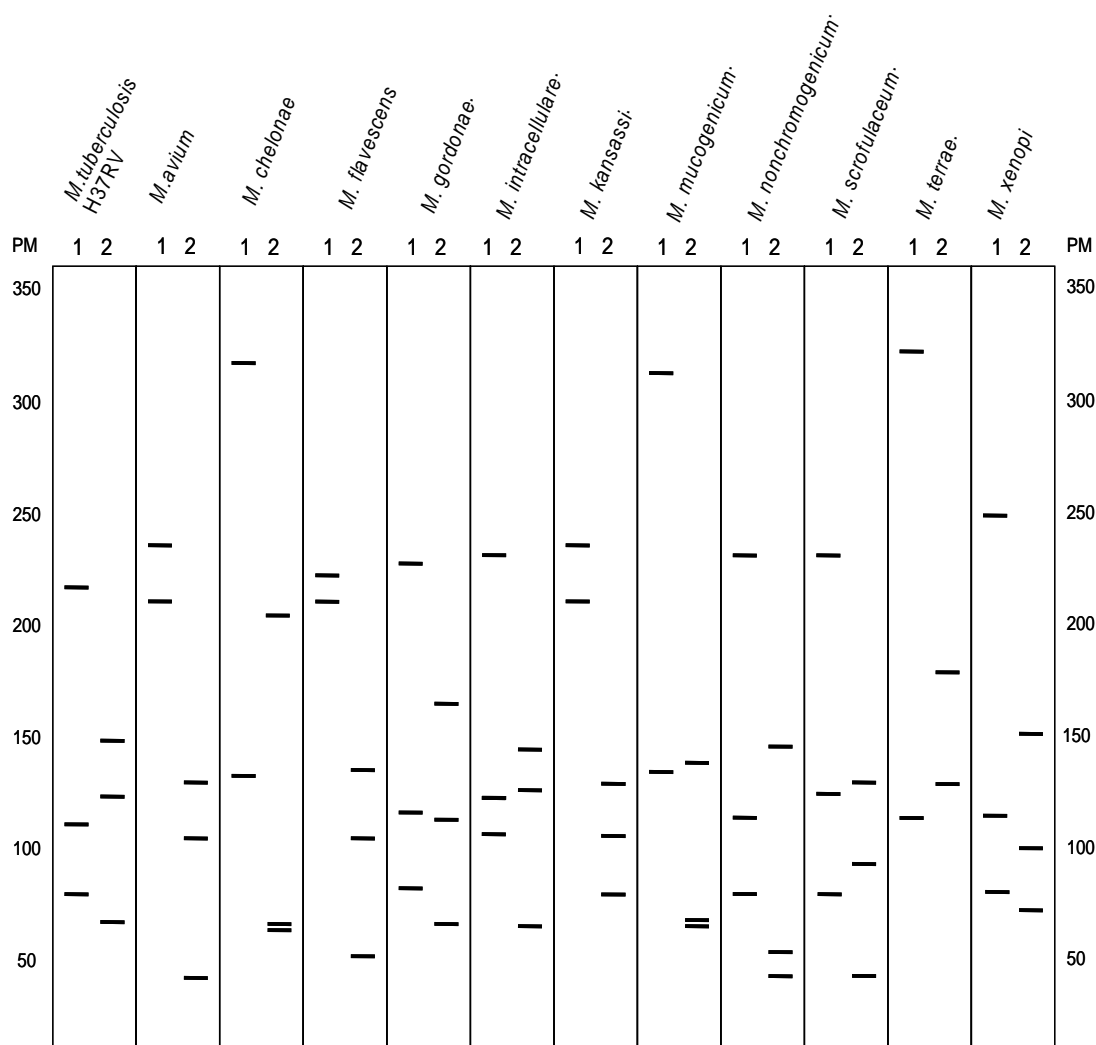
Para confirmar la validez de los resultados, se aplicó el método de identificación por PCR-RFLP del gen *hsp65* a 11 cepas de referencia provenientes del ATCC (Figura 16).



**Figura 16.** Patrones de restricción de cepas de referencia de MNT. (A) Líneas: MM, marcador de peso molecular de 50 pb; 1 y 2, *M. tuberculosis* H37 Rv digerido con *BstEII* y *HaeIII* respectivamente; 3 y 4, *M. avium* (ATCC 25291); 5 y 6, *M. chelonae* (ATCC 35752); 7 y 8, *M. flavescens* (ATCC 14474); 9 y 10, *M. goodii* (ATCC 14470); 11 y 12, *M. kansasii* (ATCC 12478); 13 y 14, *M. nonchromogenicum* (ATCC 19530); 15 y 16, *M. scrofulaceum* (ATCC 35785). (B) Líneas: MM, marcador de peso molecular (50 pb); 1 y 2, *M. tuberculosis* H37 Rv digerido con *BstEII* y *HaeIII* respectivamente; 3 y 4, *M. xenopi* (ATCC 19250); 5 y 6, *M. mucogenicum* (ATCC 49650); 7 y 8, *M. terrae* (ATCC 15755); 9 y 10, *M. intracellulare* (ATCC 13950).

En nuestra validación de identificación de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65*, se confirmó la especie de ocho de las once cepas de micobacterias provenientes del ATCC, al realizar el análisis con PRASITE. Para las especies sin confirmarse con éste algoritmo, se realizó un búsqueda en trabajos previos (2, 10, 12, 13, 14, 20, 43, 45) y se

encontró para *M. flavescens* ATCC 14474 que los patrones de restricción correspondían a los ya publicados para esta misma especie *M. flavescens* tipo II (*Bst*EII 245-220-0 y *Hae*III 150-100-0) (13, 14), con excepción de una última banda en *Hae*III ya que la mayoría de los autores discriminan bandas menores a 60 pb para no confundirse con los iniciadores y/o sus dimeros; para *M. mucogenicum* se encontró un patrón (*Bst*EII 310-131-0 y *Hae*III 139-65-58) (20) que de igual manera fue muy similar al obtenido en este trabajo y para *M. scrofulaceum* ATCC 35785 no se encontró ningún patrón de restricción similar (Tabla 7, Figura 17).



1) *Bst* EII. 2) *Hae* III, PM: Peso molecular

**Figura 17:** Representación esquemática de los patrones de restricción obtenidos con las enzimas *Bst* EII *Hae* III para las cepas ATCC.

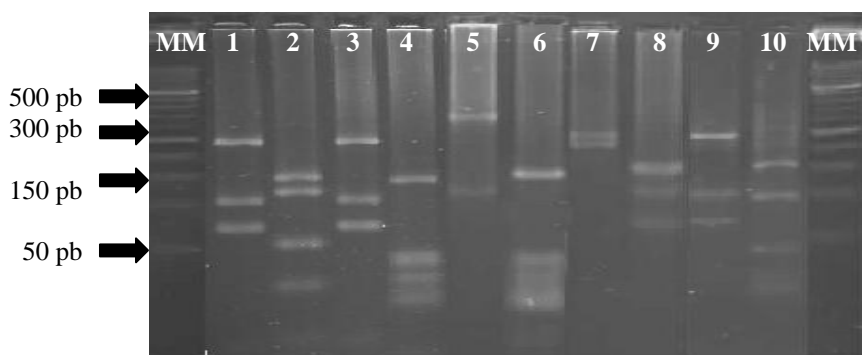


Valores teóricos			Valores experimentales*		
Especie	<i>BstEII</i> (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)	Especie	<i>BstEII</i> (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	240, 120, 85	150, 130, 70	<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv	233 ± 2, 117 ± 1, 84 ± 0	151 ± 1, 128 ± 1, 69 ± 1
<i>M. avium</i> tipo 1	240, 210, 0	130, 105, 60	<i>M. avium</i> ATCC 25291	242 ± 4, 214 ± 7, 0	134 ± 4, 109 ± 2, 45 ± 3
<i>M. chelonae</i> tipo 1	325, 130, 0	200, 60, 55	<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	320 ± 4, 137 ± 1, 0	201 ± 4, 62 ± 2, 59 ± 1
<i>M. no tipificable</i>	240, 210, 0	145, 105, 60	<i>M. flavescens</i> ATCC 14474	236 ± 6, 212 ± 5, 0	142 ± 3, 102 ± 1, 53 ± 1
<i>M. gordonae</i> tipo 1	240, 120, 85	160, 115, 60	<i>M. gordonae</i> ATCC 14470	237 ± 1, 118 ± 2, 85 ± 2	163 ± 1, 112 ± 0, 61 ± 1
<i>M. intracellulare</i> tipo 1	240, 120, 100	145, 130, 60	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	239 ± 1, 122 ± 2, 103 ± 0	147 ± 2, 128 ± 1, 60 ± 1
<i>M. kansasii</i> tipo 1	240, 210, 0	130, 105, 80	<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	242 ± 6, 214 ± 1, 0	130 ± 4, 107 ± 1, 81 ± 0
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2	325, 120, 0	140, 60, 55	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	313 ± 4, 138 ± 4, 0	143 ± 4, 69 ± 2, 62 ± 3
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 1	240, 120, 85	150, 60, 55	<i>M. nonchromogenicum</i> ATCC 19530	238 ± 1, 118 ± 0, 85 ± 3	149 ± 3, 56 ± 1, 45 ± 1
<i>M. intracellulare</i> tipo 4	240, 120, 100	130, 95, 60	<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 35785	239 ± 7, 119 ± 4, 86 ± 1	130 ± 2, 94 ± 0, 47 ± 9
<i>M. terrae</i> tipo 1	325, 120, 0	185, 140, 0	<i>M. terrae</i> ATCC 15755	337 ± 3, 118 ± 1, 0	188 ± 3, 130 ± 3, 0
<i>M. xenopi</i> tipo 1	240, 120, 85	160, 105, 60	<i>M. xenopi</i> ATCC 19250	251 ± 2, 118 ± 4, 86 ± 1	153 ± 4, 102 ± 1, 71 ± 1

**Tabla 7.** Patrones de restricción de los productos de PCR del gen de la *hsp65*, utilizando las enzimas *BstEII* y *HaeIII* de las cepas del ATCC utilizadas (valores experimentales) comparados con los valores de las especies reportadas en el algoritmo (PRASITE) de interpretación (valores teóricos). En las líneas sombreadas se señalan las especies para las cuales no se confirmó su identificación por lo que se comparó con la primera opción proporcionada por el programa. \* Experimentos realizados por duplicado.

#### 5.4 Identificación de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65*

De los 20 aislamientos de MNT en agua subterránea, se encontraron 4 especies diferentes: *M. gordonae* tipo1, *M. no tipificable*, *M. nonchromogenicum* tipo 1 y *M. nonchromogenicum* tipo 2 (Figura 18); los patrones de fragmentos de restricción de cada especie fueron concordantes con los reportados en PRASITE (Tabla 8).



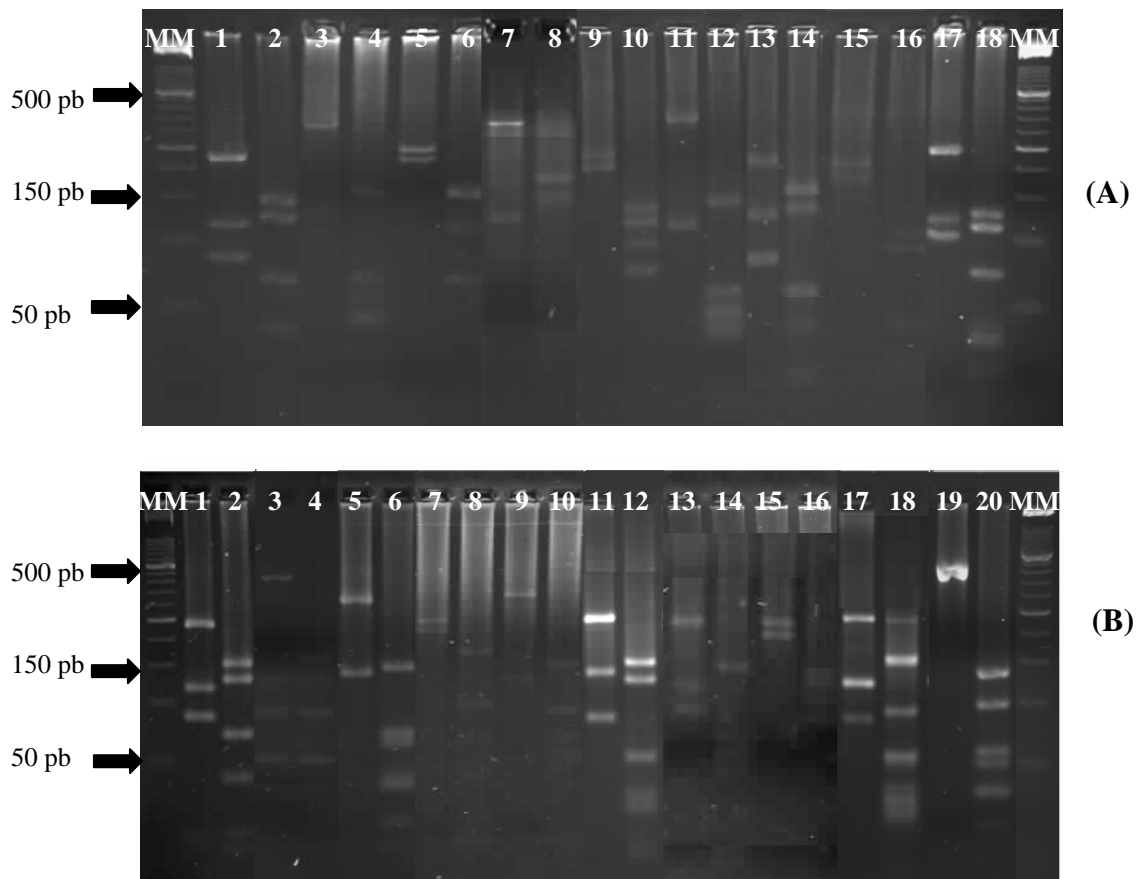
**Figura 18.** Patrones de restricción de cepas aisladas en agua subterránea. Líneas: MM, marcador de peso molecular (50 pb); 1 y 2, *M. tuberculosis* digerido con *BstEII* y *HaeIII* respectivamente; 3 y 4, *M. nonchromogenicum* tipo 1; 5 y 6, *M. nonchromogenicum* tipo 2; 7 y 8, *M. no tipificable*; 9 y 10, *M. gordonae* tipo 1.

**Tabla 8.** Comparación de los patrones de restricción de los productos de PCR del gen *hsp65* obtenidos experimentalmente con los reportados en PRASITE para las cuatro especies de MNT encontradas en agua subterránea. n = número de cepas aisladas para cada una de las especies reportadas.

Especie	Teóricos		Experimentales	
	<i>BstEII</i> (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)	<i>BstEII</i> (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)
<i>M. gordonae</i> tipo 1 n=3	240, 120, 85	160, 115, 60	235 ± 6, 119 ± 2, 87 ± 1	163 ± 6, 114 ± 3, 61 ± 3
<i>M. no tipificable</i> n=11	240, 210, 0	145, 105, 60	235 ± 8, 210 ± 7, 0	146 ± 3, 102 ± 3, 59 ± 3
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 1, n=2	240, 120, 85	150, 60, 55	244 ± 4, 122 ± 1, 89 ± 1	153 ± 2, 59 ± 2, 47 ± 1
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2, n=4	325, 120, 0	140, 60, 55	324 ± 4, 119 ± 2, 0	142 ± 4, 59 ± 1, 47 ± 1

En cuanto a los 81 aislamientos de MNT obtenidos de agua superficial, se encontraron 15 especies diferentes de micobacterias: *M. avium* tipo 1, *M. chitae* tipo 1, *M. flavescens* tipo 3, *M. kansassi* tipo 1, *M. malmoense* tipo 1, *M. mucogenicum*, *M. no tipificable*, *M. no tipificable\** *M. nonchromogenicum* tipo 1, *M. nonchromogenicum* tipo 2, *M. peregrinum* tipo 2, *M. senegalense* tipo 1, *M. smegmatis* tipo 1, *M. szulgai* tipo 1, *M. terrae* tipo 1, *M. xenopi* tipo 1 y un aislamiento que no fue identificado por este método (Figura 19).

La identificación de *M. mucogenicum* se llevó a cabo por la comparación de los patrones de restricción encontrados en la validación de este estudio debido a que estos son muy similares a los propuestos por Häfner y col. (14) ya que como se había mencionado esta especie no se encuentra en la base de datos de PRASITE. En este mismo algoritmo se reporta para *M. no tipificable* dos patrones de restricción, los cuales se manejan como dos especies diferentes, por lo que en este trabajo son reportadas como *M. no tipificable* y *M. no tipificable \** (Tabla 9).



**Figura 19.** Patrones de restricción de cepas aisladas en agua de riego. (A) Líneas: MM, marcador de peso molecular de 50 pb; 1 y 2, *M. tuberculosis* H37Rv digerido con *Bst*EII y *Hae*III respectivamente; 3 y 4, especie no identificada; 5 y 6, *M.* no tipificable; 7 y 8, *M. terrae* tipo 1; 9 y 10, *M. peregrinum* tipo 2; 11 y 12, *M. nonchromogenicum* tipo 2; 13 y 14, *M. senegalense* tipo 1; 15 y 16, *M. avium* tipo 1; 17 y 18, *M. malmoense* tipo 1. (B) Líneas: MM, marcador de peso molecular de 50 pb; 1 y 2; *M. tuberculosis* H37Rv digerido con *Bst*EII y *Hae*III respectivamente; 3 y 4, *M. flavescens* tipo 3; 5 y 6, *M. mucogenicum*; 7 y 8, *M.* no tipificable\*; 9 y 10, *M. chitae* tipo 1; 11 y 12, *M. smegmatis* tipo 1; 13 y 14, *M. nonchromogenicum* tipo 1; 15 y 16, *M. kansasii* tipo 1; 17 y 18, *M. xenopi* tipo 1; 19 y 20, *M. szulgai* tipo 1.

**Tabla 9.** Comparación de los patrones de restricción de los productos de PCR del gen *hsp65*, obtenidos experimentalmente con los reportados en PRASITE para las 17 especies de MNT encontradas en agua de riego. n= número de cepas aisladas para cada una de las especies reportadas

Especie	Teóricos		Experimentales	
	<i>BstEII</i> (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)	<i>BstEII</i> (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)
<i>M. avium</i> tipo 1, n=1	240, 210, 0	130, 105, 60	244, 217, 0	132, 109, 45
<i>M. chitae</i> tipo 1, n=2	325, 120, 0	140, 85, 55	336 ± 6, 128 ± 2, 0	151 ± 1, 89 ± 6, 55 ± 9
<i>M. flavescens</i> tipo 3 n=1	440, 0, 0	160, 85, 55	441, 0, 0	166, 87, 43
<i>M. kansasii</i> tipo 1 n=1	240, 210, 0	130, 105, 80	238, 211, 0	124, 100, 80
<i>M. malmoense</i> tipo 1 n=1	240, 120, 100	145, 105, 80	247, 124, 106	134, 113, 71
<i>M. mucogenicum</i> , n=2	313, 138, 0	143, 69, 62	321 ± 10, 142 ± 3, 0	150 ± 4, 72 ± 2, 56 ± 4
<i>M.</i> no tipificable, n=26	240, 210, 0	145, 105, 60	241 ± 6, 214 ± 5, 0	148 ± 4, 103 ± 3, 60 ± 3
<i>M.</i> no tipificable*, n=1	240, 210, 0	180, 100, 50	250, 221, 0	185, 111, 60
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 1, n=3	240, 120, 85	150, 60, 55	245 ± 2, 122 ± 3, 89 ± 1	153 ± 4, 60 ± 3, 48 ± 1
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2, n=33	325, 120, 0	140, 60, 55	327 ± 6, 121 ± 4, 0	149 ± 3, 60 ± 3, 48 ± 3
<i>M. peregrinum</i> tipo 2 n=1	240, 210, 0	140, 120, 100, 60	228, 202, 0	137, 122, 100, 70
<i>M. senegalense</i> tipo 1 n=1	240, 120, 85	185, 140, 50	234, 130, 88	180, 141, 60
<i>M. smegmatis</i> tipo 1 n=3	240, 130, 85	145, 125, 60	243 ± 9, 134 ± 2, 87 ± 1	151 ± 2, 127 ± 2, 59 ± 2
<i>M. szulgai</i> tipo 1, n=1	440, 0,0	135, 105, 70	441, 0, 0	132, 97, 58
<i>M. terrae</i> tipo 1, n=1	325, 120, 0	185, 140, 0	334, 130, 0	185, 151, 0
<i>M. xenopi</i> tipo 1, n=1	240, 120, 85	160, 105, 60	247, 122, 87	152, 95, 61
No identificada, n= 1	-----	-----	301 ± 6, 113 ± 8, 0	143 ± 4, 58 ± 4, 48 ± 4

## **6. DISCUSIÓN**

Se sabe que las MNT se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente y que este género presenta características macroscópicas particulares, hecho por el cual Runyon las clasificó en cuatro grupos (fotocromógenas, escotocromógenas, cromógenas y de rápido crecimiento). No obstante a pesar de que ésta clasificación sigue vigente algunos autores le han agregado algunas modificaciones como la división de micobacterias fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas tanto de rápido como de lento crecimiento obteniendo seis grupos diferentes (5) o aquellos que las dividen por importancia clínica y que día con día esta última clasificación se incrementa probablemente a los métodos moleculares nuevos así como a una mayor susceptibilidad de sujetos al usar agentes inmunosupresores secundario a una enfermedad, presentar una enfermedad crónica de base como la Diabetes Mellitus o tener una inmunosupresión secundaria debido a un proceso infeccioso como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

Se sabe de la existencia de mas de 117 especies de MNT distribuidas ampliamente en el mundo, además de numerosos reportes en los cuales se ha estudiado que las MNT sobreviven, persisten, crecen y colonizan sistemas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano, sugiriendo el agua como una posible vía de exposición e infección de dichas micobacterias (9).

Para identificar las MNT se han utilizado diversas técnicas moleculares, uno de estos métodos es el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) del gen *hsp65*.

En muestras de agua subterránea y de riego de la ZMCM, ambas destinadas para uso y consumo humano se logró obtener 20 y 81 aislamientos de MNT respectivamente; la diferencia en el número de aislamientos podría explicarse al origen de la muestra, ya que el agua subterránea es destinada al abastecimiento directo a las casas de los habitantes de la zona y el agua de riego proveniente de los canales de Xochimilco se encuentra en un espacio abierto donde hay diferentes áreas destinadas a actividades agrícolas, de pastoreo, turismo y asentamientos humanos. La mayor concentración de materia orgánica y por lo tanto incremento de flora es debido a la fuente de carbono disponible.

La identificación de micobacterias por PCR-RFLP del gen de la *hsp65* fue desarrollada por Telenti y col. (45) y ha sido puesta en práctica desde 1993, originalmente se identificaron 33 patrones de restricción, de los cuales 19 correspondían a especies únicas y 14 fueron asociados con 5 especies (*M. flavescens*, 2 tipos; *M. chelonae*, 2 subespecies; *M. kansasii*, 2 tipos; *M. gordonae*, 5 tipos; *M. fortuitum*, 3 subespecies) (2). En años posteriores se sumaron otros trabajos reportando nuevos patrones de restricción de otras especies adicionales a las descritas por Telenti (2, 10, 12, 13, 14, 20, 43, 45).

En este trabajo se evaluó el método de identificación de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65* de muestras provenientes de agua subterránea y de riego de la ZMCM, para

ello se realizó la validación del método con 11 cepas de MNT provenientes del ATCC, de las cuales 8 cepas fueron identificadas correctamente al utilizar únicamente el algoritmo de interpretación PRASITE. Para las otras 3 cepas se encontró que *M. flavescens* ATCC 14474 fue identificada como *M.* no tipificable, ya que ambos patrones de restricción son semejantes mostrando una variación  $\leq 4$  pb, *M. mucogenicum* ATCC 49650 fue identificada como *M. nonchromogenicum* tipo 1 y *M. scrofulaceum* ATCC 35785 como *M. intracellulare* tipo 4, pero los patrones de restricción de ambas especies tuvieron una variación  $\leq 18$  y  $\leq 14$  pb; en estas últimas la variación en pb fue muy grande lo que nos podría afirmar la incorrecta identificación de estas dos especies.

De las cepas que fueron identificadas correctamente la que tuvo mayor variación fue *M. terrae* con una diferencia  $\leq 12$  pb. La diferencia en pares de bases entre las cepas provenientes del ATCC y las propuestas por PRASITE se reportó solo para bandas mayores a 60 pb debido a que como ya se mencionó bandas menores con frecuencia se confunden con iniciadores y/o sus dímeros. En un estudio realizado por Lee y col. (27) se reportó una menor capacidad de discriminación en la secuenciación del gen *hsp65* comparado con el gen *16S* para el complejo *M. terrae*.

Para conocer el motivo por el cual no se confirmó la especie de 3 de las 11 cepas de ATCC al usar únicamente el algoritmo de interpretación PRASITE, se encontró que *M. mucogenicum* no está reportada en esa base de datos, mientras que para las otras dos especies se tiene reporte en este mismo algoritmo de *M. flavescens* tipo 1 (*BstEII* 440-0-0 y *HaeIII* 140-55-50), *M. flavescens* tipo 3 (*BstEII* 440-0-0 y *HaeIII* 160-85-55) y para *M. scrofulaceum* tipo 1 (*HaeIII* 240-210-0 y *BstEII* 145-130-95); pero ninguno de estos patrones de restricción corresponde al obtenido por nosotros para las cepas de ATCC



utilizadas. Por este motivo se realizó la búsqueda en otros algoritmos propuestos en diversos trabajos (2, 10, 12, 13, 14, 20, 43, 45), en donde se encontraron los patrones de restricción de dos de las tres cepas no identificadas, confirmándose la especie, pero para *M. flavescens* no se encontró un patrón de restricción parecido al obtenido en este trabajo; por lo que este, se podría proponer para la identificación de *M. flavescens* ATCC 14474.

Por lo anterior se podría afirmar que *M. no tipificable* y *M. flavescens* ATCC 14474 comparten los mismos patrones de restricción o que difieren en bandas  $\leq 5$  pb, lo cual ocasionaría problemas en la identificación y que la utilización de otros algoritmos complementarios a PRASITE nos ayudó a confirmar la identificación de 10 de las 11 cepas de ATCC utilizadas en la validación.

Las bases de datos disponibles para la identificación de MNT por PCR-RFLP, han demostrado ser pobres debido al elevado número de especies existentes. Dificultando en mayor medida la identificación de aislamientos ambientales ya que la distribución y frecuencia es desconocida en gran medida en el mundo; además de que el número de bases en cada uno de los patrones de restricción para ambas enzimas, puede variar en cada uno de los diferentes estudios hasta por 20 pb, siendo confusos para la interpretación de resultados debido a la falta de un acuerdo colectivo en la estandarización del método. Los principales factores que intervienen en estas variaciones son: i) el tipo de matriz utilizada en la electroforesis (tipo de agarosa, poliacrilamida; así como las concentraciones de estas), ya que se ha observado que la utilización de agarosas con mayor resolución va a permitir la separación de bandas hasta de 5 pb (43, 45); ii) concentración insuficiente y ausencia de marcador en los extremos

de los geles; iii) resolución del software utilizado para el análisis del tamaño de las bandas; iv) condiciones de corrimiento de la electroforesis (buffer, voltaje, tiempo); v) problemas en la amplificación; vi) digestiones enzimáticas parciales y la vii) interpretación subjetiva de las bandas (41, 43).

En el estudio realizado por Cardoso y col. (4) se observó que los problemas más frecuentes para la interpretación de los patrones de restricción en la identificación de MNT por PCR-RFLP fueron los tiempos cortos de corrimiento en la electroforesis ya que afecta la resolución de las bandas de tamaños similares; la ausencia de bandas debido a una concentración insuficiente del fragmento amplificado usado para la digestión enzimática o a la presencia de bandas adicionales debido a una amplificación inespecífica.

*M. nonchromogenicum* tipo 2 al igual que *M. no tipificable* fueron las especies más abundantes encontradas en ambos tipos de agua para uso y consumo humano y de re- uso de la ZMCM (subterránea y de riego); en estas los aislamientos de rápido crecimiento de cepas no pigmentadas fueron las más frecuentes, dichas características fenotípicas correspondieron a las observadas en el laboratorio para todos los aislamientos identificados como *M. no tipificable*. Al realizar la búsqueda en la bibliografía no se encontró información sobre dicha especie a excepción del trabajo publicado por Cardoso y col. (4) en el que utilizan la base de datos PRASITE para la interpretación de sus resultados, y encuentran que al analizar los patrones de restricción de *M. peregrinum* tipo 1 (rápido crecimiento, no pigmentada), es identificada incorrectamente como *M. no tipificable* debido a errores en la resolución de bandas; lo cual en nuestros resultados es poco probable ya que se logró la separación de los fragmentos de restricción digeridos con la enzima *HaeIII* para *M. nonchromogenicum*

tipo 1 y II los cuales difieren en 5 pb. Al realizar una búsqueda en PRASITE se encontró que *M. new* proviene de un aislamiento clínico, pero no se tiene más información de esta. Por otra parte Häfner y col. (20) reportaron un patrón de restricción muy similar a *M. no tipificable*, perteneciente a *M. hassiacum* pero dicha micobacteria es de rápido crecimiento y pigmentada. La posibilidad de que los aislamientos identificados como *M. no tipificable* correspondieran a *M. flavescens* debido a la similitud en los patrones de restricción en nuestro ensayo de validación también fue descartada, ya que esta última es de rápido crecimiento y pigmentada. Por lo tanto debido a que no se tiene información o conocimiento de *M. no tipificable* fuera del algoritmo propuesto en PRASITE, lo más conveniente sería realizar la secuenciación para identificar de una forma más confiable la identidad de este aislamiento.

Al observar que las características fenotípicas no concordaban con la identificación realizada por PCR-RFLP para las micobacterias de lento crecimiento en ambos tipos de agua, nos pudimos dar cuenta de que había una especie que posiblemente compartía los mismos patrones de restricción con *M. nonchromogenicum* tipo 2 pero que a diferencia de esta era de lento crecimiento y pigmentada.

Con los patrones de restricción obtenidos experimentalmente y los proporcionados por PRASITE para los aislamientos de agua subterránea se observó una diferencia  $\leq$  de 7 pb en las cuatro especies encontradas; mientras que para el agua de riego el aislamiento identificado como *M. avium* tipo 1 difirió por más de 12 pb, aunque esta variación también se observó en la validación del método de identificación para los patrones de restricción de *M. avium* ATCC 25291 ya que en trabajos previos (13, 45)

para esta especie se reportaron los fragmentos de restricción (*BstEII* 245-220-0 y *HaeIII* 140-105-0), el resto de los aislamientos de MNT de agua de riego no tuvieron una variación mayor de 12 pb. Además de que en la mayoría de los aislamientos tanto de agua superficial como de riego la identificación por PCR-RFLP del gen *hsp65* coincidió con las características fenotípicas de cada aislamiento.

La variación en el número de pares de bases es muy importante para la identificación de MNT, ya que hay especies que solo difieren en 5 pb como es el caso de *M. marinum* tipo 1 y *M. intracellulare* tipo II con patrones de restricción (*BstEII* 240-210-0 y *HaeIII* 145-105-80) y (*BstEII* 240-210-0 y *HaeIII* 140-105-80) respectivamente; o que las especies a analizar compartan el mismo patrón de restricción como es el caso de *M. marinum* tipo 1 y *M. malmoense* tipo 2 (33). Por lo que es de gran ayuda el apoyarse en las características fenotípicas y si todavía se tiene duda sobre la identidad de la especie realizar alguna prueba bioquímica que sea sencilla y discrimine entre las especies involucradas.

Por otra parte Häfner y col. (20) reportaron que para la identificación exacta de las MNT, se requiere de al menos dos o más métodos, debido a los inconvenientes hasta ahora descritos: el uso de pruebas bioquímicas y características fenotípicas presentan problemas debido a la variabilidad en los resultados dentro de una misma especie (17) o a un perfil bioquímico igual o similar entre especies de MNT genéticamente distintas (34), por ejemplo Wallace y col. (49) reportaron que el 80% de las cepas del complejo *M. avium* recuperadas de pacientes con VIH presentan formación de pigmento, siendo que esta especie está clasificada como una micobacteria de lento crecimiento y sin pigmento. En el caso de los métodos moleculares existen conflictos debido a una

estrecha relación de especies en el gen utilizado para la identificación; o bien a la descripción de nuevos patrones de restricción en el caso del gen *hsp65* debido a especies altamente polimórficas lo cual puede llevar a una dificultad en la interpretación de los patrones de restricción como es el caso de *M. gordonae* en la que se han descrito hasta ocho patrones de restricción diferentes (20).

De las especies encontradas en agua para uso y consumo humano de la ZMCM todas excepto *M. chitae* y *M. senegalense* han sido aisladas en sistemas de distribución de agua por otros estudios, siendo las más frecuentes *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansassi* y *M. xenopi* (48). De acuerdo a la literatura las especies aisladas en este estudio que son consideradas patógenos potenciales son *M. avium*, *M. kansassi*, *M. malmoense*, *M. zulgai*, *M. xenopi*; las demás son causantes raras de enfermedad en humanos; tal es el caso de *M. nonchromogenicum* que fue una de las especies que se aisló con mayor frecuencia en ambos tipos de agua (5, 22). La importancia de las MNT se ha visto en aumento además de su implicación como causantes de enfermedad en humanos a la evidencia de que una previa exposición a estas puede afectar la eficacia protectora de la vacuna *M. bovis* BCG (47).

## 7. CONCLUSIONES

El análisis del polimorfismo del gen *hsp65* para la identificación de MNT demostró ser una buena alternativa, ya que en comparación con otros métodos convencionales o moleculares una vez que se ha estandarizado es más rápida y sencilla; pero que puede llegar a presentar problemas en la interpretación de los resultados debido a la poca cantidad de especies reportadas, a la falta de estandarización para todos los algoritmos disponibles, la existencia de especies diferentes con el mismo patrón de restricción y la frecuente descripción de nuevos patrones para nuevas especies y en particular para aquellas altamente polimórficas; pero que al auxiliarse en las características fenotípicas de los aislamientos nos dio un poder mayor de discriminación.

En agua para uso y consumo humano de la ZMCM se logró la identificación de diversas especies de MNT, algunas de ellas consideradas potencialmente patógenas, lo cual podría servir como una evidencia más del agua como reservorio donde sobrevivan y persistan. Además, debido a que se aislaron de agua para uso y consumo humano, la constante exposición a estas podría tener una repercusión en el aumento de la incidencia de enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas y su posible participación en la alteración de la respuesta inmune previa a la vacunación con *M. bovis* BCG.

## **8. PERSPECTIVAS**

Es recomendable confirmar la identificación de MNT por PCR-RFLP, por secuenciación del gen *16S* ADNr, seleccionando los patrones de restricción diferentes e idénticos con características fenotípicas divergentes.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Bland, S, C., Ireland, M, J., Lozano, E., Alvarez, E, M and Primm, T.** Mycobacterial ecology of the Rio Grande. 2005. *Applied and Env Microbiol.* **71**, 5719-5727.
2. **Brunello, F., Ligozzi, M., Cristelli, E., Bonora, S., Tortoli, E and Fontana, R.** Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. 2001. *J Clin Microbiol.* **39**, 2799- 2806.
3. **Butler, R, W., Kenneth, C, J and James, O, K.** Identification of mycobacteria by High-performance liquid chromatography. 1991. *J Clin Microbiol.* **29**, 2468-2472.
4. **Cardoso, L, S., Bernardelli, A., Cataldi, A., Zumarraga, M., et al.** Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. 2005. *J Microbiol Methods.* **61**, 193-199.
5. **Casal, M., Casal, M.** Las micobacterias atípicas como patógenos emergentes. 2000. *Enf Emerg.* **2** (4), 220-230.
6. **Chang, Chiao-tang., Wang, Ling-yu., Liao, Chen-yi and Huang, Shiao-ping.** Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. 2002. *Applied and Env Microbiol.* **68**, 3159-3161.
7. **Christensen, H., Garton, J, N., Horobín, W, R; Minnikin, E, D and Barer, R, M.** Lipid domains of mycobacteria studied with fluorescent molecular probes. 1999. *Molec Microbiol.* **31**, 1561-1572.
8. **Cook, J, V., Turenne, Y, C., Wolfe, J., Pauls, R and Kabani, A.** Conventional methods versus *16S* ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculos mycobacteria : cost analysis. 2003. *J Clin Microbiol.* **41**, 1010-1015.
9. **Covert, C, T; Rodgers, R, M; Reyes, L and Stelma, N, G.** Ocurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. 1999. *Applied and Env Microbiol.* **65**, 2492-2496.
10. **da Silva Rocha, A., da Costa Leite, C., Magarinos, T. H., de Miranda, B. A., Pires, Lopes, M, Q., Maurits D. W., Noel, S, P.** 1999. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. 1999. *J Microbiol Methods.* **37**, 223-229.
11. **de Magalhães, D, V., da Piedade, F., Pasternak, J and Valle, Martino D, M.** Reliability of *hsp65*-RFLP analysis for identification of mycobacterium species in cultured strains and clinical specimens. 2002. *J Microbiol Methods.* **49**, 295-300.
12. **Deepa, P., Therese, K and Madhavan, H.** Application of PCR- based restriction fragment length polymorphism (RFLP) for the identification of mycobacterial isolates. 2005. *Indian J Med Res.* **121**, 694-700.
13. **Devallois, A., Seng, G. K and Rastogi, N.** Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. 1997. *J Clin Microbiol.* **35**, 2969-2973.
14. **Ergín, A., Kocagöz, T and Dürdal US.** Evaluation of 120 mycobacterial strains isolated from clinical specimens to the species level by Polymerasa Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis. 2000. *Scand J Infect Dis.* **32**, 657-662.
15. **Etienne, G., Villeneuve, C., Billman-Jacobe, H., Astarie-Dequeker, C., Dupont, M and Daffé, M.** The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of



- Mycobacterium smegmatis*. 2002. *Microbiol.* **148**, 3089-3100.
16. **Falkinham, O, J.** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. 1996. *Clin Microbiol Reviews.* **9**, 177-215.
  17. **Fernández de Vega, A, F., Esteban, M, J., González, M, J., Palácios, G, J.** Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005.
  18. **Fujimura, Q, C., da Silva Rocha, A., de Andrade Leite, R, S., Carvalho, M, R., Suffys, P, N., de Souza Fonseca, L and Feres, M, H.** A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by Thin-layer chromatography and molecular methods. 2005. *Microbiol Immunol.* **49**, 571-578.
  19. **Garza, V, R.** Bacteriología, Manual de practicas. 2003. Facultad de Química, UNAM.
  20. **Häfner, B., Haag, H., Geiss Heinrich-Konrad and Nolte, O.** Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. 2004. *Molec Cell Probes.* **18**, 59-65.
  21. **Hance, A, J; Grandchamp, B; Levy-Frebault, V; Lecossier, D; Rauzier, J; Bocart, D and Gicquel, B.** Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. 1989. *Mol Microbiol.* **3**, 843-849.
  22. **Katoch, V, M.** Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). 2004. *Indian J Med Res.* **120**, 209-304.
  23. **Khan, I and Yadav, J.** Development of a single-tube, cell lysis-based, genus-specific PCR method for rapid identification of mycobacteria: Optimization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis. 2004. *J Clin Microbiol.* **42**, 453-457.
  24. **Kim, H., Kim, Sun-Hyun., Shim, Tae-Sun., Kim, Mi-na., Bai, Gill-Han., Park, Young-Gil., Lee, Sueng-Hyun., Chae, Gue-Tae., Chang-Yong., Kook, Yoon-Hoh and Kim, Bum-Joon.** Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). 2005. *Int J Syst and Evol Microbiol.* **55**, 1649-1656.
  25. **Kim, H., Kim, Sun-Hyun., Shim, Tae-Sun., Kim, Mi-na., Bai, Gill-Han., Park, Young-Gil., Lee, Sueng-Hyun., Cha, Chang-Yong., Kook, Yoon-Hoh and Kim, Bum-Joon.** PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 pb heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. 2005. *J Microbiol Methods.* **62**, 199-209.
  26. **Kox, L, F., Leeuwen, J., Knijper, S., Jansen, M, H and Kolk, H, J.** PCR assay based on DNA coding for *16S* rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. 1995. *J Clin Microbiol.* **33**, 3225-3233.
  27. **Lee, K, C., Mi Gi, H., Cho, Y., Kim, K, Y., Lee, N, K., Song, Ki-Joon., Song, Jin-Won., Park S, K., Park, M, M., Lee, H and Bai, Gill-Han.** The genomic heterogeneity among *Mycobacterium terrae* complex displayed by sequencing of *16S* rRNA and *hsp65* genes. 2004. *Microbiol Immunol.* **48**, 83-90.
  28. **Mathema, B., Kurepina, E, N., Bifani, J, P and Kreiswirth, N, B.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current insights. 2006. *Clin Microbiol Reviews.* **19**, 658-685.
  29. **McNabb, A., Eisler, D., Adie, K., Amos, M., Rodrigues, M., Stephens, G., Black, W and Isaac-Renton, J.** Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. 2004. *J Clin Microbiol.* **42**, 3000-3011.

30. **Mercado, M, M, E.** Aislamiento e identificación de micobacterias no tuberculosas en agua de los canales de Xochimilco. 2006. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
31. **Miller, N., Infante, S and Cleary, T.** Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. 2000. J Clin Microbiol. **38**, 1915-1919.
32. **Mondragón- Barreto, M., Vázquez-Chacón, C, A., Barrón-Rivero, C., Acosta-Blanco, P., Kenneth, C., Balandrazo, S., Olivera-Díaz, H.** Comparison among three methods for mycobacteria identification. 2000. Salud Pública Mex. **42**, 484-489.
33. **Nolte, O., Haag, H and Häfner, B.** A mutation in the 65, 000 Dalton heat shock protein gene, commonly used for molecular identification of non-tuberculous mycobacteria, leads to the misidentification of *Mycobacterium malmoense* as *Mycobacterium marinum*. 2005. Molec and Cell Probes. **19**, 275-277.
34. **Pauls, R, J., Turenne, Y, C., et al.** A high proportion of novel mycobacteria species identified by 16S rDNA analysis among slowly growing AccuProbe-negative strains in clinical setting. 2003. Am J Clin Patol. **120**, 560-566.
35. **Phillips, S, M and Fordham, C.** Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. 2001. Clin Infect Dis. **33**, 1363-1374.
36. **Plikaytis, B., Plikaytis, D., Yakrus, M, A., Butler, R, W., Woodley, C., Silcox, V and Shinnick, T.** Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. 1992. J Clin Microbiol. **30**, 1815-1822.
37. **Reischi, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B, J., Ninet, B., Hirschel, B and Emler, S.** 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. 1998. J Clin Microbiol. **36**, 1761-1764.
38. **Rodicio, M., Mendoza, M.** Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. 2004. Enferm Infecc Microbiol Clin. **22**, 238-245.
39. **September, M, S., Brözel, S, V and Venter, N, S.** Diversity of nontuberculous *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. 2004. Applied and Envir Microbiol. **70**, 7571-7573.
40. **Sewell D.L., Rashad A.L., Rourke JR WJ., Poor SL., McCarthy JAC, Pfaller MA.** 1993. Comparison of the Septi-Chek AFB and BACTEC systems and conventional culture for recover of mycobacteria. J Clin Microbiol. **31**, 2689-2691.
41. **Shinnick, M, T.** The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. 1987. J Bacteriology. **169**, 1080-1088.
42. **Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, D, G and Böttger, C, E.** Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. 1996. J Clin Microbiol. **34**, 296-203.
43. **Steingrube, A. V., Gibson, L, J., Brown, A, B., Zhang, Y., Wilson, W, R., Rajagopalan, M and Wallace, J, R.** PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation on rapidly growing mycobacteria. 1995. J Clin Microbiol. **33**, 149-153.
44. **Soolingen, Van, D.** Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. 2001. J Internal Medicine. **249**, 1-26.

- 45. Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, C, E and Bodmer, T.** Rapid identification of mycobacteria to the species level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. 1993. *J Clin Microbiol.* **31**, 175-178.
- 46. Tortoli, E.** Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. 2003. *Clin Microbiol Rev.* **16**, 319-354.
- 47. Valadas, E.** Nontuberculous mycobacteria: clinical importance and relevance to Bacille Calmette-Guérin vaccination. 2004. *Clin Infect Dis.* **39**, 457-458.
- 48. Vaerewijck, J. M., Huys, G., Palomino, J. C., Swings, J and Portaels, F.** Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. 2005. *Microbiol Rev.* **29**, 911- 934.
- 49. Wallace, R, J., O` Brien, R., Glassroth, J., Raleigh, J and Dutt A.** Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. 1990. *Am Rev Respir Dis.* **142**, 940-953.
- 50. Woods G.L., Witebsky F.G.** Current status of mycobacterial testing in clinical laboratories. 1993. *Arch Pathol Lab Med;* **117**: 876-884.