



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO
TUBERCULOSAS POR PCR-RFLP AISLADAS DEL
SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA EN CIUDAD
UNIVERSITARIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

YAFTÉ YAKÍN GÓMEZ ÁLVAREZ



**TUTORA DE TESIS:
DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL**

Ciudad Universitaria, CD. Mx., 2016



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Gómez
Álvarez
Yafté Yakín
044 55 28 62 57 27
Universidad nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
105000981
2. Datos del asesor
Dra.
Antonia Isabel
Castillo
Rodal
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Yolanda
López
Vidal
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Luis
Servín
González
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Arturo Carlos II
Becerra
Bracho
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Luis David
Alcaraz
Peraza
7. Datos del trabajo escrito
Identificación de micobacterias no tuberculosas por PCR-RFLP aisladas del sistema de distribución de agua de Ciudad Universitaria
70 pp
2016

DEDICATORIA

A mis papás que me han dado una oportunidad de vida. A mi mamá (Karina), por estar siempre a mi lado, guiándome y apoyándome en todos los momentos importantes de mi vida, sin bajar la guardia. Por ser la madre que todos quisieran tener ¡te amo con todo mi corazón mamá!

A mis hermanas Atenas y Fátima porque me demuestran día con día que pelear por tus sueños no es imposible. Las admiro muchísimo y gracias por todo su apoyo hermanas. A mis hermanas adoptivas Laila y Linda por darme mis lengüetazos en esos momentos que más las necesitaba.

A mis abuelitos Roberto y Rosa porque son los abuelitos más consentidores del mundo y porque siempre obran con el ejemplo del amor.

A mi bebé Enya, por brindarme todo tu amor, cuidado y apoyo incondicional. Gracias por impulsarme en los malos y en los buenos momentos y por las experiencias de vida. Te admiro profundamente y agradezco muchísimo todo lo que has hecho por mí. ¡Te amo muchísimo!

A mi papá por apoyarme en mis estudios.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de recibir 12 años de educación y ayudarme a formar un amplio criterio dentro de todos los aspectos que un ser humano pueda poseer.

A la Facultad de Ciencias por ser mi segundo hogar y permitirme estudiar la apasionante carrera de biología.

A la Dra. Yolanda López Vidal por abrirme las puertas en el PIMM, por el apoyo brindado y por permitir adentrarme en el mundo de la investigación.

Al Dr. Fernando González Villareal Director del Programa Universitario de Manejo, Uso y Reúso del Agua en la UNAM (PUMAGUA).

A mi asesora, la Dra. Antonia Isabel Catillo Rodal por su apoyo incondicional y consejos brindados durante la realización de este proyecto.

El proyecto fue financiado por PUMAGUA y el CONACyT-SALUD2010-C01-140998.

A PUMAGUA por el apoyo como becario y al CONACyT por la beca “ayudante de Investigador”, de la Dra. Yolanda López Vidal.

Al Dr. Luis Servín González por darme la oportunidad de pertenecer a un proyecto tan importante y por su asesoramiento en esta tesis.

A la Dra. Patricia Orduña Estrada por tu asesoramiento en el presente trabajo.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a este proyecto y a sus valiosas aportaciones.

A Ramón, Maribel, Leonardo y Jorge por su ayuda en la toma de muestras.

A Rubén Cantú por tu apoyo en la implementación de técnicas moleculares.

A mis compañeros del PIMM por su ayuda brindada en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi asesora, la Dra. Antonia Isabel Catillo Rodal le agradezco infinitamente sus consejos que asesoraron más que una tesis, el haberme abierto la puerta a experiencias de vida que nunca voy a olvidar y ¡por aguantar a un estudiante “rebelde”! Finalmente lo logramos Dra. Antonia.

A mis amigos Paola, Dante, Calito, Claudia, Kary, Sheik, Gerardo, Luis y Pablo que hacen más divertida esta vida.

A la familia completa y en especial mi abuelita Julia. Siempre te tendré en mi corazón. Tíos Alejandro y Verónica los quiero mucho.

A Claudia Mayoral por las experiencias, tu conocimiento, enseñanza y apoyo en el día a día en el laboratorio y fuera de él.

*“Existen derrotas, pero nadie está a salvo de ellas.
Por eso es mejor perder algunos combates en la
lucha por nuestros sueños que ser derrotados sin
siquiera saber por qué se está luchando.”*

Paulo Coelho

ABREVIATURAS

AAR	Ácido Alcohol Resistente
AG	Arabinogalactana
AM	Ácidos Micólicos
ATS/IDSA	Sociedad Torácica Americana/Sociedad de Padecimientos infecciosos de América
BAAR	Bacilos Ácido Alcohol Resistentes
BAR	Bacilos Ácido Rápidos
BLASTn	Herramienta de búsqueda de alineamiento local de nucleótidos
BrEt	Bromuro de etido
CMA	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
CMT	Complejo <i>Mycobacterium terrae</i>
CMTb	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPC	Cloruro de cetilpiridinio
CU	Ciudad Universitaria
DGO y C	Dirección General de Obras y Conservación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FC	Frontón Cerrado
FM	Facultad de Medicina
IE	Instituto de Ecología
I.I.	Instituto de Ingeniería
ITS	Espaciador transcrito interno
LAM	Lipoarabinomanana
LM	Lipomanana
LC	Lento Crecimiento
LJ	Löwenstein-Jensen
M7H10	Middlebrook 7H10
ManLAM	Lipoarabinomanana manosilado
MNT	Micobacteria No Tuberculosa
M7H10	Middlebrook 7H10
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Pares de bases
RC	Rápido crecimiento
PCR-RFLP	Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos largos de los fragmentos de restricción
PG	Peptidoglicano
PIMs	Fosfatidil Inositol Manósidos
PM	Pozo Multifamiliar
PQ	Pozo de Química
PVA	Pozo Vivero Alto
PTAR	Planta de tratamiento de agua residual
PTAR-CA	Planta de tratamiento de agua residual “Cerro del Agua”
PTAR-CP	Planta de tratamiento de agua residual “Ciencias Políticas”
PTE	Planta de tratamiento efluente
PTECA	Planta de tratamiento efluente “Cerro del Agua”
PTECP	Planta de tratamiento efluente “Ciencias Políticas”
PTI	Planta de tratamiento influente

PTICA	Planta de tratamiento influente “Cerro del Agua”
PTICP	Planta de tratamiento efluente “Ciencias Políticas”
PUMAGUA	Programa de Manejo, Uso y Reúso en la UNAM
RHA	Regiones hidrológico-administrativas
RHA-XIII	Región hidrológico-administrativa XIII
SDS	Dodecil sulfato sódico
TA	Tanque Alto
TB	Tanque Bajo
TBE	Tris, borato y EDTA
TVA	Tanque Vivero Alto
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ZN	Ziehl Neelsen

ÍNDICE

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
Clasificación taxonómica del género <i>Mycobacterium</i>	11
Crecimiento de las MNT.....	14
Pared celular de las micobacterias.....	14
Hábitat de las MNT.....	16
Infecciones por MNT en humano.....	17
Presentaciones clínicas del padecimiento por MNT.....	18
Epidemiología de las MNT.....	19
Las MNT en plantas de tratamiento de agua residual.....	20
Las MNT en sistemas de distribución de agua potable.....	21
Identificación molecular de las MNT.....	23
Gen 16S rRNA.....	24
Gen <i>hsp65</i>	25
ITS (16S-23S rRNA).....	25
ANTECEDENTES.....	27
El agua potable en el mundo.....	27
La situación del agua en México.....	27
El agua en la Ciudad de México.....	28
Uso y administración del agua en Ciudad Universitaria.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	32
Objetivos particulares.....	32
Sitio de estudio.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Colección de aislamientos BAAR previos.....	34
Sitios de muestreo.....	34
Colecta de muestras.....	34
Procesamiento de la muestra.....	34
Tratamiento de descontaminación para obtención de MNT.....	35
Aislamiento de MNT.....	35
Obtención de DNA.....	36
Amplificación del gen 16S rRNA.....	36

<i>PCR-RFLP hsp65</i>	36
Secuenciación del gen <i>hsp65</i>	37
<i>PCR-RFLP ITS</i>	37
RESULTADOS.....	39
Colección de aislamientos previos de BAAR	39
Identificación fenotípica de BAAR.....	40
Calidad del DNA de aislamientos BAAR	41
Amplificación del gen 16S rRNA de las MNT	42
Identificación de especies de MNT por PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	43
Identificación de MNT por secuenciación del gen <i>hsp65</i>	45
Identificación de especies de MNT por PCR-RFLP de la secuencia ITS.....	47
Sitios de muestreo.....	49
Tratamientos de descontaminación en agua residual de la PTAR-CA.....	50
MNT en tanques y pozos de agua potable.....	51
MNT en el sistema de distribución de agua de Ciudad Universitaria.....	52
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	59
ANEXOS	60
Medio Middlebrook 7H10	60
Tinción de ZN.....	60
Especies identificadas por <i>hsp65</i> e ITS.....	61
REFERENCIAS	63

RESUMEN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) se encuentran de forma común en el agua, la cual está en constante contacto con el humano. En la actualidad, la literatura sitúa diversos reportes de aislamientos de MNT a lo largo del mundo entre los que se encuentran MNT patógenas en los sistemas de distribución de agua que pueden causar enfermedades. Castillo-Rodal y col., (2011) confirmaron la presencia de MNT en agua potable y en agua residual de los Canales de Xochimilco de la Ciudad de México. Ciudad Universitaria (CU) cuenta con su propio sistema de uso y reúso del agua, en el cual se evalúa la calidad del agua potable que se destina a los usuarios y la calidad del agua de reúso que se implementa en áreas verdes.

En este trabajo se evaluó la presencia y la identificación molecular de MNT en cisternas de agua potable y agua residual, así como plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) de aislamientos de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) obtenidos en el año 2010. En este mismo proyecto se evaluó la presencia de MNT en puntos representativos de la red de distribución de agua potable obtenidos en los años 2013 y 2014. Se identificaron las diferentes especies de MNT por medio de la reacción en cadena de la polimerasa y los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del gen *hsp65* y el espaciador transcrito interno (ITS). El gen *hsp65* identificó un mayor número de aislamientos, no así con la secuencia ITS que solo identificó la mitad. En el año 2010 se identificó por PCR-RFLP la presencia de *M. fortuitum* y *M. terrae* en las cisternas, PTAR-CP y PTAR-CA, mientras que en los años 2013 y 2014 no se obtuvieron aislamientos en los sistemas de distribución de agua potable y en el efluente de agua residual de la PTAR-CA. La identificación por secuenciación del gen *hsp65* de las especies identificadas confirmó las mismas especies identificadas por PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Mycobacterium* se caracterizan por ser bacilos ligeramente curvos a rectos con tamaño de 0.2–0.6 x 1.0–10 µm, aerobios a microaerófilos, ácido alcohol resistentes (AAR), no formadores de esporas, inmóviles, débilmente gram positivos, con presencia de ácidos micólicos con longitud de 60-90 átomos de carbono y con un alto contenido de G+C de alrededor de 57-73 mol% (Sidders, B. & Stoker, N., 2007; Pfyffer & Vincent, 2010; Magee & Ward, 2012).

La filogenia basada en la similitud del gen 16S rRNA muestra que el género *Mycobacterium* es un grupo cercanamente relacionado (Sidders, B. & Stoker, N., 2007) con similitud de 94% o mayor entre sus secuencias (Logan, 1994), lo que sugiere una clasificación biológica (Magee & Ward, 2012) que refleja las relaciones filogenéticas del género (Figura 1).

Clasificación taxonómica del género *Mycobacterium*

Este género está compuesto por especies de vida libre y patógenas oportunistas. De manera taxonómica las micobacterias pertenecen al dominio *Bacteria*, phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Magee & Ward, 2012) y cuenta con un total de 175 especies hasta el año 2016 (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>).

Inicialmente la clasificación taxonómica del género *Mycobacterium* se estableció con base en la comparación de especies de relevancia clínica como *M. tuberculosis*, *M. bovis* (Magee & Ward, 2012) y *M. leprae*, separándolas en aquellas que causan tuberculosis y lepra de aquellas que no lo hacen denominadas Micobacterias no Tuberculosas. Con el paso del tiempo, se identificó un mayor número de especies y el género *Mycobacterium* se clasificó de la siguiente manera: Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTb), el cual agrupa especies con 99.9% de similitud en su genoma y con secuencias 16S rRNA idénticas que son estrictamente patógenas de humanos y/o animales (Brosch et al, 2002) y el cual está conformado por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microtti*, *M. caprae*, *M. africanum* y *M. pinnipedii*;

Mycobacterium leprae, único taxón incultivable con el genoma de menor tamaño en el género (Singh & Cole, 2011) y MNT a aquellos aislamientos de micobacterias ambientales que no pertenecen ni a CMTb ni a *M. leprae* (Pfyffer & Vincent, 2010).

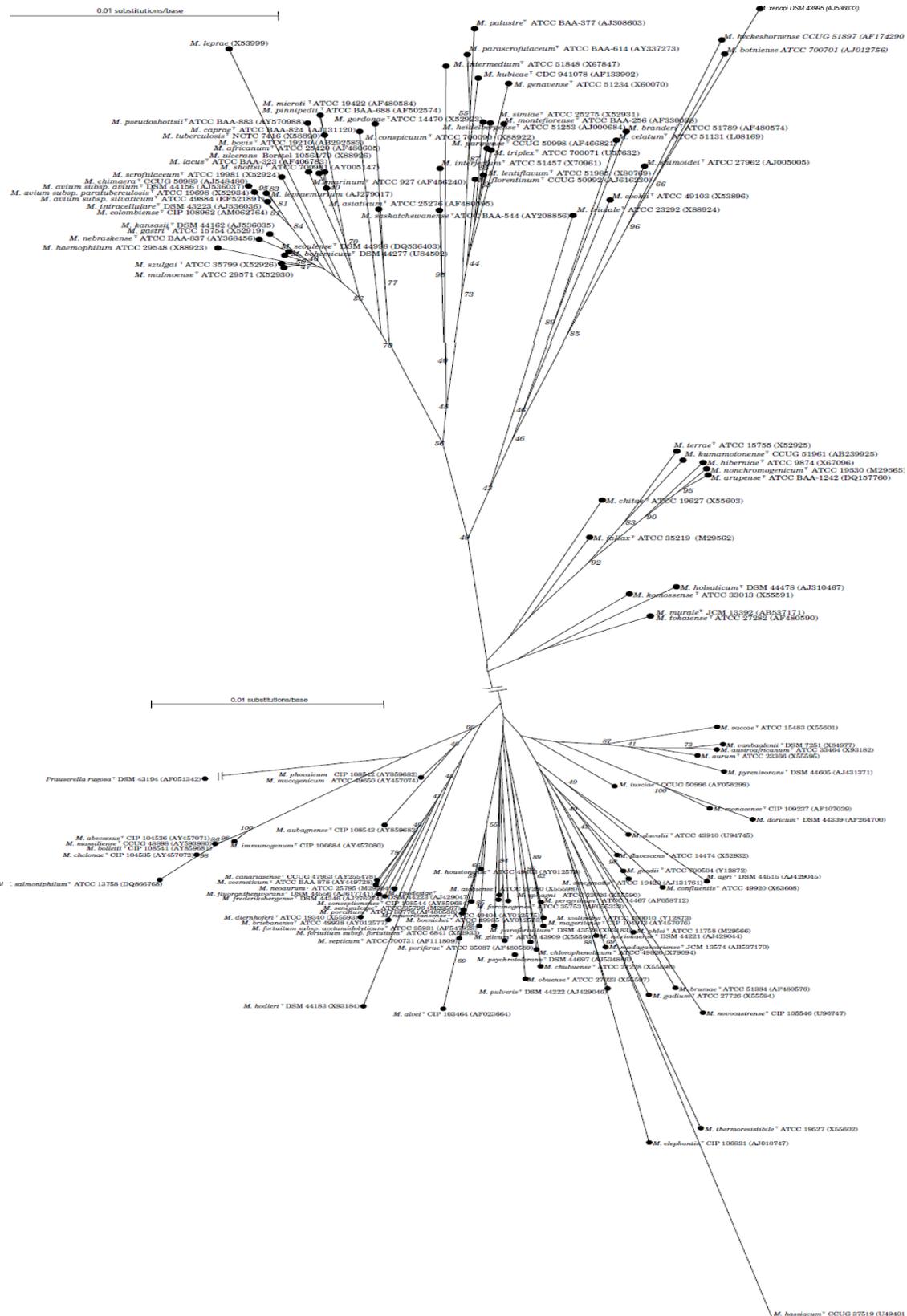


Figura 1. Árbol filogenético del gen 16S rRNA de especies tipo del género *Mycobacterium*. Tomado de Magee & Ward, 2012.

A mediados de los años 50's, Runyon y colaboradores realizaron una clasificación de las MNT basada en la producción de pigmento y velocidad de crecimiento dando lugar a 4 grupos: Los grupos I, II y III comprenden especies de MNT de lento crecimiento y el grupo IV especies de rápido crecimiento (Cuadro 1) (Magee & Ward, 2012). El grupo I agrupa a especies de MNT fotocromógenas las cuales dependen de la presencia de luz para producir pigmentación; el grupo II incluye a las especies escotocromógenas que independientemente de la incidencia de la luz presentan pigmentación en la colonia, mientras que el grupo III lo conforman las especies que no producen pigmentación denominadas no cromógenas. Finalmente, el grupo IV lo conforman las MNT de rápido crecimiento que pueden o no presentar pigmentación (Logan, 1994).

Cuadro 1. Clasificación de Runyon

Clasificación	Pigmentación	Crecimiento
Grupo I.	Fotocromógena	Lento
Grupo II.	Escotocromógena	Lento
Grupo III	No cromógenas	Lento
Grupo IV		Rápido

En la actualidad la taxonomía polifásica establece las bases para resolver satisfactoriamente las relaciones dentro del género *Mycobacterium*. De manera tradicional, la identificación de las MNT se basa en el cultivo, características fenotípicas y pruebas bioquímicas. Sin embargo, a pesar de ser métodos sensibles son poco específicos, además de requerir mucho tiempo para la identificación final. La identificación por métodos moleculares es rápida, sensible y específica y para ello se utilizan diversas secuencias de genes como 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* o secuencias como ITS dentro del género *Mycobacterium*, ya que la mayoría de los taxones se encuentran cercanamente relacionados. Por ello, el uso de la hibridación DNA-DNA de genes conservados y con alto polimorfismo ayuda a la identificación de taxones cercanamente relacionados, dando mayor resolución a nivel especie (Magee & Ward, 2012).

Crecimiento de las MNT

Las micobacterias presentan tiempos de generación que van de 2 a 20 horas (Magee & Ward, 2012), lo que muestra un índice de multiplicidad muy lento comparado con otras bacterias como *Escherichia coli*, debido principalmente a la síntesis de su pared micobacteriana compleja, por lo que los periodos de incubación son de hasta 8 semanas para observar colonias visibles en medios de cultivo (Falkinham III, 2009).

Las micobacterias se clasifican en 2 grupos cercanamente relacionados de acuerdo a su tasa de crecimiento: las especies de rápido crecimiento (RC) son aquellas que presentan colonias visibles en un tiempo menor a 7 días y las especies de lento crecimiento (LC) son aquellas que en las mismas condiciones crecen en un tiempo igual o mayor a 7 días (Magee & Ward, 2012) (Sidders, B. & Stoker, N., 2007). Por otra parte, se ha tratado de asociar el tipo de crecimiento de las micobacterias con el bajo número de operones de *rrn*, ya que inicialmente se estableció que las micobacterias de lento crecimiento solo poseen un operón *rrnA*, mientras que las especies de rápido crecimiento poseen dos copias *rrn* (Pfyffer & Vincent, 2010). Sin embargo, Stadthagen-Gomez *et al.*, (2008) menciona que esta generalización ha sido cuestionada, debido a que hay especies de micobacterias como *M. chelonae* o *M. abscessus* que presentan rápido crecimiento con un solo operón y existen especies de lento crecimiento como *M. terrae* y *M. celatum* que presentan dos operones *rrn* (Cook *et al.*, 2009), por lo que sigue en debate la asociación del número de operones y la tasa de crecimiento en *Mycobacterium*.

Pared celular de las micobacterias

La composición y estructura de la pared micobacteriana son determinantes en la persistencia, resistencia, crecimiento, fisiología y virulencia de las micobacterias (Falkinham III, 2009).

De acuerdo a su estructura, la pared de la micobacteria muestra una capa interna que rodea la membrana celular y una capa externa embebida en la capa interna (Figura 2). La pared micobacteriana se compone de 3 estructuras principales: peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (AM), que en

conjunto forman el complejo PG-AG-AM. El PG se conforma por moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina que se ensamblan sobre la membrana plasmática. El ácido N-acetilmurámico del PG se une de manera covalente al polisacárido AG en su molécula de arabinosa y, por otra parte, se une en su parte externa por enlaces esterificados AM, compuestos por cadenas largas de ácidos grasos α -alquil, β -hidroxi de 60 a 90 carbonos (C₆₀-C₉₀) que constituyen cerca de la mitad del peso seco de la estructura basal de la pared. Los AM le proporcionan identidad a la micobacteria, ya que cada especie muestra un número diferente de carbonos dentro de su estructura, por lo que son utilizados en la determinación taxonómica de especies. Los AM contribuyen a la impermeabilidad de la micobacteria y ayudan en la identificación microscópica de micobacterias por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN), en el cual resisten la decoloración con alcohol-ácido (Sidders, B., & Stoker, N. G., 2007; Hett & Rubin, 2008; Falkinham III, 2009; Rao & Mena, 2010; Jackson, 2014; Jankute *et al.*, 2015).

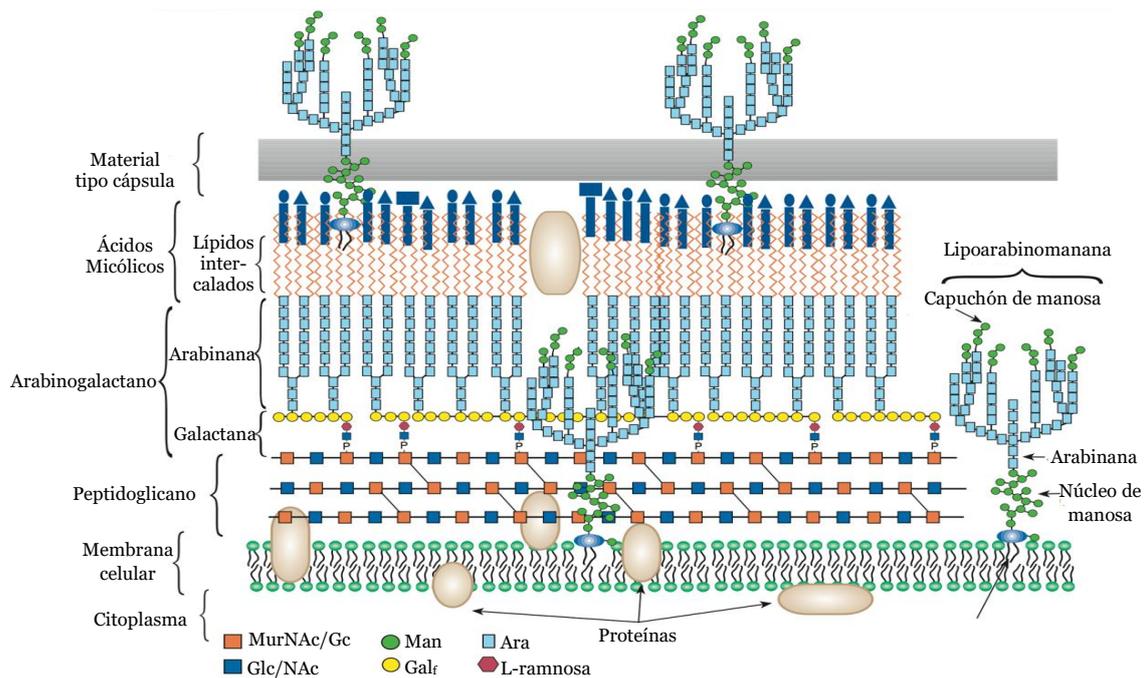


Figura 2. Estructura de la pared celular de las micobacterias. Las capas del interior al exterior son: citoplasma, membrana celular, complejo PG-AG-AM (peptidoglicano, arabinogalactano, ácidos micólicos), lípidos intercalados y material tipo cápsula.

Por otra parte, la capa externa de la pared micobacteriana se conforma por proteínas y lípidos embebidos en los AM de la pared celular. Se encuentran glucolípidos como lipoarabinomanana (LAM), lipomanana (LM) o fosfatidilinositol

manósidos (PIMs), los cuales se intercalan sin unión covalente entre los componentes estructurales de la capa interna basal. LAM se ha asociado con el crecimiento y virulencia de la micobacteria, mientras que PIMs, LM y variantes de LAM como lipoarabinomanana manosilada (ManLAM) juegan un papel fundamental en la permeabilidad, integridad de la membrana interna y la regulación de la división celular. Por último, en el compartimento más externo de la pared se encuentra una estructura débilmente unida referida como material tipo cápsula, conformado en 97% por proteínas y polisacáridos, con una porción del 3% de lípidos. (Hett & Rubin, 2008; Rao & Mena, 2010; Angala *et al.*, 2014; Jackson, 2014; Jankute *et al.*, 2015).

Hábitat de las MNT

Las MNT se han aislado de diversos hábitats, principalmente en el agua de ríos y lagos y en suelos de pantanos y turberas, aunque también se han aislado de algunos ambientes como bosques boreales. La mayoría de las especies de MNT son saprobias de vida libre que crecen tanto en condiciones aerobias como en ambientes microaerófilos, con temperaturas que oscilan de 28 a 60°C dependiendo de la especie y a pH ácido en lugares con altas concentraciones de materia orgánica (Falkinham III, 2009).

Las micobacterias requieren fuentes de carbono, nitrógeno y hierro para su crecimiento. La fuente de carbono que utilizan las micobacterias es obtenido a partir de carbohidratos, ácidos orgánicos como el fúlvico, húmico, pirúvico, acético, cítrico, oleico, palmítico, de hidrocarburos, CO₂ y glicerol, encontrados en la materia orgánica. Aunque las micobacterias necesitan del carbono para su crecimiento pueden crecer en condiciones de oligotrofia dentro de ambientes con bajos niveles de carbono orgánico asimilable de hasta 50µg x ml⁻¹. Además, requieren de una fuente de nitrógeno que obtienen de aminoácidos como asparagina o glutamina, así como de una fuente obligada de hierro, obtenida por medio de agentes quelantes solubles en agua llamados exoquelinas y de micobactinas, que ayudan a una eficiente obtención del Fe⁺ (Sidders, B. & Stoker, N., 2007), (Pfyffer & Vincent, 2010), (Magee & Ward, 2012), (Falkinham III, 2015).

La hidrofobicidad de la pared de la micobacteria juega un papel importante en la adherencia a superficies y resistencia a agentes antimicrobianos. En primer lugar, la adherencia a superficies favorece la concentración de las micobacterias en interfaces agua-aire, agua-partícula o agua-superficie en lugares con alta concentración de materia orgánica y evita el arrastre por corrientes de agua. Por otra parte, la pared de la micobacteria impide el ingreso de agentes antimicrobianos que puedan eliminar a la misma, confiriéndoles resistencia y permanencia en el hábitat y además le favorece en la formación de biopelículas bajo condiciones adversas, lo que les permite la selección frente a otros microorganismos. De esta manera, las micobacterias se adaptan a diversas condiciones en el ambiente, lo que permiten su presencia y distribución tanto en hábitats naturales como artificiales (Falkinham III, 2009).

Infecciones por MNT en humano

Además de existir especies de micobacterias saprobias de vida libre, también existen especies patógenas obligadas y potencialmente patógenas u oportunistas. Las especies patógenas son aquellas que causan micobacteriosis en humanos y en especies particulares de animales. Por otro lado, se consideran micobacterias potencialmente patógenas u oportunistas a aquellas que se encuentran de forma común en el ambiente, no obstante, pueden colonizar nichos adecuados como mucosas dentro de hospederos susceptibles de animales y humano. Hay especies de MNT tanto de RC como de LC que causan patología en humano, aunque son las especies de LC las que se aíslan con mayor frecuencia. Las principales especies patógenas y potencialmente patógenas de LC que se han aislado en humano son *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* y *M. malmoense*, mientras que las especies de RC que se aíslan con mayor frecuencia son *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. abscessus* y que se asocian a infecciones nosocomiales (Kazda, 2010; Magee & Ward, 2012; Falkinham III, 2013; Guglielmetti, 2015).

Hasta el momento no se ha descrito transmisión de las MNT de humano a humano, por lo que se ha propuesto que la exposición en una ubicación espacio-temporal común en el ambiente entre el humano y las MNT, es la causa principal de la exposición y adquisición de padecimientos por estas. Algunas de las rutas

de transmisión propuestas son por deglución, la inoculación directa en heridas cutáneas o la inhalación de aerosoles. La colonización a largo plazo y una dosis infectiva grande, influyen en la adquisición del padecimiento con MNT (Piersimoni & Scarparo, 2008; Pfyffer & Vincent, 2010; Saleeb & Olivier, 2010; Falkinham III, 2015).

Presentaciones clínicas del padecimiento por MNT

El padecimiento por MNT se observa tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes y se presenta en diversos cuadros clínicos con tropismo en diferentes órganos corporales que causa daño, ya sea pulmonar en 90% de las ocasiones o extrapulmonar en un 10% (Piersimoni & Scarparo, 2009; Guglielmetti, 2015).

En primera instancia, la presentación clínica más común es la infección pulmonar, donde se da la infección del tracto respiratorio por la entrada al organismo de MNT vía aerosoles hasta llegar a bronquios y alveolos. Se han descrito condiciones y factores de riesgo que pueden conducir a la adquisición de padecimiento pulmonar por MNT como alteración de la arquitectura pulmonar, padecimiento pulmonar preexistente, alteraciones en el sistema inmune, alcoholismo y tabaquismo, deficiencia en el gen codificante a α -1-tripsina y fibrosis quística en individuos heterocigotos en el gen CTFR (Piersimoni & Sacarparo, 2008; Saleeb & Olivier, 2010; Henkle & Winthrop, 2015; Falkinham III, 2016).

De manera extrapulmonar las MNT producen linfadenitis en nódulos linfoides de niños inmunocompetentes menores de 5 años principalmente por especies como del Complejo *Micobacterium avium* (CMA), *M. scrofulaceum* y *M. malmoense*, infecciones diseminadas en individuos inmunosuprimidos de forma severa por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y en raras ocasiones en pacientes con catéteres o implantes. La mayoría de las infecciones diseminadas en pacientes con VIH son causadas por el CMA y por MNT de RC como *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae* en el caso de catéteres e implantes. Además, pueden ocasionar infecciones de piel y tejidos blandos, que se dan por la inoculación directa en heridas cutáneas, especialmente por especies como *M. marinum* en la mayoría del hemisferio norte y *M. ulcerans* en regiones tropicales y

subtropicales. No obstante, las infecciones cutáneas por MNT pueden ocurrir como brotes en personas inmunocompetentes por procedimientos cosméticos con MNT de RC. Finalmente, especies como *M. kansasii* y micobacterias del complejo *M. terrae* (CMT) como *M. arupense*, *M. nochromogenicum* y *M. terrae*, pueden provocar padecimientos osteoarticulares en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes por procedimientos quirúrgicos (Piersimoni & Scarparo, 2009; Guglielmetti, 2015).

Epidemiología de las MNT

Se ha observado que las infecciones por MNT muestran un incremento en países desarrollados donde los casos de tuberculosis han disminuido (Piersimoni, 2008; Saleeb & Olivier, 2010; Guglielmetti, 2015).

En un reporte de la Sociedad Torácica Americana y la Sociedad de Padecimientos Infecciosos de América (ATS/IDSA) elaborado por Griffith y colaboradores, (2007), señalan que los padecimientos por MNT se presentan en la mayoría de los países desarrollados, con tasa de incidencia estimada entre 1 a 1.8 casos por cada 100,000 habitantes, basado en el reporte del número de aislamientos de MNT hasta ese año. Es importante señalar que los padecimientos con MNT no son de reporte obligatorio, por lo que la epidemiología de las MNT es subestimada (Daley & Griffith, 2010).

La incidencia y prevalencia de las infecciones por MNT varía de manera significativa de acuerdo a los diferentes estudios, debido en gran medida al uso de diversas metodologías diagnósticas y a diversas poblaciones (Daley & Griffith, 2010). Sin embargo, diversos reportes señalan que la incidencia y prevalencia del padecimiento por MNT va en aumento. Dos estudios llevados a cabo en Óregon, Estados Unidos, evaluaron la incidencia y prevalencia de la infección pulmonar por MNT en dos periodos distintos. El primer estudio conducido entre los años 2005 y 2006 por Cassidy *et al.*, (2009) mostró que la incidencia de infecciones por MNT fue de 7.2/100,000 y que la enfermedad pulmonar tuvo una prevalencia de 5.6/100,000, principalmente por el CMA (84%). Comparando este estudio con un segundo conducido por Henkle y colaboradores, (2014), se observa que tanto la incidencia en el año 2012 (5.6/100,000) como la prevalencia

de la enfermedad pulmonar entre los años 2011 y 2012 (5.9/100,000) arroja resultados similares y el agente causal principal fue CMA.

En México existen pocos estudios que reportan infecciones por MNT. Pérez-Martínez y colaboradores, (2013) muestra que el 37% de las 97 micobacterias aisladas en pacientes con inmunodeficiencias pertenecían a especies de MNT de *M. avium*, *M. simiae*, *M. kansasii* y *M. goodnae*. De acuerdo a la Secretaría de Salud en su reporte del 2014, la incidencia y la prevalencia de las infecciones por MNT en México es limitada. A pesar de ser un país en vías de desarrollo con un ambiente propicio para la existencia de las MNT el diagnóstico y tratamiento de las infecciones por Micobacterias No Tuberculosas, no es de reporte obligatorio.

Las MNT en plantas de tratamiento de agua residual

En la actualidad, el agua residual es reutilizada de manera común como alternativa a la escasez de agua dulce debida a la urbanización, al crecimiento demográfico y probablemente, a los cambios climáticos. Para poder ser reutilizada, el agua residual se trata bajo parámetros que garanticen la salud humana dentro de plantas de tratamiento. Estas utilizan mecanismos para tratar el agua residual como la coagulación, floculación, sedimentación, filtración de arenas y oxidación química con la finalidad de eliminar diversos componentes y microorganismos presentes en el agua residual. Sin embargo, a pesar de los tratamientos, en muchos de los casos persisten algunos microorganismos en el agua de reúso como las MNT (OMS, 2015).

Existen estudios que evalúan la presencia y remoción de las micobacterias en agua residual tratada en plantas de tratamiento. Zeng y colaboradores, (2013), realizaron una evaluación de la presencia de los microorganismos en los diferentes procesos dentro de una planta de tratamiento en Shanghái, China y encontraron que el phylum *Actinobacteria* junto con *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* fueron las secuencias más abundantes y el orden *Actinomycetales* fue el que mayor presencia tuvo en todo el proceso dentro de los tratamientos. Además, observaron que, a pesar de disminuir la carga de microorganismos en el punto de salida de la planta de tratamiento, la carga micobacteriana

incrementó en la salida de las tuberías, lo que asociaron al recrecimiento de las micobacterias. Los autores concluyen que la presencia de microorganismos después de los tratamientos es debido a la ineffectividad de los métodos empleados en los microorganismos de pequeño tamaño y a la formación de biopelículas. Por otra parte, un estudio realizado en Colombes, Francia por Radomski y colaboradores, (2011), en el que evaluaron la remoción de *Mycobacterium* en distintos puntos en una planta de tratamiento de agua residual, mostraron altos niveles de *Mycobacterium* en agua residual previo a tratamiento. Sin embargo, se produjo una significativa disminución en el tratamiento decantación físico-química, aunque aún se cuantificó presencia de *Mycobacterium*. Finalmente, *Mycobacterium* se halló en baja proporción en lodos y en nula proporción bajo el tratamiento de filtración biológica.

Las MNT en sistemas de distribución de agua potable

Además de haberse encontrado la presencia de MNT en agua residual y agua residual tratada, también se han aislado de los sistemas de distribución de agua potable (EPA, 1999), los cuales son sistemas artificiales que conducen y distribuyen el agua extraída y/o almacenada hasta el punto de entrega a diversos usuarios.

En los sistemas de distribución de agua potable se agregan sustancias como cloro, cloraminas u ozono con la finalidad de eliminar la presencia de diversos microorganismos. No obstante, en diversas ocasiones se encuentra la presencia de MNT, ya que se ha mostrado que las MNT son resistentes a métodos de desinfección como cloro, siendo hasta 40 veces más resistente que *Pseudomonas aeruginosa* o 100 veces más resistente que *Escherichia coli* (Falkinham III, 2015). Wang y colaboradores, 2012, identificaron los patrones de presencia entre *M. avium*, *Legionella pneumophila* y *P. aeruginosa* en dos sistemas de distribución de agua clorados en Virginia, Estados Unidos. Los autores encontraron que las cloraminas favorecen la presencia de *Mycobacterium spp.*, ya que se mostraron altas tasas de detección de *Mycobacterium spp.* y de *Legionella spp.*, en ambos sistemas. De igual manera observaron que la toma de muestra posterior al lavado de 3 minutos es una muestra significativa del sistema de distribución de agua, aunque disminuye la

densidad de detección de *Mycobacterium spp.* en comparación con la toma directa sin lavado que muestra el estado inicial de la tubería.

Existen diversos estudios que muestran la presencia de las MNT en los sistemas de distribución de agua, como el realizado por Castillo-Rodal y colaboradores, (2011), en el cual evaluaron la presencia de MNT en 3 sistemas acuáticos en México. El grupo encontró MNT en 2 de 3 sistemas: en los sistemas de distribución de agua del área metropolitana de la Ciudad de México se registró la presencia de 4 especies de MNT (*M. peregrinum*, *M. arupense*, *M. nonchromogenicum* y *M. gordonae*) y en agua residual de los canales de Xochimilco se encontró la presencia de 14 especies de MNT, entre ellas *M. avium* y *M. fortuitum*. Otro estudio, realizado por Pérez-Martínez y colaboradores, (2013), en donde se evaluó la ocurrencia de las MNT en agua potable de hogares de fuente subterránea y superficial de la Ciudad de México, encontró la persistencia de MNT, principalmente especies de *M. mucogenicum*, aunque también de *M. avium* y *M. fortuitum*, pese a que el agua cumplía con los parámetros microbiológicos establecidos en la norma mexicana de calidad de agua. Los autores sugieren una posible correlación entre las condiciones del ambiente acuático en el que son aisladas las MNT y las especies de MNT presentes.

La presencia de biopelículas en los sistemas de distribución de agua es un factor que ha sido asociado a la presencia de las MNT. Feazel y colaboradores, (2009), analizaron la presencia de biopelículas en regaderas en diversas ciudades de Estados Unidos y encontraron de manera principal secuencias de MNT en comparación con otros grupos filogenéticos de bacteria, siendo *M. gordonae* y *M. avium* las especies predominantes. Por otra parte, Liu y colaboradores, (2012), evaluaron la presencia de comunidades microbianas en biopelículas de grifos de tres sistemas de distribución de agua potable. Los autores encontraron que las *Actinobacterias* fueron el segundo grupo dominante en formación de biopelículas y mostraron mediante un análisis de componentes principales la asociación de la abundancia del género *Mycobacterium* con la resistencia a cloro y cloraminas, por lo que sugieren que el cloro podría ayudar a la selección de *Mycobacterium* en biopelículas de grifos. Finalmente, Briancesco y colaboradores, (2015), describieron la presencia de MNT en agua potable y superficial de sistemas de distribución de agua de edificios, hospitales, albercas

y medidores de agua. Los autores demostraron la presencia de varias especies de MNT en todos los lugares, siendo *M. terrae*, *M. intracellulare* y *M. mucogenicum* las más frecuentes. La calidad del agua cumplía con los requerimientos microbiológicos en las normas de calidad europea de agua en 98% de los casos, por lo que concluyen que lo más probable es que los aislamientos de MNT se deban a la presencia de biopelículas.

Otro estudio, realizado por Falkinham III, (2011), correlaciona las infecciones causadas por MNT con los sistemas de distribución de agua y su distribución geográfica. Se demostró que las MNT aisladas de agua potable de tuberías caseras y las identificadas en los pacientes presentaron en 41% de los casos los mismos perfiles de DNA.

Identificación molecular de las MNT

Para la identificación de las micobacterias se utilizan dos metodologías: la tradicional y la molecular. El tradicional está basado en métodos de aislamiento en medios de cultivo líquidos como Middlebrock 7H9 (M7H9) y sólidos como Löwenstein-Jensen (LJ) y Middlebrook 7H10 (M7H10), donde se reporta la morfología colonial y microscópica, se implementan tinciones como ZN y la aplicación de pruebas bioquímicas. No obstante, los métodos tradicionales tienen como limitante que son tardados y poco específicos en la identificación de especies de MNT por lo que, en la actualidad se utilizan métodos moleculares basados en la amplificación del DNA o RNA que proporcionan mayor rapidez, sensibilidad y especificidad directamente de las muestras (Neonakis *et al.*, 2008).

El fundamento de la taxonomía genotípica se basa en la detección de regiones altamente conservadas con secuencias hipervariables o polimórficas dentro del genoma, en las que ocurren deleciones, inserciones o reemplazamientos específicos en los nucleótidos de las especies (Tortoli, 2003). Uno de los métodos moleculares que se ha utilizado es el polimorfismo de los fragmentos largos de restricción acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa PCR (PCR-RFLP) por sus siglas en inglés, que identifica especies de micobacterias mediante la amplificación de secuencias y genes conservados con presencia de polimorfismos y posterior restricción de los mismos (Halstrom, 2013).

Las secuencias más utilizadas para la identificación de *Mycobacterium* son las del gen 16S rRNA y el elemento de inserción IS6110. Sin embargo, se han utilizado otras secuencias para la identificación de MNT como la proteína de choque térmico *hsp65*, la región espaciadora transcrita interna (ITS o 16S-23S rRNA) y el gen *rpoB*, entre otras. Las diversas secuencias se han utilizado de manera única en la identificación de especies. No obstante, la implementación de 2 o más secuencias permite una mejor identificación (Telenti y col., 1993; Roth y col., 2000; Neonakis, 2008).

Gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA (Figura 3) es una secuencia de 1500 nucleótidos que codifica a la subunidad 16S del RNA ribosómico, que forma bucles o hélices al plegarse en su estructura secundaria y que contiene dominios género específicos altamente conservados junto con regiones variables especie específicos (Tortoli, 2003).

Este gen es utilizado para la clasificación taxonómica bacteriana debido a que posee un reloj molecular lento, lo que indica que las especies con secuencias similares tienen menor tiempo de divergencia. De esta manera, las especies del género *Mycobacterium* están estrechamente relacionados entre sí y solo difieren por algunos pares bases. Sin embargo, se han utilizado la región V2 (hélices 8, 9, 10 y 11) y V3 (hélice 18) del gen 16S rRNA de micobacterias, ubicadas con referencia a *E. coli* en las mismas posiciones del gen 16S rRNA de su genoma, donde las primeras 500 pares de bases (pb) del extremo 5' de gen 16S rRNA de *Mycobacterium* son utilizadas con la finalidad de identificar especies. Por una parte, la región hipervariable A, cuya secuencia comprende las posiciones 130 a 210, es usada de manera común para la identificación, mientras que la secuencia de la región hipervariable B, ubicada entre 430 a 500 pb, es utilizada en algunos casos como confirmatoria (Patel *et al.*, 2000; Harmsem *et al.*, 2003; Tortoli, 2003; Cristea-Fernström *et al.*, 2007; Neonakis, 2008; Skrypnyc, 2009; Pfyffer & Vincent, 2010).

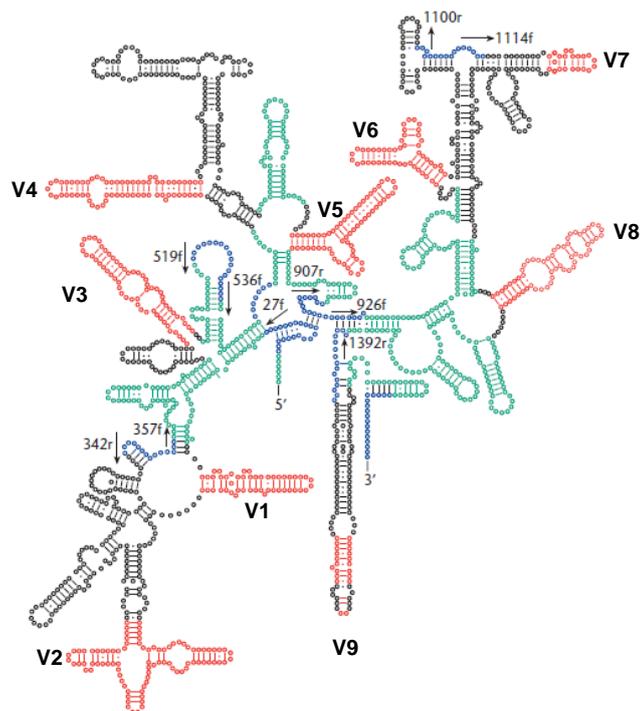


Figura 3. Modelo de la estructura secundaria del gen 16S rRNA. Las regiones hipervariables se muestran en color rojo, las regiones altamente conservadas se muestran en color verde, los sitios de unión de los oligonucleótidos que se utilizan de manera común en la amplificación se muestran en color azul con flechas que indican la dirección de amplificación y los nucleótidos en negro son las pares de bases restantes. Las regiones mayores variables se indican de V1 a V9.

Gen *hsp65*

El gen *hsp65* codifica a la proteína de choque térmico *GroELII* de 65 kDa (Neonakis *et al.*, 2008). Es un gen conservado que presenta mayor polimorfismo que el gen 16S rRNA en regiones hipervariables dentro de su secuencia en las posiciones 624 a 664 y 683 a 725 tomando como referencia el gen en *M. tuberculosis* (Tortoli, 2003). El gen *hsp65* ha sido ampliamente utilizado en la identificación taxonómica de especies de MNT desde que Telenti y colaboradores en 1993 amplificaron por PCR un fragmento con longitud de 439 pb o fragmento de Telenti, y lo sometieron a restricción con las enzimas *BstEII* and *HaeIII* para identificar a diversas especies de MNT.

ITS (16S-23S rRNA)

La secuencia ITS conocida como espaciador transcrito interno o ITS por sus siglas en inglés es una región que se ubica dentro el operón *rrn* entre los genes 16S rRNAs y 23S rRNA que se presenta en 1 o 2 copias de 210 a 350 pb en el genoma entre las especies de *Mycobacterium* dependiendo de la especie. La

secuencia ITS tiene un mayor poder discriminatorio que la región 16S rRNA, ya que se encuentra conservada en menor medida que el gen 16S rRNA y al mismo tiempo presenta una alta tasa de polimorfismo entre las especies, por lo que ha sido utilizada a nivel taxonómico para la identificación de diversas especies de MNT, de manera principal en taxones cercanamente relacionados (Gürtler & Stanisich, 1996; Roth et al, 1998; Tortoli, 2003; Magee & Ward, 2012; Pourahmad & Richards, 2013).

La secuencia ITS se ha utilizado en diversos trabajos para la identificación de especies de MNT con ayuda de diversas enzimas de restricción. Roth y colaboradores, (2000), elaboraron un algoritmo con la secuencia ITS por medio de PCR-RFLP, en el cual evaluaron 7 enzimas de restricción para la identificación de diferentes MNT. Los autores sitúan a *HaeIII* y *CfoI* como la combinación de enzimas que ayudó a identificar el mayor número de MNT. Por otra parte, Gürtler y colaboradores, (2006) utilizaron la secuencia ITS para la elaboración de un algoritmo in silico para la identificación de 31 especies de MNT de LC con 12 enzimas de restricción. Estudios más recientes como el de Pourahmad y Richards en 2013 utilizaron la secuencia ITS junto con las enzimas *HaeIII* y *Sau96I* en la identificación de MNT aisladas en peces, mientras que Velayati *et al.*, 2014 utilizó la secuencia ITS con las enzimas *HaeIII* y *CfoI* para evaluar la prevalencia de MNT en suelo y agua de Therán, Irán.

ANTECEDENTES

El agua potable en el mundo

El agua es un recurso esencial para todos los seres vivos y su suministro satisfactorio debe ser disponible para todos (OMS, 2011). El acceso a agua potable de buena calidad es un derecho humano básico y un componente de política efectiva para la protección de la salud. De acuerdo a la OMS, todas las personas tienen derecho a disponer de forma continuada de agua suficiente, salubre, físicamente accesible, asequible y de una calidad aceptable, para uso personal y doméstico. No obstante, en la actualidad la escasez de agua va en aumento, debido al crecimiento poblacional, al desarrollo urbanístico y al aumento del uso del agua con fines industriales y domésticos (OMS, 2015).

En el año 2015, el 91% de la población mundial tenía acceso a una fuente mejorada de abastecimiento de agua potable. Sin embargo, se calcula que de aquí a 2025 la población mundial vivirá en zonas de escasez de agua, por lo que estrategias como la reutilización de aguas residuales se está convirtiendo en una opción importante. Por ello, medidas como el saneamiento y la gestión de los recursos hídricos evita la producción de enfermedades y promueve la disponibilidad y reutilización del agua. Sin embargo, en algunos casos a pesar de que la fuente de abastecimiento es buena, el agua puede contaminarse durante el transporte o almacenaje, en particular en entornos en los que el saneamiento no es adecuado (OMS, 2015).

La situación del agua en México

México se administra en 13 regiones hidrológico-administrativas (RHA), formadas por agrupaciones de cuencas, distribuidas de manera heterogénea por el territorio nacional y que se ubican de manera geográfica en sur, sureste, norte, noroeste y centro (Figura 4). La menor parte de la población se localiza en la región sureste que cuenta con el 67% del agua renovable mientras que la región norte, noroeste, centro cuenta con la mayor parte de la población y dispone del 33% del agua renovable en el país, lo que implica el uso eficiente, conservación y reúso del agua en esta región del país debido a una menor disposición de este

recurso. CONAGUA estimó que la cobertura nacional de acceso a agua potable de la población en 2014 fue de 92.4%.

En las últimas décadas ha aumentado de manera considerable la población del país en las ciudades promoviendo el incremento del consumo de agua potable y generando un aumento en el volumen de aguas residuales. En la actualidad, México cuenta con 2337 plantas de tratamiento de agua residual municipal, no obstante, solo el 37% de los municipios da algún tratamiento al agua residual (CONAGUA, 2015).



Figura 4. Regiones hidrológico-administrativas de México.

Fuente: CONAGUA, 2015

El agua en la Ciudad de México

La región hidrológico-administrativa XIII (RHA XIII) denominada Aguas del Valle de México se ubica en el centro del país y posee un bajo índice de agua renovable per cápita de 150 m³/hab/año, lo que indica una condición de escasez de agua. De manera individual, la Ciudad de México pertenece a la RHA XIII y cuenta con índice de agua renovable de 54 m³/hab/año. A pesar del bajo índice de agua renovable, se registró en 2015, que el 96.79% de la población de la RHA XIII tiene acceso al agua potable y en 2013, que el 99.2% de la población de la Ciudad de México tuvo acceso al agua potable (CONAGUA, 2015).

En la actualidad, el Sistema Cutzamala abastece con agua potable 11 delegaciones de la Ciudad de México, aportando el 17% del abastecimiento para todos los usos de la Cuenca del Valle de México y se complementa con el Sistema Lerma (5%), con la extracción de agua subterránea (68%), con ríos, manantiales (3%) y reúso del agua (13%). Por otra parte, en la Ciudad de México se registraron 139 plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) en la región hidrológico-administrativa XIII, sin embargo, el tratamiento de aguas residuales en la cuenca del Valle de México representa apenas el 10% (CONAGUA, 2015).

Uso y administración del agua en Ciudad Universitaria

En el año 2008, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) puso en marcha el Programa de Manejo Uso y Reúso de Agua (PUMAGUA), con el objetivo de implantar un programa de manejo, uso y reúso del agua en la UNAM con la participación de toda la comunidad universitaria (PUMAGUA, 2008). Las metas establecidas de este programa fueron reducir el consumo de agua potable al 50%, mejorar la calidad del agua potable y del agua tratada para que cumpla con las normas aplicables y fomentar la participación de la comunidad universitaria en el uso responsable del agua.

El campus Ciudad Universitaria de la UNAM está conformado por una población aproximada de 250,000 usuarios diarios (Martínez, 2016) y comprende una infraestructura hidráulica conformada por pozos, tanques, cisternas, red de distribución de agua potable con el fin de suministrar agua potable a los usuarios de las instalaciones. Además, cuenta con plantas de tratamiento que procesan aguas tratadas con la finalidad de que sean reutilizadas en sanitarios o en el riego de las áreas verdes.

La extracción de agua potable se obtiene de 3 pozos: Pozo I de Química (PQ), Pozo II Multifamiliar (PM) y Pozo III Vivero Alto (PVA) y el almacenamiento de la misma se deposita en 3 tanques: Tanque Alto (TA), Tanque Bajo (TB) y Tanque Vivero Alto (TVA). El agua potable se distribuye por la red de distribución de agua potable a los diversos edificios del campus, en los que los usuarios tienen acceso.

Por otra parte, Ciudad Universitaria presenta una red de alcantarillado y drenaje que recoge agua residual y pluvial y la conduce a 3 PTAR: planta de tratamiento de agua residual “Cerro del Agua” (PTAR-CA), planta de tratamiento de agua residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales (PTAR-CP) y planta de tratamiento de agua residual del Instituto de Ingeniería (Cázares, 2014).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la ubicuidad y exposición a especies de MNT en los sistemas de distribución de agua, al aislamiento previo de MNT en los sistemas de distribución de agua de la Ciudad de México y al incremento de reportes de infecciones causadas por MNT, es necesario evaluar la presencia de estas en los sistemas de distribución de agua de Ciudad Universitaria. La implementación PCR-RFLP con el gen *hsp65* y la secuencia ITS ayudarán a la identificación de las especies de MNT presentes en los sistemas de distribución de agua potable, agua tratada y agua residual tratada de Ciudad Universitaria.

OBJETIVO GENERAL

Identificar especies de MNT en los sistemas de distribución de agua potable y agua de reúso de Ciudad Universitaria basado en el PCR-RFLP de *hsp65* e ITS.

Objetivos particulares

- ☞ Muestreo y aislamiento de BAAR en agua potable y agua de reúso en CU.
- ☞ Identificar con el gen *hsp65* y la secuencia ITS aislamientos previos de MNT en Ciudad Universitaria.
- ☞ Identificar con el gen *hsp65* los aislamientos BAAR positivos.
- ☞ Identificar con la secuencia ITS los aislamientos BAAR positivos.

Sitio de estudio

El campus CU (Figura 5) de la Universidad Nacional Autónoma de México se localiza en las coordenadas 19° 19' 56" N y 99° 11' 17" O en el suroeste del Valle de México, en el Pedregal de San Ángel, en la Ciudad de México (UNESCO, 2006). Tiene una superficie de 730 hectáreas y una altitud entre 2278 y 2340m sobre el nivel del mar, con clima templado y estaciones definidas con lluvias en verano y secas en invierno y primavera (Cázares, 2014).

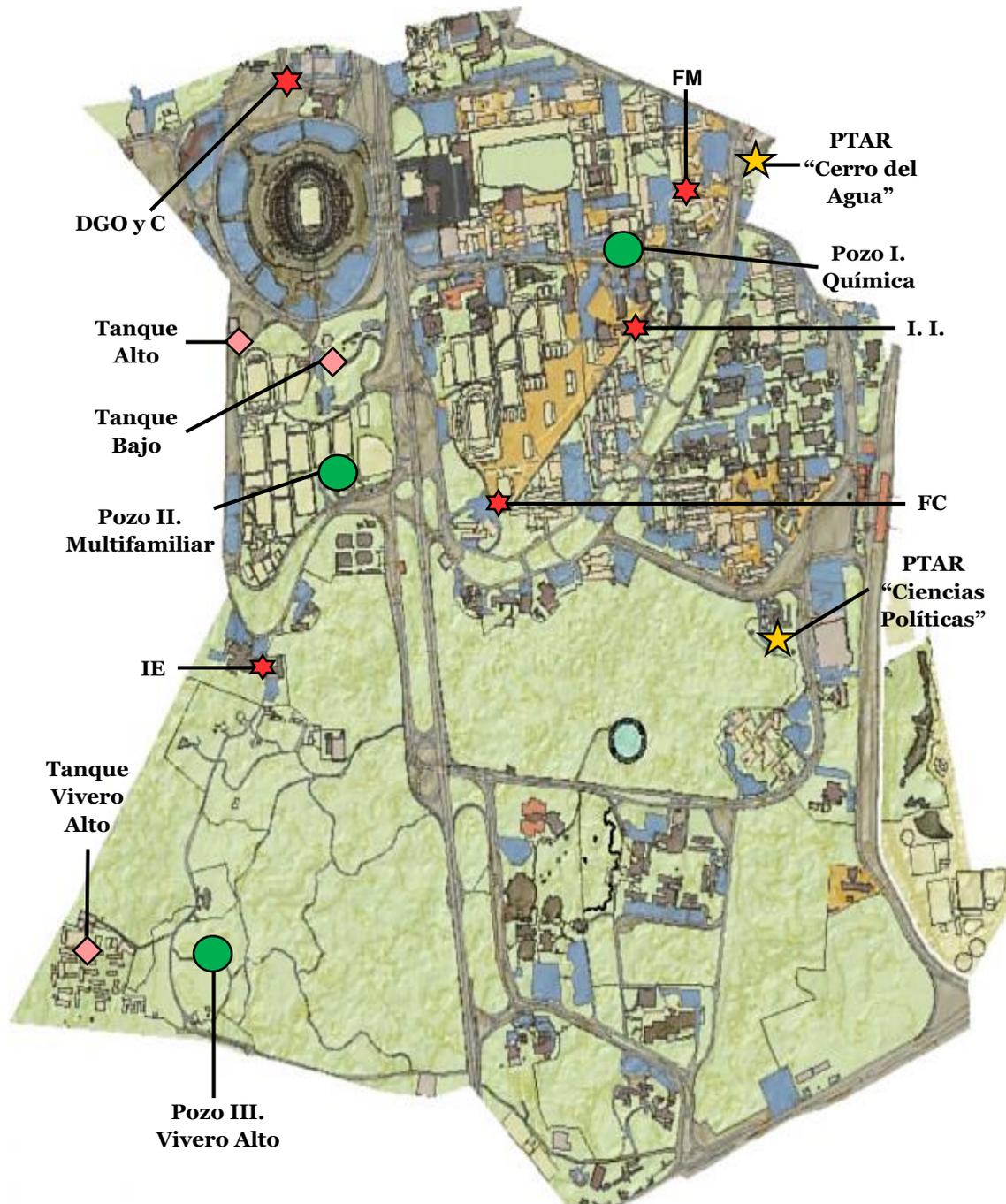


Figura 5. Ubicación de los puntos muestreados de la PT y RDAP en C.U.

Fuente: Tomado y modificado de PUMAGUA, UNAM

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de aislamientos BAAR previos

Se partió de una colección de 72 aislamientos previos de BAAR del año 2010, provenientes de 1 cisterna de agua potable, 3 cisternas de agua residual tratada y del influente y efluente de 2 plantas de tratamiento PTAR-CP y PTAR-CA, a los cuales se les realizó tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.

Sitios de muestreo

Se realizó el muestreo de 3 pozos (PQ, PM y PVA) y de 3 tanques de agua potable (TA, TB y TVA). Por otra parte, se realizó el muestreo de 5 tomas de agua de puntos de abastecimiento de agua potable dentro de la red de distribución de agua potable en CU, que comprenden: la Dirección General de Obras y Conservación (DGO y C), Facultad de Medicina (FM), Frontón Cerrado (FC), Instituto de Ingeniería (I.I.) e Instituto de Ecología (IE). Finalmente, se realizó el muestreo en la Planta de Tratamiento de Agua Residual “Cerro del Agua”, tanto del influente (PTI) como del efluente (PTE) (Figura 3). Por otra parte, se incorporaron aislamientos previos provenientes de agua residual (70) y de agua potable de cisternas (2).

Colecta de muestras

En cada sitio se tomó 1L de agua en botellas de polipropileno estériles. Para la recolecta de la muestra, las llaves se desinfectaron previamente con alcohol al 70% y se abrieron durante 3 minutos a flujo constante. Posteriormente, se tomó un 1L de agua y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Procesamiento de la muestra

El procesamiento de la muestra se llevó a cabo durante las primeras 6 horas de la toma de la muestra y las alícuotas fueron almacenadas a 4°C. Para ello, las muestras obtenidas de la red de distribución de agua y PTAR-CA fueron

centrifugada a 10000 rpm/4°C durante 20 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante de las muestras hasta obtener el botón, al cual se le agregó 5 ml de solución salina estéril (SSE) y se homogenizó. Las muestras fueron distribuidas en alícuotas de 1ml y almacenadas a 4°C.

Tratamiento de descontaminación para obtención de MNT

Se descontaminaron 500 µl de cada muestra de agua con 4 tratamientos diferentes con NaOH/SDS y/o CPC (Cuadro 2). Las muestras de agua de reúso se trataron por 30 minutos con concentraciones de NaOH 1%/SDS 3% y NaOH 2%/SDS 3% y se ajustó el pH a 7 con ácido fosfórico al 40%, mientras que las muestras con tratamiento CPC con concentraciones 0.05% y 0.005% se incubaron por 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3000 x g por 30 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron lavados con SSE y se obtuvo una pastilla que se resuspendió en 500 µl de SSE. Finalmente, se sembraron 60 µl de cada muestra en medio LJ y se incubó a 37°C durante 2 meses.

Cuadro 2. Tratamientos de descontaminación en muestras de la PTAR

Tratamiento	Soluciones
1	NaOH 1%/SDS 3%
2	NaOH 2%/SDS 3%
3	NaOH 1%/SDS 3% + CPC 0.005%
4	CPC 0.05%

Aislamiento de MNT

Las muestras provenientes de los pozos, tanques y la red de distribución se sembraron en el medio Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC al 10%, al igual que los aislamientos previos de BAAR. A las muestras del influente y efluente de la PTAR-CA que presentaran crecimiento, se realizó tinción de ZN para verificar la presencia de BAAR y se sembraron en medio Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC 10%. Para separar las cepas e identificar las MNT, se describió tanto la morfología colonial como la morfología microscópica.

Obtención de DNA

De cada colonia aislada y de los aislamientos BAAR previos, se extrajo el DNA por el método de fenol/cloroformo. Se verificó la concentración y calidad del DNA con Nanodrop 1000. Posteriormente se evaluó la integridad del DNA mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%, con amortiguador TBE a 110 V durante 1:15 horas, teñido con BrEt y se ajustó a una concentración de 20 ng/μl.

Amplificación del gen 16S rRNA

Se amplificó por PCR el gen 16S rRNA en 30 μl de reacción, con temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido de 38 ciclos: 94°C durante 1 minuto, 59°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalizando con un tiempo de rampa de 72°C durante 5 minutos. Cada reacción contuvo 5.5 mM de MgCl₂, amortiguador al 1X, 200 μM de dNTPs, 0.25 μM de oligonucleótido 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 0.25 μM de oligonucleótido 907r (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'), 0.75 U de AmpliTaq Gold DNA polimerasa y 4 μl de DNA. Se utilizó como controles positivos a *M. bovis* BCG phipps y *M. mucogenicum* ATCC 49651™. Se realizó electroforesis del fragmento amplificado en gel de agarosa 2%, amortiguador TBE a 110 V durante 1:15 horas, teñido con BrEt.

PCR-RFLP *hsp65*

La amplificación del gen *hsp65* se llevó a cabo en 50 μl de reacción con un ciclo inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos: 94°C durante 1 minuto, 56°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y un tiempo de rampa final de 72°C durante 5 minutos. Cada reacción contuvo 1.5 mM de MgCl₂, amortiguador al 1X, 200 μM de dNTPs, 20 pmol de oligonucleótido Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'), 20 pmol de oligonucleótido Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3'), 1.5 U de AmpliTaq Gold DNA polimerasa y 1 μl de DNA. Se utilizó como controles positivos a *M. bovis* BCG phipps y *M. mucogenicum* ATCC 49651™.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa 2% del fragmento amplificado, en amortiguador TBE a 110 V durante 1:15 horas, teñido con BrEt. Finalmente, se realizó restricción enzimática, durante 2 horas, con las enzimas *HaeIII* y *BstEII* y

se visualizaron los perfiles de restricción de los aislamientos de MNT por medio de electroforesis en gel de agarosa 3%, con amortiguador TBE a 80 V durante 4:00 horas, teñido con BrEt. Los patrones de bandeo y pesos moleculares fueron visualizados y analizados mediante el software UVP™ DigiDoc-It™ Imaging Systems. Para la identificación de las especies, los pesos moleculares de los patrones de bandeo obtenidos con las enzimas *HaeIII* y *BstEII* de cada especie se introdujeron en la base de datos de PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), la cual comparó los patrones de restricción obtenidos con los patrones de bandeo publicados de cada especie.

Secuenciación del gen *hsp65*

Se seleccionó un amplicón *hsp65* de un aislamiento representativo de cada patrón que identificó a una especie de MNT. Se purificó una banda de 439pb de 15 muestras con High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y mediante secuenciación Sanger (Macrogen), se obtuvieron 2 lecturas, una perteneciente a la cadena líder y otra perteneciente a la cadena complementaria de las secuencias del gen *hsp65* de cada muestra. Las secuencias crudas de ambas cadenas fueron alineadas con ayuda del programa DNA Baser Assambler, bajo los parámetros preestablecidos para secuencias normales y remoción de secuencias vectores. Se obtuvo un contig de cada muestra y a cada uno se le realizó BLASTn en la base de datos del NCBI para la identificación de las especies.

PCR-RFLP ITS

Se amplificaron 50 µl de reacción de la secuencia ITS, con temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido de 38 ciclos: 94°C durante 1 minuto, 59°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalizando con un tiempo de rampa de 72°C durante 5 minutos. Cada reacción contuvo 1.5 mM de MgCl₂, amortiguador al 1X, 200 µM de dNTPs, 0.1% de tritón X-100, 20 pmol de oligonucleótido Sp1 (5'-ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC-3'), 20 pmol de oligonucleótido Sp2 (5'-GATGCTCGCAACCACTATCCA-3'), 1 U de AmpliTaq Gold DNA polimerasa y 1 µl de DNA. Se utilizaron como controles positivos a *M. bovis* BCG phipps y *M. mucogenicum* ATCC 49651™. Se realizó electroforesis del fragmento amplificado en gel de agarosa 2%, amortiguador TBE a 110 V durante 1:15 horas, teñido con

BrEt. Finalmente, se realizó restricción enzimática, durante 2 horas, con las enzimas *HaeIII* y *CfoI* y se visualizaron los perfiles de restricción de los asilamientos de MNT por medio de electroforesis en gel de agarosa 3%, con amortiguador TBE a 80 V durante 4:00 horas, teñido con BrEt. Los patrones de bandeo y los pesos moleculares fueron analizados mediante el software UVP™ DigiDoc-It™ Imaging Systems y se compararon con los patrones de restricción reportados en el algoritmo de identificación elaborado por Roth y col., 2000, para la identificación de especies.

RESULTADOS

Colección de aislamientos previos de BAAR

Con la finalidad de comparar y ampliar el espectro de evaluación de MNT dentro de la red de distribución de agua potable y residual de Ciudad Universitaria, se incluyó una colección de 72 aislamientos previos de BAAR del año 2010. Los aislamientos se obtuvieron en 3 temporadas, siendo la temporada cálida-seca (abril a junio) la que mostró el mayor número de aislamientos con 28 de 72, mientras que las temporadas de fría-seca (enero a marzo) y fría-lluvias (agosto a octubre) muestran un número similar de aislamientos con 22 cada una (Figura 6). Por otra parte, los aislamientos previos de BAAR colectados fueron obtenidos en 73.61% de agua residual tratada en cisternas y efluentes de la PTAR-CA y PTAR-CP, en 23.61% de agua residual del influente de la PTAR-CA y PTAR-CP y el 2.8% restante de una cisterna de agua potable (Cuadro 3).

El sitio del que se obtuvieron más aislamientos de BAAR fueron el efluente y el influente de la planta de tratamiento de Ciencias Políticas con 23 y 14 aislamientos de forma respectiva.

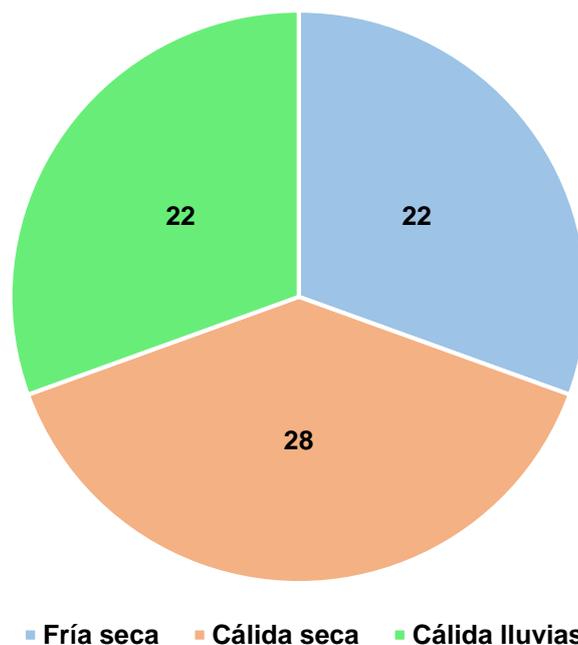


Figura 6. Aislamientos previos de BAAR (2010) por temporada de muestreo

Cuadro 3. Aislamientos previos de BAAR.

Lugar	Tipo de agua	Número de aislamientos	Código de aislamiento
Cisterna 1	Agua residual tratada	11	101,102,103,104,105,106,126,129,130,167,169
Cisterna 2	Agua residual tratada	13	110,111,112,117,127,128,133,134,136,137,142,143,166
Cisterna 6	Agua residual tratada	4	140,141,164,165
Cisterna 7	Agua potable	2	113,138
PTICP	Agua residual	14	107,108,109,114,115,147,148,149,156,161,162,170,171,172
PTECP	Agua residual tratada	23	122,123,124,125,131,132,135,139,144,145,146F,146P,150,151,152,154,155,157,158,159,160,163,168
PTICA	Agua residual	3	116,118,119
PTECA	Agua residual tratada	2	120, 121
Total		72	

Identificación fenotípica de BAAR

La identificación microbiológica macroscópica de los 72 aislamientos mostró en general una morfología colonial circular y puntiforme, con elevación convexa y márgenes bien definidos. Tanto el tiempo de crecimiento como pigmentación de las colonias fue variable, mostrando en algunos casos crecimientos menores a 7 días y en otros casos crecimientos mayores a 7 días y hasta 1 mes. Se obtuvieron 69 colonias con pigmentación blanca, 2 colonias amarillas (aislamientos 163 y 170) y una colonia de pigmentación naranja (aislamiento 149), indicando presencia de especies no cromógenas, escotocromógenas y cromógenas (Figura 7). Por otra parte, la identificación microscópica mostró que la morfología celular fue bacilar en todos los casos, con longitudes celulares diferentes entre los diferentes aislamientos, aunque de manera general el tamaño celular fue pequeño y la tinción de ZN en todos los casos fue positiva, por lo que se clasificaron como BAAR (Figura 8).

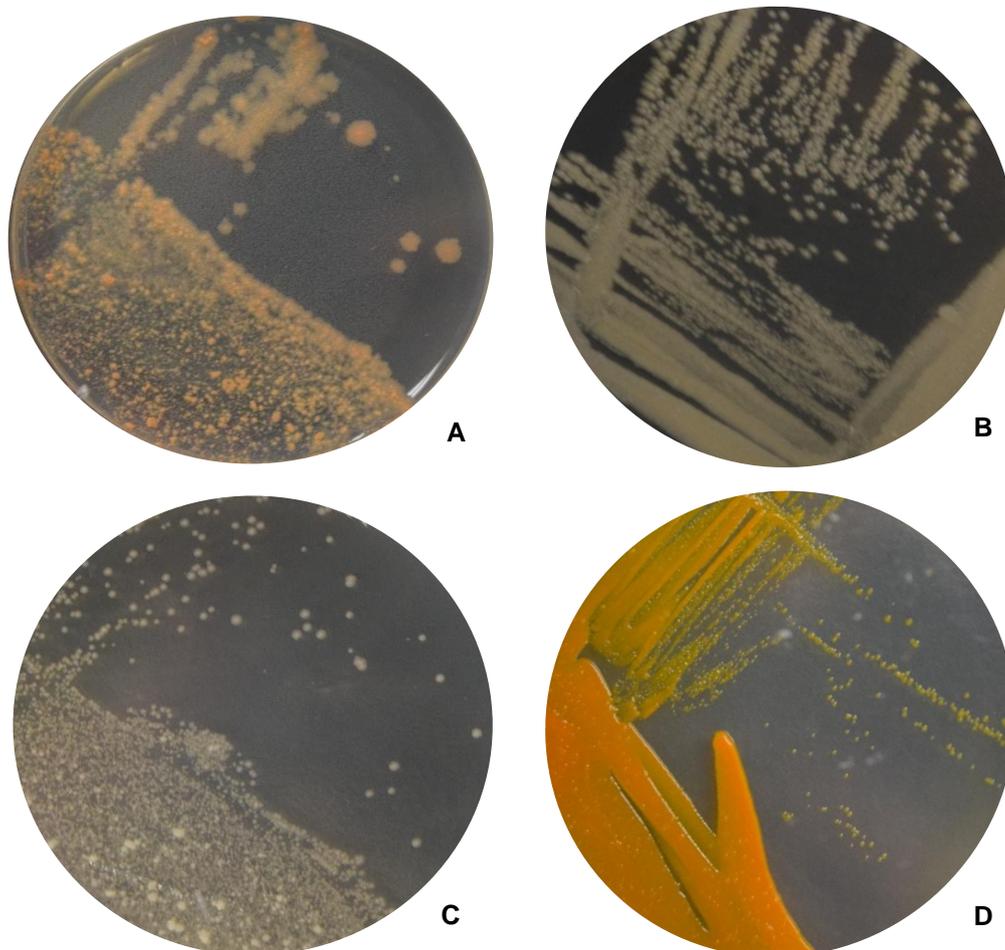


Figura 7. Crecimientos coloniales de MNT en medio Middlebrock 7H10. Las especies que forman las colonias identificadas por el gen *hsp65* pertenecen a: A) 149: *M. anyangense*, B) 160: *M. fortuitum*, C) 122: *M. terrae* y D) 170: *M. goodnae*.

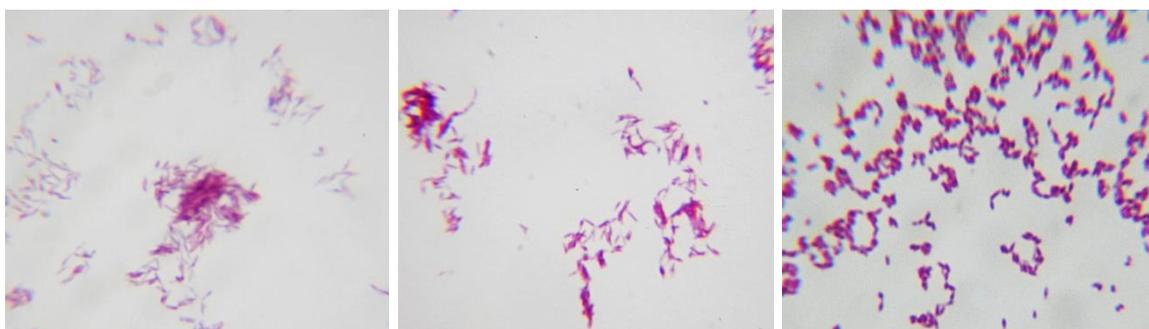


Figura 8. Microfotografía de morfología microscópica de diferentes BAAR teñida con Ziehl Neelsen de cultivos positivos de muestras de agua a 100X.

Calidad del DNA de aislamientos BAAR

Tanto la cuantificación del DNA con Nanodrop 1000 como la electroforesis en gel de agarosa 1% mostraron que las 72 cepas mostraron un DNA íntegro, con concentraciones adecuadas para realizar las PCR que variaron dependiendo del aislamiento y con relaciones 260/280 iguales o mayores a 1.8, que se utilizaron

para amplificar las diversas secuencias blanco por PCR y continuar con la identificación de las especies, como se muestra en la figura 9 con el DNA genómico de algunos aislamientos BAAR. En todos los casos, los DNA se ajustaron a una concentración de 20 ng/μl para amplificar el gen *hsp65* y la secuencia ITS.

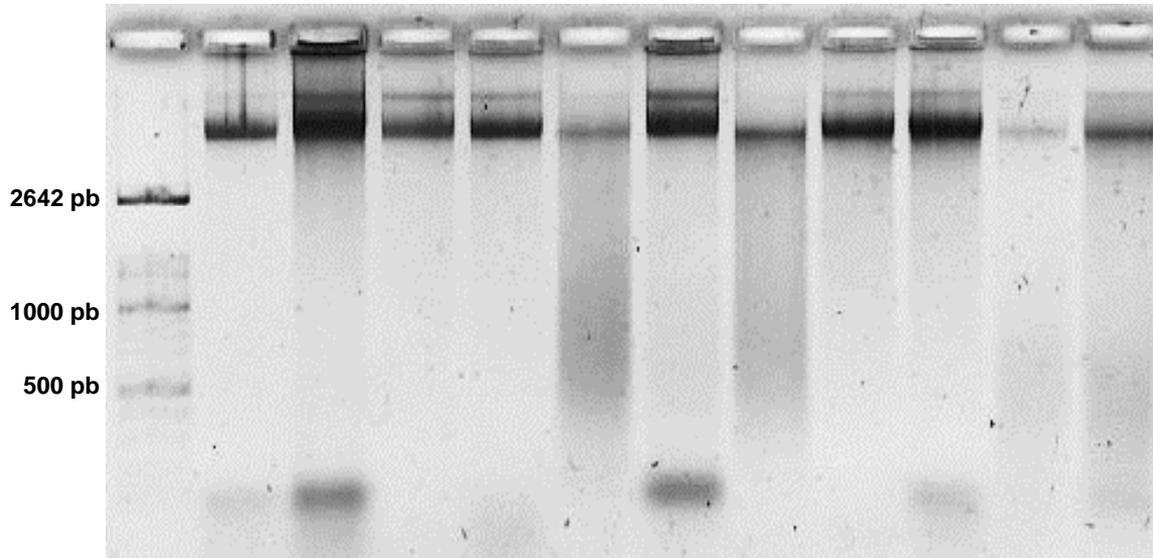


Figura 9. Gel representativo del DNA genómico de algunos aislamientos BAAR. Gel de agarosa 1%, TBE 0.5X, 1:10 hrs, 110 V, teñido con BrEt, MPM de 100 pb en el primer carril, que muestra 11 de los 72 DNA genómicos utilizados para la amplificación por PCR.

Amplificación del gen 16S rRNA de las MNT

Se confirmó la presencia de bacterias con la amplificación de las primeras 899 pb del gen 16S rRNA de los 72 aislamientos BAAR, como se muestra en la figura 10 con la amplificación del gen 16S rRNA de algunas MNT.

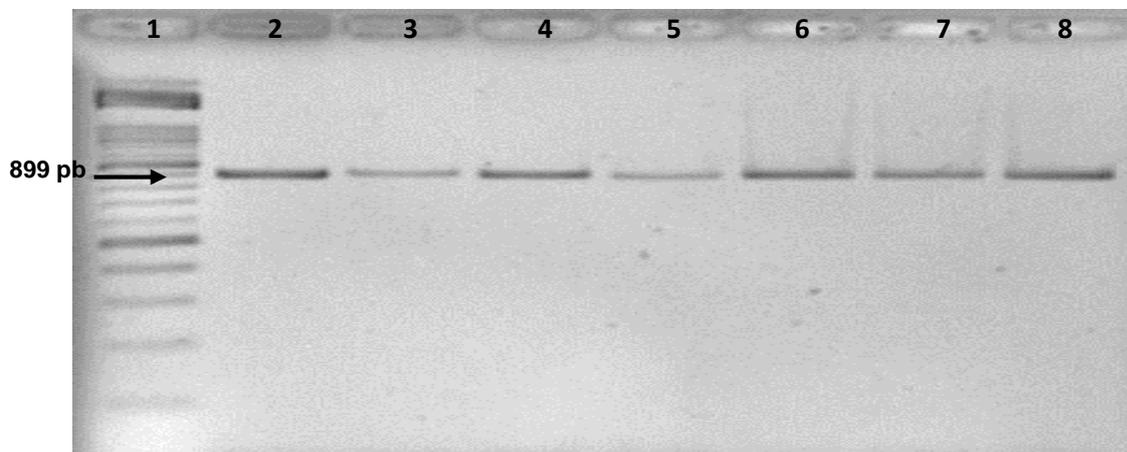


Figura 10. Gel representativo de la amplificación del gen 16S rRNA de algunas MNT. Gel de agarosa 2%, TBE 0.5X, 1:10 hrs, 110 V, teñido con BrEt. En los carriles se muestran los aislamientos: 1. MPM 100pb, 2. 114, 3. 115, 4. 116, 5. 117, 6. 119, 7. 120 y 8. 122.

Identificación de especies de MNT por PCR-RFLP del gen *hsp65*

El gen *hsp65* amplificó en los 72 aislamientos BAAR y se obtuvo un producto de 439 pb en todos los casos, como se muestra en el gel representativo de la figura 11. La restricción del gen *hsp65* de los diversos aislamientos BAAR, mostró perfiles específicos a las especies de MNT (Figura 12).

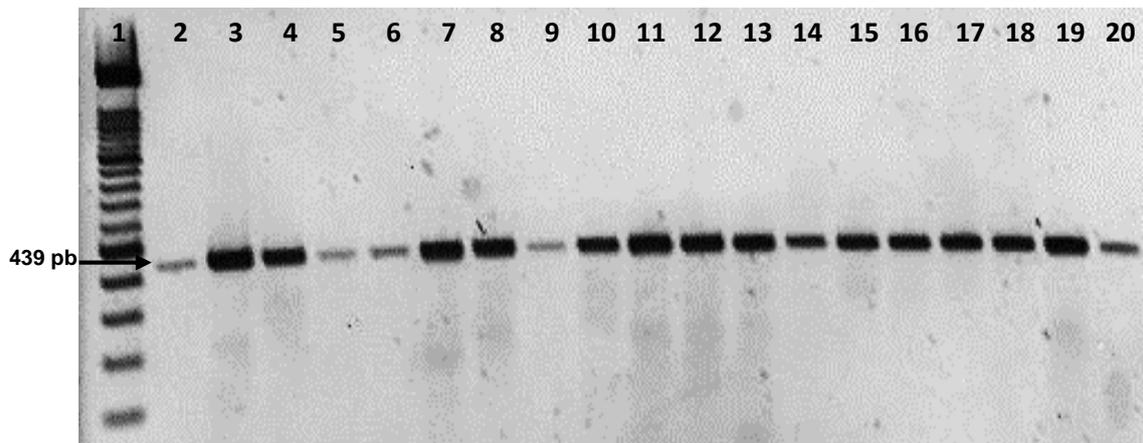


Figura 11. Gel representativo de la amplificación del gen *hsp65* de MNT. Gel de agarosa 2%, TBE 0.5X, 1:10 hrs, 110 V y teñido con BrEt. En los carriles se muestran los aislamientos: 1. MPM 100 pb, 2. 110, 3. 111, 4. 112, 5. 113, 6. 118, 7. 121, 8. 128, 9.131, 10. 132, 11. 136, 12. 142, 13. 144, 14. 148, 15. 149, 16. 150, 17. 151, 18. 152, 19. 155, 20. 157

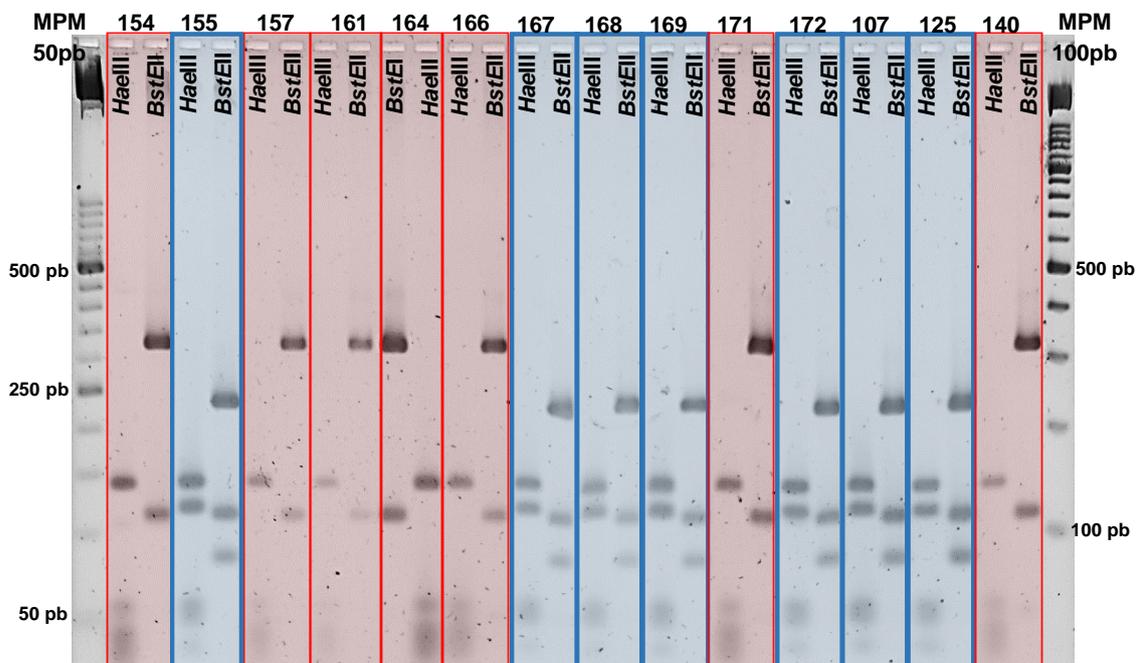


Figura 12. Patrones PCR-RFLP del gen *hsp65* de *M. fortuitum* y *M. terrae*. Gel de agarosa 3%, TBE 0.5X, teñido con BrEt, 80V por 4 horas, MPM 50 pb en el primer carril y 100 pb en el último carril. Los patrones azules muestran la restricción que presentó *M. fortuitum* y los patrones rojos la restricción que presentó *M. terrae* con las enzimas *HaellI* y *BstEI* de los siguientes aislamientos: 154, 155, 157, 161, 164, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 107, 125, 140.

Se identificaron 12 especies con los patrones de bandeo obtenidos con las enzimas *HaeIII* y *BstEII* sometidos en la base de datos PRASITE de las 72 muestras del gen *hsp65* (Figura 13). Las especies identificadas fueron las siguientes: *M. terrae* tipo 3 (23/72), 2 tipos en el caso de *M. fortuitum* que corresponden a *M. fortuitum* tipo 1 (18/72) y *M. fortuitum* tipo 2 (11/72), *M. gordonae* tipo 3 (2/72), *M. arupense* tipo 1 (4/72), 2 tipos de *M. nonchromogenicum* correspondientes a *M. nonchromogenicum* tipo 1 (1/72) y *M. nonchromogenicum* tipo 2 (6/72), *M. fallax* tipo 1 (1/72), *M. triviale* tipo 1 (1/72), *M. malmoense* tipo 1 (1/72), *M. peregrinum/M. porcinum/M. septicum* (1/72), *M. rhodesiae* tipo 1 (1/72), *M. thermorresistibile* tipo 1 (1/72) y *M. spp.*(1/72).

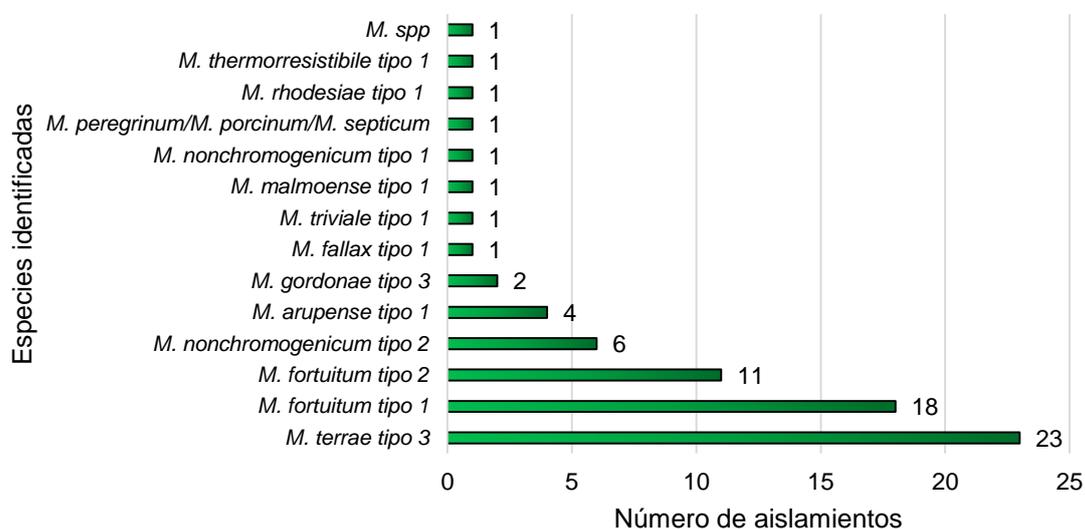


Figura 13. Especies identificadas de los aislamientos BAAR previos con el gen *hsp65*.

La mayoría de las especies identificadas de los aislamientos previos de BAAR fueron *M. fortuitum* tipo 1 y tipo 2 (29/72) y *M. terrae* tipo 3 (23/72). En la cisterna 1 con agua residual se identificaron las especies de *M. fortuitum* tipo 1 (4/10), *M. fortuitum* tipo 2 (3/10) y *M. terrae* tipo 3 (3/10); en la cisterna 2 con agua residual se identificaron las especies *M. fortuitum* tipo 1 (9/14), *M. fortuitum* tipo 2 (3/14), y *M. terrae* tipo 3 (2/14); en las cisternas 6 y 7 solo se identificó la especie *M. terrae* tipo 3 con 4 y 2 aislamientos de manera respectiva.

La PTAR-CP fue la que mostró mayor número de especies identificadas con 12. Se identificaron 6 especies de MNT con *hsp65* de los 14 aislamientos BAAR en el influente de la PTAR-CP pertenecientes a *M. fortuitum* tipo 1 (1/14), *M. fortuitum* tipo 2 (2/14), *M. terrae* tipo 3 (6/14), *M. gordonae* tipo 3 (2/14), *M.*

arupense tipo 1 (1/14), *M. thermorresistibile* (1/14) y *M. porcinum/M. peregrinum/M. septicum* (1/14). Por otra parte, el efluente de la PTAR-CP fue el sitio que mostró mayor número de especies con un total de 9, las cuales corresponden a: *M. fortuitum* tipo 1 (4/23), *M. fortuitum* tipo 2 (3/23), *M. terrae* tipo 3 (5/23), *M. nonchromogenicum* tipo 2 (3/23), *M. arupense* tipo 1 (3/23), *M. fallax* tipo 1 (1/23), *M. malmoense* tipo 1 (1/23), *M. rhodesiae* tipo 1 (1/23), *M. thermorresistibile* tipo 1 (1/23) y *M. spp.* (1/23). La PTAR-CA mostró un menor número de especies de MNT en comparación con la PTAR-CP. Las especies identificadas en el influente fueron *M. terrae* tipo 3 (1/3) y *M. nonchromogenicum* tipo 2 (2/3), mientras que en el efluente se aisló 1 especie perteneciente a *M. nonchromogenicum* tipo 1 (1/2) y *M. nonchromogenicum* tipo 2 (1/2) (Figura 14).

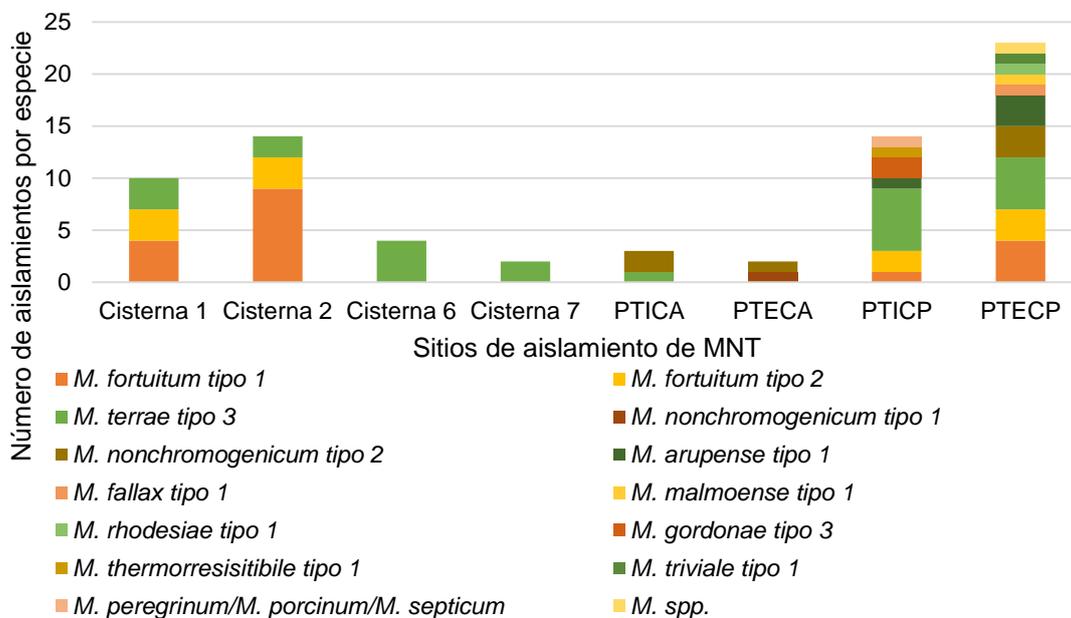


Figura 14. Especies de MNT identificadas en cisternas y PTAR.

Identificación de MNT por secuenciación del gen *hsp65*

El alineamiento del DNA secuenciado del gen *hsp65* con la base de datos del NCBI ayudó a la identificación y confirmación de las especies representativas de MNT. Se confirmó la identificación de las especies *M. fortuitum* tipo 1, *M. fortuitum* tipo 2, *M. terrae* tipo 3, *M. arupense* tipo 1, *M. triviale* tipo 1, *M. fallax* tipo 1, *M. gordonae* tipo 3 y *M. peregrinum* tipo 1. Por otro lado, la especie identificada como *M. thermorresistibile* por *hsp65* mostró ser *M. anyangense* por secuenciación, así como la especie identificadas como *M. nonchromogenicum*

tipo 1, *M. rhodesiae* tipo 1 y *M. malmoense* se identificaron como *M. terrae* por secuenciación. Finalmente, la especie identificada como *M. arupense* tipo 1 por *hsp65* alineó con mayor identidad y cobertura con *M. spp* (*hsp150*) aunque los resultados río abajo en el alineamiento muestran ser *M. arupense* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Especies de MNT identificadas por secuenciación del gen *hsp65*

Nombre	Punt .Max	Punt Total	Cobertura	Valor E	Identidad	Acceso	Longitud del contig	Descripción
hsp110	713	713	100%	0	99%	KJ820761.1	390	<i>Mycobacterium fortuitum</i> strain CADNTM2 heat shock protein 65 (<i>hsp65</i>) gene, partial cds
hsp111	671	671	94%	0	93.2%	CP014258.1	400	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> DSM 46621 = ATCC 6841 genome
hsp112	699	699	100%	0	99.7%	CP014258.1	381	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> DSM 46621 = ATCC 6841 genome
hsp121	597	597	100%	5.00E-167	97.7%	EU732654.1	348	<i>Mycobacterium terrae</i> strain 28K766 65 kDa heat shock protein (<i>hsp65</i>) gene, partial cds
hsp131	628	628	100%	2.00E-176	96.3%	JX154097.1	382	<i>Mycobacterium terrae</i> strain InDRE Sonora708 65 kDa heat shock protein (<i>hsp65</i>) gene, partial cds
hsp136	793	793	100%	0	99.1%	CP014258.1	443	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> DSM 46621 = ATCC 6841 genome
hsp144	678	678	100%	0	98.2%	JN037844.1	390	<i>Mycobacterium triviale</i> ATCC 23291 heat shock protein 65 gene, partial sequence
hsp148	809	809	100%	0	99.7%	AY379072.1	441	<i>Mycobacterium peregrinum</i> isolate B1285 heat shock protein (<i>hsp65</i>) gene, partial cds
hsp149	411	411	100%	6.00E-111	89.6%	KF910182.1	327	<i>Mycobacterium anyangense</i> strain QIA-38 heat shock protein 65 (<i>hsp65</i>) gene, partial cds
hsp150	798	798	99.8%	0	99.1%	EU619893.1	442	<i>Mycobacterium sp.</i> 06FL-1-2A 65 kDa heat shock protein-like (<i>hsp65</i>) gene, partial sequence
	787	787	96.4%	0	96.3%	DQ168662.1	442	<i>Mycobacterium arupense</i> strain AR30097 Hsp65 gene, partial cds

hsp151	752	752	100%	0	97.5%	EU732654.1	440	<i>Mycobacterium terrae</i> strain 28K766 65 kDa heat shock protein (hsp65) gene, partial cds
hsp152	678	678	100%	0	99.21%	JQ617911.1	380	<i>Mycobacterium arupense</i> strain AFP-0007 65 kDa heat shock protein (hsp65) gene, partial cds
hsp158	614	614	100%	5.00E-172	99.41%	JQ617911.1	338	<i>Mycobacterium arupense</i> strain AFP-0007 65 kDa heat shock protein (hsp65) gene, partial cds
hsp163	725	725	97.54%	0	97.29%	AF547829.1	406	<i>Mycobacterium fallax</i> strain CIP 81.39 65 kDa heat shock protein (hsp65) gene, partial cds
hsp170	623	623	100%	8.00E-175	100%	KF432583.1	337	<i>Mycobacterium goodnae</i> strain FJ10121 60 kDa chaperonin 2 GroEL2 (groEL2) gene, partial cds

Identificación de especies de MNT por PCR-RFLP de la secuencia ITS

La secuencia ITS amplificó en los 72 aislamientos BAAR y se obtuvieron productos de una y dos bandas dependiendo de la especie de MNT, con tamaños variables entre 200 a 350 pb como se muestra en el gel representativo de la figura 15. La restricción de la secuencia ITS produjo perfiles diferentes correspondientes a las especies de MNT (Figura 16).

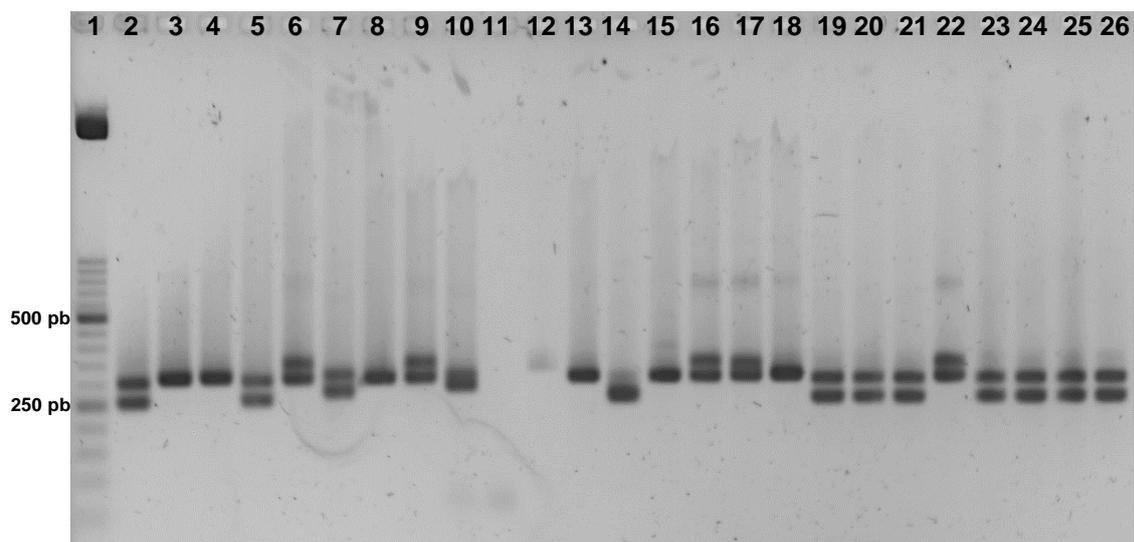


Figura 15. Secuencia ITS de MNT. Gel de agarosa al 2%, TBE 0.5X, 1:10 hrs, 110 V, teñido con BrEt y MPM de 50 pb en el primer carril. En los carriles se muestran los aislamientos: 2. 136, 3. 138, 4. 141, 5. 143, 6. 147, 7. 148, 8. 150, 9. 145, 10. 131, 11. C-, 12. *M. mucogenicum* 49651 (C+), 13. 154, 14. 155, 15. 157, 16. 161, 17. 164, 18. 166, 19. 167, 20. 168, 21. 169, 22. 171, 23. 172, 24. 125, 25. 107, 26. 109.

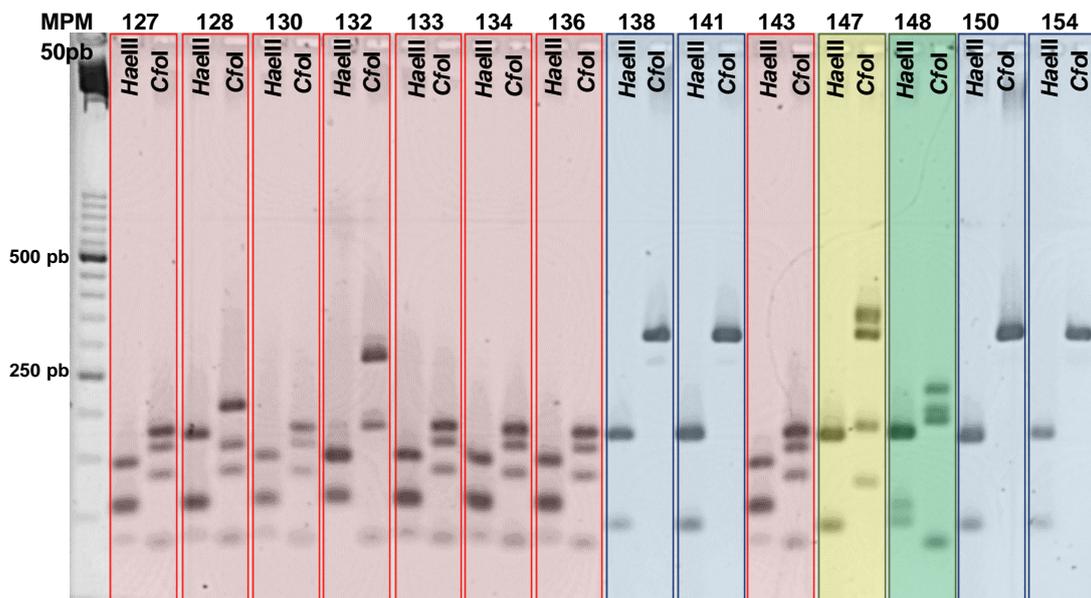


Figura 16. Patrones PCR-RFLP de la secuencia ITS de MNT. Gel de agarosa 3%, TBE 0.5X, teñido con BrEt, 80V por 4 horas y MPM de 50 pb en el primer carril. Los carriles pares presentan restricción con la enzima *HaellI* y los carriles nones restricción con la enzima *CfoI*. Los patrones rojos muestran la restricción que presentó *M. fortuitum*, los patrones azules la restricción que presentó *M. terrae*, el patrón verde la restricción que presentó *M. peregrinum* y el patrón amarillo pertenece a una *M. spp* de los siguientes aislamientos: 127, 128, 130, 132, 133, 134, 136, 138, 141, 143, 147, 148, 150, 154.

Con ayuda del PCR-RFLP hecho con las enzimas *CfoI* y *HaellI* y la comparación de dichos perfiles obtenidos con el algoritmo publicado por Roth y colaboradores (2000), se identificaron 5 especies con la secuencia ITS: *M. terrae* (27/72), 3 variantes de *M. fortuitum* que corresponden a *M. fortuitum* (14/72), *M. fortuitum* tipo VI (13/72) y *M. fortuitum* tipo VII (1/72), *M. gordonae* (2/72), *M. senegalense* (1/72), *M. peregrinum* (1/72) y *M. spp* (13/72) (Figura 17).

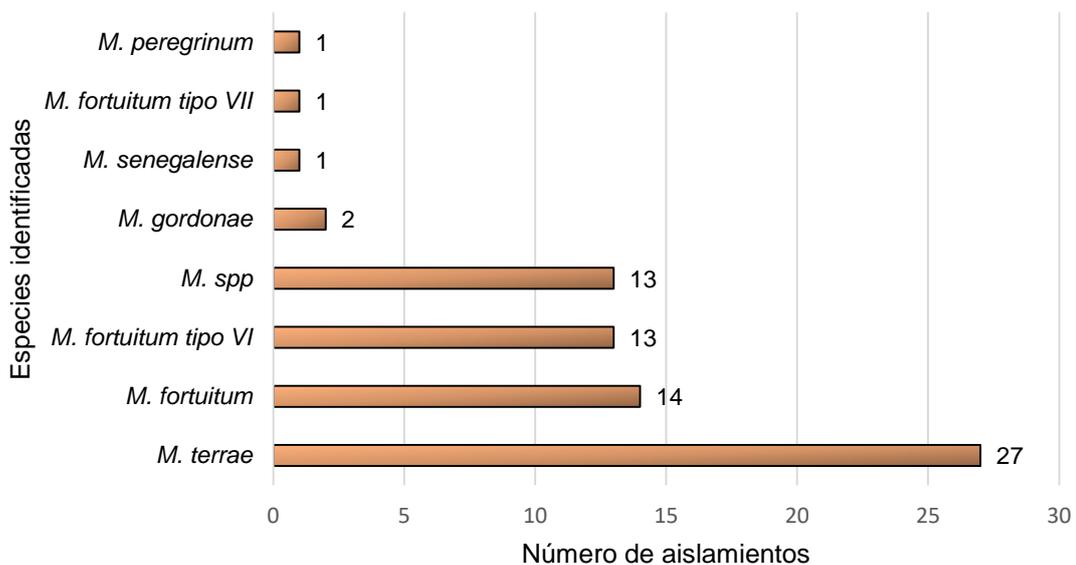


Figura 17. Especies identificadas de los aislamientos BAAR previos con la secuencia ITS.

La mayoría de las especies identificadas de los aislamientos previos de BAAR fueron *M. fortuitum* (28/72) y *M. terrae* (27/72). En la cisterna 1 se identificaron 2 especies pertenecientes a *M. fortuitum* (4/10), *M. fortuitum* VI (3/10) y *M. terrae* (3/10); en la cisterna 2 se identificaron 3 especies: *M. fortuitum* (2/14), *M. fortuitum* tipo VI (9/14), *M. terrae* (1/14), *M. senegalense* (1/14) y una especie que no se pudo confirmar (1/14). Finalmente, en las cisternas 6 solo se identificó la especie *M. terrae* (4/4), al igual que la cisterna 7 (2/2).

Se identificaron 4 especies en la PTAR-CP correspondientes a *M. fortuitum* (10/72), *M. terrae* (12/72), *M. gordonae* (2/72) y *M. peregrinum* (1/72). En el influente de la PTAR-CP se identificó la presencia de 4 especies: *M. fortuitum* (3/14), *M. terrae* (3/14), *M. terrae* tipo I (1/14), *M. gordonae* (2/14), *M. peregrinum* (1/14) y 4 aislamientos de BAAR que no pudieron ser confirmados. Por otra parte, el efluente de la PTAR-CP fue el sitio que mostró mayor número de especies sin poder identificar (8/23), aunque se identificaron 2 especies: *M. fortuitum* (5/23), *M. fortuitum* tipo VI (1/23), *M. fortuitum* tipo VII (1/23) y *M. terrae* (8/23). Por otro lado, en el influente y efluente de la PTAR-CA solo se identificó la *M. terrae* con 3 y 2 aislamientos respectivamente (Figura 18).

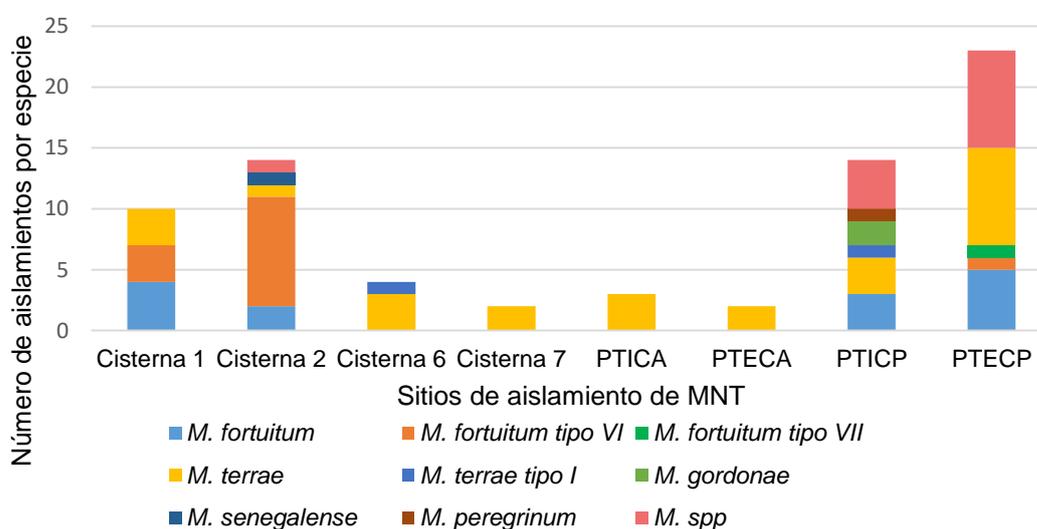


Figura 18. Especies de MNT identificadas en cisternas y PTAR con la secuencia ITS.

Sitios de muestreo

Se obtuvieron un total de 196 muestras en el periodo comprendido entre los años 2013 y 2014 tanto de agua potable como de agua residual y agua residual tratada. De la planta de tratamiento de agua residual “Cerro del Agua” (PTAR-

CA) se obtuvieron un total de 15 muestras, 46.7% provenientes del influente y 53.3% del efluente. Por otra parte, se obtuvieron 181 muestras totales de la red de distribución de agua potable, 14.9% provenientes de los pozos, 13.8% tanques y 71.3% provenientes de puntos de la red de distribución de agua potable (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de muestras en cada sitio de muestreo.

Tipo de agua	Fuente de origen	Lugar	Número de muestras por año		Total
			2013	2014	
Agua potable	Red de distribución de agua potable	D.G.O y C	9	17	26
		F.M.	9	17	26
		F.C.	9	17	26
		I.E.	9	17	26
		I.I.	9	16	25
Agua de residual	Pozos de almacenamiento	P.Q.	9	0	9
		P.M.	9	0	9
		P.V.A.	9	0	9
Agua de residual	Tanques de almacenamiento	T.V.A.	9	0	9
		T.A.	9	0	9
		T.B.	7	0	7
Agua de residual	Planta de tratamiento	PTICA	4	3	7
		PTECA	4	4	8
Total			105	86	196

Tratamientos de descontaminación en agua residual de la PTAR-CA

Se realizaron cuatro tratamientos de descontaminación de la microbiota acompañante a las muestras provenientes del influente y efluente de la PTAR-CA con la finalidad de evaluar la presencia de MNT. No se pudieron obtener colonias de MNT de las muestras sembradas en los medios LJ correspondientes

a los 7 puntos del influente, ya que mostraron contaminación de microbiota acompañante, a pesar de haber aplicado tratamientos diferentes con NaOH/SDS y CPC. Por otra parte, en las muestras de los medios LJ de los 8 puntos del efluente no hubo ningún crecimiento de colonias pertenecientes a BAAR ni contaminación con microbiota acompañante debido a que el agua se encontraba limpia (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos de descontaminación en agua de reúso de Ciudad Universitaria.

Fecha de muestreo	Lugar	Tratamientos				Contaminación
		NaOH 1%/SDS 3%	NaOH 2%/SDS 3%	CPC 0.05%	NaOH 1%/SDS 3% +CPC 0.005%	
06/03/2013	PTI	x	x	x	X	Si
	PTE	-	-	-	-	No
03/04/2013	PTI	x	x	x	X	Si
	PTE	-	-	-	-	No
16/05/2013	PTI	x	x	x	X	Si
	PTE	-	-	-	-	No
05/06/2013	PTI	x	x	x	X	Si
	PTE	-	-	-	-	No
05/02/2014	PTI	x	x	x	X	Si
	PTE	-	-	-	-	No
05/03/2014	PTE	-	-	-	-	No
02/04/2014	PTI	x	x	x	X	Si
	PTE	-	-	-	-	No
07/05/2014	PTI	x	x	x	X	Si
	PTE	-	-	-	-	No

Las muestras marcadas con – no mostraron presencia de colonias con MNT en el medio LJ.
Las muestras marcadas con x mostraron contaminación del medio LJ.

MNT en tanques y pozos de agua potable

Para evaluar la presencia de MNT se tomó un litro de agua potable de 3 pozos (PM, PQ y PVA) y de 3 tanques (TA, TB y TVA). El muestreo de la red de pozos de agua potable se llevó a cabo del mes de febrero al mes de noviembre de 2013. Por otra parte, los tanques fueron muestreados durante el mismo periodo de muestreo, no obstante, durante los meses de febrero y marzo no se obtuvieron muestras del TB debido a que estuvo en mantenimiento y en el mes

de agosto no se obtuvieron muestras tanto de pozos y tanques. Ninguno de los pozos y tanques muestreados en el año 2013 presentó crecimiento de colonias de BAAR de agua potable.

MNT en el sistema de distribución de agua de Ciudad Universitaria

Se obtuvieron 129 muestras totales de 5 puntos de la red de distribución de agua potable (IE, I.I., F.C., F.M. y DGO y C), 45 muestras obtenidas de marzo a noviembre del año 2013 y 84 muestras obtenidas de febrero a junio de 2014. Los muestreos correspondientes al año 2013 fueron mensuales y se dividieron en 3 temporadas: frío secas (enero a marzo), cálida seca (abril a junio) y cálida con lluvias (agosto a octubre), mientras que las muestras colectadas en 2014 fueron semanales y correspondieron a las temporadas de frías secas (enero a marzo) y cálida seca (abril a junio), en esta última etapa, solo se obtuvieron muestras de las primeras 2 semanas del mes de junio. Ninguna de las muestras obtenidas del año 2013 de los 5 puntos de la red de distribución de agua potable que fueron sembradas en medio Middlebrock 7H10 mostró crecimiento de colonias con presencia de BAAR, al igual que las muestras del periodo 2014.

DISCUSIÓN

La evaluación de la calidad de agua en los sistemas de distribución de agua potable y agua de reúso en las plantas de tratamiento es cada vez más rigurosa, debido a la reincorporación del agua de reúso a las actividades cotidianas, a la medición de un número mayor de variables y a la demanda de la administración de agua de mejor calidad. Por ello se evaluó la presencia de MNT en los sistemas de distribución de agua potable y residual de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Ciudad Universitaria.

El agua debe de cumplir estándares establecidos por normas u organizaciones para que sea suministrada, bajo parámetros estrictos de evaluación que garanticen una calidad del agua adecuada que no ponga en riesgo la salud de las personas. Los parámetros que debe tener el agua potable en México se establecen en la NOM-127-SSA1-1994 modificada en el año 2000, la cual establece la medición de características fisicoquímicas como la turbidez, olor y sabor, así como las características microbiológicas, principalmente en la búsqueda de la presencia de coliformes fecales y totales. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud, menciona dentro de su guía para la calidad de agua potable, otros microorganismos adicionales a las normas oficiales como las MNT. La OMS alude que algunas especies de MNT pueden ser patógenas y causar infecciones en el humano y muestra que hay evidencia que el agua es una de las fuentes principales de exposición e infección de las MNT (OMS, 2011).

La población de Ciudad Universitaria está conformada por más de 250 mil usuarios (Martínez, 2016) que se encuentran en constante contacto con el agua que se abastece dentro de sus instalaciones por parte del programa PUMAGUA para el uso y reúso de agua. El agua se suministra de acuerdo al origen y necesidades de la universidad, ya sea el uso de agua residual tratada en el riego de áreas verdes dentro del campus o el uso del agua potable de los sistemas de distribución hacia la población universitaria. Por ello, fue importante realizar una búsqueda de la presencia de MNT en esta agua encontrando: 72 aislamientos BAAR obtenidos de PTAR y cisternas de agua residual y agua potable en el año 2010 y la ausencia de MNT en agua potable de pozos, tanques y puntos finales de la red de distribución de agua potable del sistema de distribución de agua

potable y de agua residual de la PTAR-CA de 196 muestras obtenidas entre los años 2013 y 2014.

Los primeros datos muestran que la presencia de aislamientos BAAR parece no tener una correlación directa entre el número de aislamientos y la temporada en la cual fueron obtenidos, ya que el número de aislamientos BAAR previos fue muy similar entre las 3 temporadas, siendo la temporada calida-seca (abril a junio) la que presentó el mayor número de aislamientos con 28, mientras que las temporadas fría-seca (enero a marzo) y cálida- lluvias (agosto a octubre) fueron similares con 22 aislamientos.

El mayor número de aislamientos previos de BAAR se obtuvo tanto de los influentes y efluentes de la PTAR-CA, PTAR-CP y de cisternas. De acuerdo al informe de avances de 2010 que presentó PUMAGUA, la calidad de agua que se destinó para el riego de las áreas verdes en CU proveniente de los efluentes de la PTAR-CA y PTAR-CP no cumplió con los parámetros establecidos por la NOM-003-ECOL-1997. Posterior a este diagnóstico, las PTAR-CA y PTAR-CP se sometieron a un proceso de rehabilitación de los sistemas de tratamiento para el cumplimiento de la norma oficial. En el caso de las cisternas PUMAGUA reportó que muchas se encontraron en condiciones deficientes debido a la falta de mantenimiento, presencia de fugas o abiertas al aire libre sin tapaderas que las aislasen del ambiente y con parámetros fisicoquímicos fuera de lo establecidos por la NOM-003-ECOL-1997. En general, el agua de cisternas y efluentes en el año 2010 no presentó las condiciones adecuadas, como alto contenido de materia orgánica y presencia de MNT.

La identificación microbiológica ayudó a la descripción de especies y evidenció que todos los aislamientos fueron BAAR, presentando tamaños diferentes a nivel microscópico, así como diferente velocidad de crecimiento. El fragmento del gen 16S rRNA confirmó que todos los aislamientos pertenecen al dominio bacteria, mientras que el gen *hsp65* y la secuencia ITS complementaron la identificación molecular de las especies. Así, la pigmentación de las colonias mostró concordancia con las especies identificadas molecularmente con *hsp65* e ITS, en su mayoría blancas, siendo los aislamientos 163 y 170 los únicos con pigmentación amarilla, los cuales se identificaron como *M. gordonae* tipo 3 y el

aislamiento 149 de coloración naranja identificado como *M. anyangense* por secuenciación.

El PCR-RFLP del gen *hsp65* permitió identificar la mayoría de los aislamientos BAAR con 12 especies de MNT, siendo la mayoría especies de *M. terrae* (23/72) y *M. fortuitum* (29/72). Además, el PCR-RFLP del gen *hsp65* identificó especies como *M. triviale* tipo 1, *M. fallax* tipo 1, *M. gordonae* tipo 1 o *M. thermoresistibile* tipo 1, aunque esta última resultó ser *M. anyangense*, al igual que *M. nonchromogenicum* tipo 1, *M. rhodesiae* tipo 1 y *M. malmoense* tipo 1 que finalmente se identificaron como *M. terrae* por secuenciación. Estos datos nos muestran que la identificación por PCR-RFLP es una herramienta útil en la identificación de la mayoría de las especies de MNT, aunque para propósitos de investigación la identificación final entre especies cercanamente relacionadas y subespecies es preferente usar la secuenciación, ya que proporciona mayor nivel de especificidad al evaluar secuencias de nucleótidos.

Con la finalidad de comparar y complementar la identificación de las especies de micobacterias realizada con el gen *hsp65* se utilizó la secuencia ITS, ya que reportes previos mencionan que es una secuencia altamente conservada y con gran variabilidad en sus regiones que puede identificar tanto especies como subespecies de MNT (Roth, 2000). Por ITS se identificaron 59 aislamientos de MNT mientras que 13 no se lograron identificar debido a la falta de patrones reportados en la literatura y siendo la mayoría de los aislamientos identificados como *M. terrae* y *M. fortuitum*. En algunas especies identificadas con *hsp65* como *M. nonchromogenicum* las especies fueron identificadas por la secuencia ITS como *M. terrae*, lo cual muestra la cercanía entre el complejo *Mycobacterium terrae* (CMT). Por otra parte, la secuencia ITS mostró amplicones de diferentes tamaños de pb dependiendo de la especie de MNT. Las especies de *M. terrae* mostraron tamaños de 314 pb, mientras que las especies de *M. fortuitum* con la secuencia ITS mostraron alta variabilidad de tamaños entre 257 pb, 280 pb o 282 pb y número de amplicones, mostrando la gran mayoría dos bandas de aproximadamente 298/257 pb, debido a la presencia de 2 copias del operón 16S rRNA dentro de su secuencia. El aislamiento identificado como *M. senegalense* con la secuencia ITS fue identificado como *M. fortuitum* por *hsp65*, por su cercanía del clado *M. fortuitum* en la cual están inmersas ambas especies. Estos datos muestran que la secuencia utilizada en la identificación entre complejos o

especies cercanas muestra especificidad por ciertas especies. Los aislamientos de las especies identificadas como *M. gordonae* y *M. peregrinum* por *hsp65* se identificaron de manera similar con la secuencia ITS (Roth y col., 2000).

Todos los aislamientos de MNT provenientes de cisternas y los puntos del influente y efluente de las PTAR-CA y PTAR-CP identificados con el gen *hsp65* y la secuencia ITS, mostraron la presencia de especies pertenecientes al CMT, principalmente *M. terrae*, lo que indica que son especies ubicuas en el ambiente (Ngeow y col., 2015). Las MNT aisladas del influente de la PTAR-CA, influente y efluente de la PTAR-CP y de las cisternas 1 y 2 de agua tratada, identificadas por PCR-RFLP del gen *hsp65* y la secuencia ITS mostraron a *M. fortuitum* como el aislamiento más frecuente. Castillo-Rodal y col., (2011), reportaron la presencia de especies similares a las encontradas en este trabajo como *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, así como *M. arupense* y *M. nonchromogenicum*, pertenecientes al CMT, en el agua de los canales de Xochimilco. Es importante destacar la presencia de *M. fortuitum* en las cisternas y los efluentes, ya que es una de las especies de rápido crecimiento junto con *M. chelonae* y *M. abscessus* que se ha asociado a padecimientos como infecciones pulmonares, linfadenitis, infecciones diseminadas en pacientes inmunosuprimidos o en infecciones de piel y tejidos blandos (Guglielmetti, 2015).

En el presente trabajo la alta concentración de microbiota no permitió el aislamiento de BAAR en muestras del influente de la PTAR-CA en los años 2013 y 2014, a pesar de utilizar 4 métodos de descontaminación química diferentes con CPC, NaOH o SDS. Algunos estudios como el de Neumann, (1997), Thomson y col., (2008), Radomski, (2010), muestran que el uso de CPC 0.05% y 0.005% permite una mejor recuperación de MNT de muestras de agua que con NaOH. No obstante, la implementación de cualquier método puede reducir la presencia de las MNT, ya que algunas especies son más susceptibles a los descontaminantes que otras. Por otro lado, puede no impedir la contaminación de medios inoculados con agua residual, por lo que se debe tener en cuenta el origen de la muestra y las técnicas de aislamiento de las muestras para la recuperación efectiva de MNT al no existir una metodología estándar para la descontaminación. Dado que el origen de la muestra era agua residual del influente de la PTAR-CA, la alta carga de microorganismos contaminó los medios LJ en la segunda semana, impidiendo el crecimiento y visualización de colonias

de lento crecimiento pertenecientes a MNT. Por lo tanto, la alta carga de microbiota en el agua residual y la susceptibilidad al proceso de descontaminación de algunas especies de MNT puede encubrir la probabilidad de encontrar MNT en las muestras del influente impidiendo la detección de MNT en este lugar.

Por otro lado, no hubo aislamientos de colonias BAAR en muestras del efluente de la PTAR-CA posterior a la rehabilitación, incluso en muestras sin tratamiento con algún método de desinfección por 4 semanas, por lo que los procesos implementados en la PTAR-CA fueron adecuados en eliminar a la microbiota proveniente del influente.

En el año 2010 la presencia de 2 aislamientos de MNT en la cisterna 7 de agua potable en CU junto con datos de aislamientos de MNT en los sistemas de distribución de agua en la Ciudad de México reportados por Castillo-Rodal y col., (2011) y Pérez Martínez y col, (2013) mostraron la necesidad de evaluar la presencia de MNT en el sistema de distribución de agua potable de CU. Sin embargo, en los años 2013 y 2014 no hubo aislamientos BAAR en el sistema de distribución de agua de CU debido a que cuenta con sus propios métodos de extracción y desinfección de agua del subsuelo, por lo que se considera un sistema inmerso dentro de la Ciudad de México y de manejo independiente al Sistema de aguas de la Ciudad de México.

Ninguno de los 3 pozos de extracción de agua evaluados (P.Q., P.M. y P.V.A.) mostró crecimiento de colonias de MNT a pesar de encontrarse previo al tratamiento de desinfección, lo que muestra que inicialmente no hubo presencia de las MNT en los pozos. Por otra parte, tampoco se aislaron colonias de MNT en los 3 tanques evaluados (T.V.A., T.A. y T.B.) a pesar que PUMAGUA reportó variaciones en la inyección de cloro residual libre. En lo que respecta a la red de distribución de agua potable, de manera inicial se obtuvieron muestras mensuales en el año 2013 de los 5 puntos (D.G.O. y C., F.M., F.C., I.E. e I.I.) y no se aislaron crecimientos de colonias pertenecientes a BAAR. En el año 2014, a pesar de que se muestreó cada semana, nuevamente no hubo crecimiento de colonias pertenecientes a BAAR en los 5 puntos de la red de distribución. Los datos indican que no hubo presencia de MNT a lo largo del sistema de

distribución de agua potable durante el periodo 2013-2014, probablemente por el suministro eficiente de cloro residual libre desde los 3 pozos de extracción que permitió la erradicación de MNT presentes a lo largo del sistema de distribución de agua o por la profundidad inicial de los pozos de los cuales se extrae el agua.

CONCLUSIONES

El gen *hsp65* fue más específico en la identificación de especies de MNT que la secuencia ITS debido a una base de datos más robusta. Se identificaron 12 especies de MNT por medio de PCR-RFLP del gen *hsp65* y 5 especies con la secuencia ITS en agua residual y de reúso del influente y efluente de las PTAR-CA y PTAR-CP del año 2010, dominando las especies *M. fortuitum* y *M. terrae*. La rehabilitación de la PTAR-CA fue adecuada en la eliminación de las MNT, ya que no se aislaron MNT en los años 2013 y 2014 en el influente y efluente de la PTAR-CA, mientras que el agua potable del sistema de distribución de agua de CU ofreció agua potable que no mostró presencia de MNT, a pesar de no estar indicadas en normas mexicanas. Finalmente, se recomienda darle continuidad al sistema de control de calidad de agua de CU para que garantice el suministro de agua de buena calidad.

ANEXOS

Medio Middlebrook 7H10

Se preparó el medio Middlebrook 7H10 (BD) disolviendo 19 gr de polvo liofilizado en 900 mL de agua desionizada con 5 mL de glicerol. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. En campana de flujo laminar se adicionó 10% de OADC al tiempo y se vació en placas Petri hasta gelificarse. Se puso en prueba de esterilidad a 37°C por 1 día y se almacenó a 4°C hasta su uso (Cuadro 7).

Cuadro 7. Preparación del medio Middlebrook 7H10

Reactivo	Cantidad (g)	Reactivo	Cantidad (g)
Sulfato magnésico	0,025	Albúmina bovina (fracción V)	5,0
Citrato férrico de amonio	0,04	Catalasa	0,004
Citrato sódico	0,4	Piridoxina	0,001
Sulfato de amonio	0,5	Sulfato de zinc	0,001
Glutamato monosódico	0,5	Sulfato de cobre	0,001
Fosfato disódico	1,5	Biotina	0,0005
Fosfato monopotásico	1,5	Cloruro de calcio	0,0005
Agar	17,0	Verde malaquita	0,00025
Cloruro sódico	0,85	Glicerol	5,0
Glucosa	2,0	Ácido oleico	0,05 mL

pH 6,6 ± 0,2. Fórmula por litro de agua purificada.

Tinción de ZN

Dentro de una campana de flujo laminar de seguridad clase II (LABCONCO) en condición estéril se realizaron frotis de cada uno de los aislamientos y se dejó secar al aire libre. Se fijó la muestra en el frotis por calentamiento a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, se le agregó de manera constante fucsina fenicada durante 10 minutos, a llama directa para permitir la penetración del colorante y controlando la emisión de vapores en una campana de flujo laminar. Se lavó el portaobjetos con alcohol-ácido hasta eliminar el exceso de colorante y se enjuagó con agua la preparación. Finalmente, se realizó una tinción de contraste con azul de metileno durante 3 minutos, a temperatura ambiente. Pasado el

tiempo, la preparación se enjuagó con dH₂O y se dejó secar a temperatura ambiente. La preparación se observó a 100X en microscopio óptico.

Especies identificadas por *hsp65* e ITS

En el cuadro 8 se muestran las especies identificadas por PCR-RFLP del gen *hsp65* y la secuencia ITS.

Cuadro 8. Especies de MNT identificadas por PCR-RFLP del gen *hsp65* y la secuencia ITS

Aislamiento	Especies identificadas por <i>hsp65</i>	Especies identificadas por ITS
101	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
102	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
103	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
104	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
105	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i>
106	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
107	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
108	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
109	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i>
110	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. senegalense</i>
111	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i>
112	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
113	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
114	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
115	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M. terrae</i>
116	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2	<i>M. terrae</i>
117	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
118	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2	<i>M. terrae</i>
119	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
120	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2	<i>M. terrae</i>
121	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 1	<i>M. terrae</i>
122	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2	<i>M. terrae</i>
123	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2	<i>M. spp</i>
124	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 2	<i>M. spp</i>
125	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
126	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
127	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
128	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i>
129	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
130	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
131	<i>M. rhodesiae</i> tipo 1	<i>M. spp</i>

132	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
133	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
134	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
135	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. spp</i>
136	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
137	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
138	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
139	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i>
140	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
141	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
142	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
143	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
144	<i>M. triviale</i> tipo 1	<i>M. spp</i>
145	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
146 p	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
146F	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i>
147	<i>M. terrae</i> tipo 3 <i>M. peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i> / <i>M.</i>	<i>M. spp</i>
148	<i>septicum</i>	<i>M. peregrinum</i>
149	<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. spp</i>
150	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
151	<i>M. malmoense</i> tipo 1	<i>M. spp</i>
152	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M. terrae</i>
154	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
155	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VII
156	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M. terrae</i>
157	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i> tipo I
158	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M. terrae</i>
159	<i>M. spp</i>	<i>M. spp</i>
160	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> tipo VI
161	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. spp</i>
162	<i>M. gordonae</i> tipo 3	<i>M. gordonae</i>
163	<i>M. fallax</i> tipo 1	<i>M. spp</i>
164	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i> tipo I
165	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. terrae</i>
166	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M spp</i>
167	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
168	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
169	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
170	<i>M. gordonae</i> tipo 3	<i>M. gordonae</i>
171	<i>M. terrae</i> tipo 3	<i>M. spp</i>
172	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>

REFERENCIAS

- Angala, S. K., Belardinelli, J. M., Huc-Claustre, E., Wheat, W. H., & Jackson, M. (2014). The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(5), 361-399.
- Briancesco, R., Semproni, M., Paradiso, R., & Bonadonna, L. (2014). Nontuberculous mycobacteria: an emerging risk in engineered environmental habitats. *Annals of Microbiology*, 64(2), 735-740.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., ... & Parsons, L. M. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 99(6), 3684-3689.
- Cassidy, P. M., Hedberg, K., Saulson, A., McNelly, E., & Winthrop, K. L. (2009). Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 49(12), e124-e129.
- Castillo-Rodal, A. I., Mazari-Hiriart, M., Lloret-Sánchez, L. T., Sachman-Ruiz, B., Vinuesa, P., & López-Vidal, Y. (2012). Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(5), 683-694.
- Cázares, J. 2014. Calidad del agua de reúso: generación-almacenamiento-distribución, posterior a la renovación de la planta de tratamiento Cerro del Agua. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 128 pp.
- CONAGUA. (2015) Atlas del agua en México. Consultado el 13 de junio de 2016 en www.conagua.gob.mx
- Cook, G. M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R. A., Danilchanka, O., & Niederweis, M. (2009). Physiology of mycobacteria. *Advances in microbial physiology*, 55, 81-319.
- Cristea-Fernström, M., Olofsson, M., Chryssanthou, E., Jonasson, J., & Petrini, B. (2007). Pyrosequencing of a short hypervariable 16S rDNA fragment for

the identification of nontuberculous mycobacteria—a comparison with conventional 16S rDNA sequencing and phenotyping. *Apmis*, 115(11), 1252-1259.

Daley, C. L., & Griffith, D. E. (2010). Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections [Review article. 2010: The Year of the Lung. Series editor: John F. Murray]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14(6), 665-671.

De Hertogh, G., *et. al.* (2006). Validation of 16S rDNA sequencing in microdissected bowel biopsies from Crohn's disease patients to assess bacterial flora diversity. *The Journal of pathology*, 209(4), 532-539.

Diagnóstico y tratamiento de las infecciones por Micobacterias No Tuberculosas. México: Secretaría de Salud; 2014

EPA, (1999). Mycobacteria Health Advisory. Consultado el 04 de marzo de 2016 en <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/mycobacteria-report.pdf>

Euzéby JP: *List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus Mycobacterium*. <http://www.bacterio.net/index.html>.

Falkinham III, J.O. (2009), Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 356–367.

Falkinham III, J. O. (2009). The biology of environmental mycobacteria. *Environmental microbiology reports*, 1(6), 477-487.

Falkinham III, J. O. (2011). Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerg Infect Dis*, 17(3), 419-24.

Falkinham III, J. O. (2015). Environmental Sources of Nontuberculous Mycobacteria. *Clinics in chest medicine*, 36(1), 35-41.

Feazel, L. M., Baumgartner, L. K., Peterson, K. L., Frank, D. N., Harris, J. K., & Pace, N. R. (2009). Opportunistic pathogens enriched in showerhead

biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16393-16399.

Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., ... & Iseman, M. (2007). An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(4), 367-416.

Guglielmetti, L., Mougari, F., Lopes, A., Raskine, L., & Cambau, E. (2015). Human infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious diseases and clinical microbiology specialists' point of view. *Future microbiology*, 10(9), 1467-1483.

Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142(1), 3-16.

Gürtler, V., Harford, C., Bywater, J., & Mayall, B. C. (2006). Direct identification of slowly growing *Mycobacterium* species by analysis of the intergenic 16S-23S rDNA spacer region (ISR) using a GelCompar II database containing sequence based optimization for restriction fragment site polymorphisms (RFLPs) for 12 enzymes. *Journal of microbiological methods*, 64(2), 185-199.

Halstrom, S., Price, P., & Thomson, R. (2015). Review: environmental mycobacteria as a cause of human infection. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(2), 81-91.

Harmsen, D., Dostal, S., Roth, A., Niemann, S., Rothgänger, J., Sammeth, M., ... & Richter, E. (2003). RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infectious Diseases*, 3(1), 26.

Henkle, E., & Winthrop, K. L. (2015). Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clinics in chest medicine*, 36(1), 91-99.

Henkle, E., Hedberg, K., Schafer, S., Novosad, S., & Winthrop, K. L. (2015). Population-based incidence of pulmonary nontuberculous mycobacterial

-
-
- disease in Oregon 2007 to 2012. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(5), 642-647.
- Hett, E. C., & Rubin, E. J. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(1), 126-156.
- Jackson, M. (2014). The Mycobacterial Cell Envelope—Lipids. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, a021105.
- Jankute, M., Cox, J. A., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual review of microbiology*, 69, 405-423.
- Kazda, J. (2010). *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health: Impact on Animal's and Human's Health*. Springer Science & Business Media.
- Liu, R., Yu, Z., Guo, H., Liu, M., Zhang, H., & Yang, M. (2012). Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. *Science of the Total Environment*, 435, 124-131.
- Logan, N. A. (1994). The Actinomycetes. *Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, 211-231.
- Magee, J. G., & Ward, A. C. (2012). Family III. Mycobacteriaceae Chester 1897, 63 AL emend, p 312–326. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 5.
- Martínez, J. 2016. ¿De la llave o en botella? El agua potable en Ciudad Universitaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Políticas y Sociales. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 120 pp.
- Neonakis, I. K., Gitti, Z., Krambovitis, E., & Spandidos, D. A. (2008). Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of microbiological methods*, 75(1), 1-11.
- Neumann, M., Schulze-Robbeke, R., Hagenau, C., & Behringer, K. (1997). Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 547-552.

-
-
- Ngeow, Y. F., Wong, Y. L., Tan, J. L., Hong, K. W., Ng, H. F., Ong, B. L., & Chan, K. G. (2015). Identification of new genomospecies in the *Mycobacterium terrae* complex. *PloS one*, 10(4), e0120789.
- NOM-003-SEMARNAT-1997. Límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. Diario Oficial de la Federación. Publicada el 21 de septiembre de 1998.
- NOM-127-SSA1-1994 modificada 2000. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación. Publicada el 20 de junio de 2000.
- OMS, (2015). Agua. Nota descriptiva N° 391. Consultado el 13 de junio de 2016 en <http://www.who.int/topics/water/es/>
- OMS, (2011). Guidelines for Drinking-water Quality. *WHO chronicle*, 38, 104-8.
- Patel, J. B., Leonard, D. G., Pan, X., Musser, J. M., Berman, R. E., & Nachamkin, I. (2000). Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the Microseq 500 16S rDNA bacterial identification system. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 246-251.
- Perez-Martinez, I., Aguilar-Ayala, D. A., Fernandez-Rendon, E., Carrillo-Sanchez, A. K., Helguera-Repetto, A. C., Rivera-Gutierrez, S., ... & Gonzalez-y-Merchand, J. A. (2013). Occurrence of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria in Mexican household potable water: a pilot study. *BMC research notes*, 6(1), 531.
- Pfyffer, G. E. and Vincent, V., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *Mycobacterium leprae*, and Other Slow-Growing Mycobacteria. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*.
- Piersimoni, C., & Scarparo, C. (2008). Pulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *The Lancet infectious diseases*, 8(5), 323-334.
- Piersimoni, C., & Scarparo, C. (2009). Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerging infectious diseases*, 15(9), 1351-1360.

-
-
- Pourahmad, F., & Richards, R. H. (2013). Use of restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region (ITS) for identification of fish mycobacteria. *Aquaculture*, 410, 184-189.
- PUMAGUA, (2016) Informes PUMAGUA. Consultado el 20 de abril de 2016 en http://www.pumagua.unam.mx/pub_informes.html
- Radomski, N., Betelli, L., Moilleron, R., Haenn, S., Moulin, L., Cambau, E., ... & Lucas, F. S. (2011). *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and enterococci. *Environmental science & technology*, 45(12), 5380-5386.
- Radomski, N., Cambau, E., Moulin, L., Haenn, S., Moilleron, R., & Lucas, F. S. (2010). Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3514-3520.
- Rao, N., & Meena, L. S. (2010). Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and cord factor: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwig, W., & Mauch, H. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 139-147.
- Roth, A., Reischl, U. D. O., Streubel, A., Naumann, L., Kroppenstedt, R. M., Habicht, M., ... & Mauch, H. (2000). Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1094-1104
- Saleeb, P., & Olivier, K. N. (2010). Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease: new insights into risk factors for susceptibility, epidemiology, and approaches to management in immunocompetent and immunocompromised patients. *Current infectious disease reports*, 12(3), 198-203.
- Sidders, B., & Stoker, N. G. (2007) *Mycobacteria: Biology*. eLS.

-
-
- Singh, P., & Cole, S. T. (2011). *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future microbiology*, 6(1), 57-71.
- Skrypnyk, A. V. (2010). Molecular phylogeny of representatives of the genus *Mycobacterium* based on structural analysis of the hypervariable region A of the 16S ribosomal RNA gene. *Cytology and Genetics*, 44(3), 134-139.
- Stadthagen-Gomez, G., Helguera-Repetto, A. C., Cerna-Cortes, J. F., Goldstein, R. A., Cox, R. A., & Gonzalez-y-Merchand, J. A. (2008). The organization of two rRNA (rrn) operons of the slow-growing pathogen *Mycobacterium celatum* provides key insights into mycobacterial evolution. *FEMS microbiology letters*, 280(1), 102-112.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C., & Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2), 175-178.
- Thomson, R., Carter, R., Gilpin, C., Coulter, C., & Hargreaves, M. (2008). Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3094-3098.
- Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 319-354.
- UNESCO. (23 de 01 de 2006). Campus central de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado el 05 de abril de 2016, en World Heritage List: <http://whc.unesco.org/en/list/1250/documents/>
- Velayati, A. A., Farnia, P., Mozafari, M., Malekshahian, D., Seif, S., Rahideh, S., & Mirsaiedi, M. (2014). Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria isolates from clinical and environmental sources of a metropolitan city. *PloS one*, 9(12), e114428.
- Wang, H., Edwards, M., Falkinham, J. O., & Pruden, A. (2012). Molecular survey of the occurrence of *Legionella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water

distribution systems. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6285-6294.

Zeng, D. N., Fan, Z. Y., Chi, L., Wang, X., Qu, W. D., & Quan, Z. X. (2013). Analysis of the bacterial communities associated with different drinking water treatment processes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1573-1584.