



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
MICOBACTERIAS NO
TUBERCULOSAS EN AGUA DE LOS
CANALES DE XOCHIMILCO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARTHA ELVA MERCADO MORALES



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Rodolfo Pastelin Palacios

Vocal: Prof. Luciano Hernández Gómez

Secretario: Dra. Yolanda López Vidal

1er Suplente: Profa. Norma Trejo Medina

2do Suplente: Prof. Gonzalo Castillo Rojas

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

Dra. Yolanda López Vidal
Asesor

Dra. Antonia I. Castillo Rodal
Supervisor Técnico

Martha E. Mercado Morales
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por la asesoría y el gran apoyo brindado para la realización de esta tesis. A la M. C. Antonia Isabel Castillo Rodal por su asesoría técnica.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo económico otorgado al "Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas" para el Megaproyecto: "Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública. Tuberculosis" SDEI.PTiD.05.4

Al Dr. Francisco Quiñones Falconi. Jefe del Servicio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en donde se llevó a cabo la identificación bioquímica de las Micobacterias no tuberculosas.

Dra. Marisa Mazari. Laboratorio de Ecología Química, Instituto de Ecología por el material ambiental proporcionado

Para todo hay un tiempo señalado, aun un tiempo para todo asunto bajo los cielos: tiempo de nacer y tiempo de morir; tiempo de plantar y tiempo de desarraigar lo que se haya plantado. He visto la ocupación que Dios ha dado a los hijos de la humanidad y he llegado a saber que no hay nada mejor para ellos que regocijarse y hacer el bien durante la vida de uno; y también que todo hombre coma y realmente beba y vea el bien por todo su duro trabajo. Es el don de Dios

Eclesiastés 3:10-13

DEDICATORIAS

A mis padres

Gracias por haber cuidado de mí, por protegerme y esforzarse porque tuviera una vida feliz. Muy en especial a mi madre Angélica por su cariño, su confianza en mí y el apoyo incondicional que me ha brindado durante toda la vida.

A mis hermanos:

Mis dos queridos hermanos Angélica y José Luis por ser pacientes, soportarme y estar conmigo cuando los necesité. Soy muy afortunada por tenerlos.

A la tropa:

Liz, Mayra, Irene, Carmen, Gaby, Laurita y David por hacer divertida esta vida. Gracias por escucharme, consolarme y ser mis amigos. Con cada uno de ustedes he vivido momentos muy especiales, saben que son muy importantes para mí.

A las chicas... y Fer:

Karina, Tere, Paty, Rox, Adriana, Ivonne, Jacqueline, Carol y Fer por hacer de este laboratorio un lugar maravilloso.

Dra. Maritóna:

Gracias por brindarme su apoyo, por su paciencia y preocuparse por mí en todos los aspectos.

A todos mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana por su apoyo. Xóchil por su apoyo incondicional y ayuda. Al Dr. Mauricio Castañón por ayudarme cuando lo necesité, al Dr. Gonzalo Castillo por su gran disponibilidad y asesoría.

INDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>ii</i>
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Género <i>Mycobacterium</i>	1
1.2 Micobacterias No Tuberculosas	
1.2.1 Generalidades	2
1.2.2 Pared celular	3
1.2.3 Tinción	5
1.2.4 Susceptibilidad a agentes físicos y químicos	6
1.2.5 Aislamiento	7
1.2.6 Recuperación de MNT de muestras ambientales	8
1.2.7 Identificación	11
1.2.8 Epidemiología	14
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
4. METODOLOGIA	
4.1 Recolección y pretratamiento de las muestras	21
4.2 Recuperación de MNT	22
4.3 Aislamiento	22
4.4 Identificación molecular	23
4.5 Identificación bioquímica	28
5. RESULTADOS	
5.1 Aislamiento de MNT en agua de los Canales de Xochimilco	33
5.2 Evaluación de los métodos de recuperación	37
5.3 Identificación bioquímica y molecular	39
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFIA	52
ANEXO 1	56
ANEXO 2	59
ANEXO 3	60

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS EN AGUA DE LOS CANALES DE XOCHIMILCO

Resumen

Antecedentes Las Micobacterias no tuberculosas (MNT) son habitantes naturales del medio ambiente, están distribuidas en suelos y aguas naturales y se sugiere que su reservorio principal es el agua superficial y subterránea. En los últimos veinte años, diversos estudios han señalado un incremento de infecciones por MNT tanto en huéspedes inmunocomprometidos como en inmunocompetentes, a pesar de ello la distribución e incidencia de MNT en el mundo no se conoce del todo. Hasta el momento no existen evidencias de transmisión de persona a persona por lo que se ha propuesto que la infección ocurre a través de fuentes ambientales, considerando el agua como vehículo principal de transmisión de las MNT. Un factor importante en el estudio de MNT es que son consideradas como una de las causas de variación de la eficacia protectora de la vacuna *M. bovis* BCG al presentar reacción cruzada con MNT. Se han descrito diferentes métodos para el aislamiento de micobacterias de muestras ambientales, pero estos no son universalmente aplicables debido a las diferencias entre las zonas geográficas y flora, por lo que se propone que para lograr una eficiente recuperación de micobacterias ambientales pudiera ser necesario desarrollar un método para cada región del mundo en estudio.

Objetivo Aislamiento e identificación de MNT en agua superficial de los Canales de Xochimilco de la Ciudad de México. Determinar el mejor método de descontaminación para la recuperación de MNT.

Metodología Veinte sitios del área ecológica de Xochimilco fueron seleccionados por ser representativos de las zonas. Las muestras de agua fueron tratadas para aislamiento de micobacterias utilizando dos métodos distintos (hidróxido de sodio y cloruro de cetilpiridinio) y a partir de estos aislamientos se realizó la identificación por métodos bioquímicos y moleculares.

Resultados De los métodos empleados ninguno permitió la recuperación de MNT al 100%. Existen diferencias de susceptibilidad de las micobacterias a los dos métodos empleados, por lo que algunas especies no podrían ser recuperadas si solo se emplea uno de los métodos. El NaOH 1% /SDS 3% obtuvo la mayor recuperación de MNT y presenta bajos porcentajes de pérdida de cultivos ya sea por contaminación o bien por inhibición del crecimiento. La recuperación de MNT obtenida fue del 95% con 19 morfologías coloniales diferentes. Las MNT de rápido crecimiento fueron los más frecuentes, tanto cepas pigmentadas como no pigmentadas. Las MNT de lento crecimiento fueron en su mayoría cepas pigmentadas. Los resultados de identificación obtenidos por pruebas bioquímicas e INNO-LiPA no fueron concordantes.

Conclusiones El NaOH 1% /SDS 3% fue el mejor método para el aislamiento de MNT; sin embargo, se sugiere el uso de CPC 0.05% en tiempos de exposición mayor a 30 min, debido a las diferencias de susceptibilidad de las micobacterias. La inclusión de un método molecular capaz de identificar la mayoría de las especies de micobacterias existentes y con una sensibilidad alta es necesaria para determinar con precisión las especies de micobacterias recuperadas.

Antecedentes

1.1 El género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* se encuentra ubicado dentro del orden Actinomycetales y es el único género de la familia Mycobacteriaceae. Está relacionada a otros géneros que contienen ácidos micólicos. El alto contenido de guanina-citosina en el DNA de las especies del género *Mycobacterium* (61 a 71% mol, excepto *M. leprae* [55%]) está en el intervalo de otros géneros que contienen ácido micólico, *Gordonia* (63 a 69 %mol), *Tsukamurella* (68 a 74%mol), *Nocardia* (64 a 72%mol) y *Rhodococcus* (63 a 73%mol). [4]

Las micobacterias son microorganismos aeróbicos (con excepción de algunas especies que crecen bajo atmósferas de oxígeno reducido), crecen significativamente más lento que las otras bacterias, no forman esporas, son inmóviles, no capsuladas y no presentan una agrupación característica [4]. Contienen una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico que otorga el 60% del peso seco de la misma.

El género *Mycobacterium* está integrado por bacterias pleomórficas (bacilos rectos y/o ligeramente curvos), miden 0.2 a 0.6 μm de ancho por 1.0 a 10 μm de largo y exhiben gran variación en la velocidad de crecimiento (tiempos de duplicación 2-48 hr), morfología colonial, sensibilidad a antibióticos y biocidas, presencia de plásmidos y factores de virulencia. [38]

La morfología colonial varía entre especies, puede ir de lisa a rugosa y de no pigmentada a pigmentada (amarillas, naranjas o raramente rosas) usualmente debido a la formación de pigmentos carotenoides. [4]

Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 100 especies[5], con fines prácticos se establecen tres grupos en función de la entidad(es) nosológica(s) producida(s):

- a) El complejo *M. tuberculosis* causante de la tuberculosis se encuentra formado por las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (incluido el bacilo de Calmette-Guérin o BCG utilizado en la vacunación), *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*, que causa la tuberculosis en las ratas de campo;
- b) *M. leprae*, agente causal de la lepra; y
- c) Micobacterias no tuberculosas que causan las micobacteriosis.

1.2 MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS

1.2.1 Generalidades de MNT

El potencial patogénico de las MNT ha sido reconocido desde principios del siglo XIX^[22], Pinner denominó a estos organismos por primera vez como micobacterias atípicas, originario de la creencia errónea de que eran cepas de *M. tuberculosis* inusuales. ^[23] Desde su identificación se les ha conocido con diversos nombres^[1] como anónimas, no tuberculosas, ambientales, oportunistas, bacilos tuberculosos distintos a la micobacteria (MOTT) por sus siglas en inglés; y aunque actualmente no existe un término universalmente empleado, el de micobacterias no tuberculosas (MNT) es el más aceptado. ^[24]

Las micobacterias ambientales incluyen aquellas especies del género *Mycobacterium* que no son miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (de ahí el término micobacterias no tuberculosas). Se distinguen de las del complejo, por no ser patógenos obligados y encontrarse en el ambiente como saprofitos, comensales y simbioses. ^[10, 12, 38]

Las MNT están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de una amplia variedad de reservorios ambientales: agua, suelo, aire, protozoarios, animales, humanos, plantas y alimentos. ^[2,3]

Aunque la temperatura óptima de crecimiento general suele ser de 35-37°C, existen determinadas especies que requieren temperatura óptima de 30°C (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *M. haemophilum*), 42°C (*Mycobacterium xenopi*) o 52°C (*Mycobacterium thermoresistibile*) para obtener una mejor tasa de crecimiento. ^[11, 53]

Las micobacterias ambientales se dividen en micobacterias de crecimiento rápido y lento. Las micobacterias de crecimiento rápido forman colonias en menos de 7 días y esto se debe a la posesión de dos cistrones 16S rRNA (excepto *M. chelonae* y *M. abscessus* que solo tienen uno) mientras que las de crecimiento lento requieren 7 días o más para la formación de colonias y solo cuentan con un cistron. Aunque la posesión de un solo cistron rRNA fuerza a la micobacteria a crecer lentamente, también le confiere una resistencia innata a una amplia variedad de agentes antimicrobianos, incluyendo desinfectantes y antibióticos. La baja velocidad metabólica también imparte más tiempo para adaptación en ambientes estresantes. ^[38]

En 1959 Runyon clasificó a las MNT con base a su velocidad de crecimiento y formación de pigmento. La producción de pigmento está en relación con la exposición a la luz: a) fotocromógenas si la producción depende de la luz, b) escotocromógenas si es independiente de la misma y c) No fotocromógenas cuando no producen pigmentos. De esta forma surgieron 4 grupos de trascendencia clínica: Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas) y Grupo III (no fotocromógenas) que son de crecimiento lento y el Grupo IV de crecimiento rápido.

Aunque esta clasificación tiene cierta utilidad microbiológica, en la actualidad ante la incesante aparición de nuevas especies y las diferentes características fenotípicas que algunas de ellas pueden adoptar, se prefiere realizar una identificación a nivel de especie

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

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

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

1.2.2 PARED CELULAR

El 60% de la pared celular de las micobacterias se encuentra conformada por lípidos diversos. La pared celular peptidoglicolípida contiene ácido meso-diamin-opimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa. Los ácidos micólicos (contienen entre 60 y 90 átomos de carbono) junto con lípidos libres (como 6,6'-dimecolato de trehalosa), le proporcionan una barrera impermeable hidrofóbica. Otros ácidos grasos importantes son las ceras, fosfolípidos, ácidos micoserosicos y ácidos ftienoicos. Diversos ácidos grasos (10-20 átomos de carbono) son encontrados también, incluyendo ácido tuberculosteárico (ácido 10-R-metil octadecanoico), único componente celular para algunos miembros de los *Actinomycetales*.^[4]

La envoltura celular del género *Mycobacterium* consiste de tres estructuras mayores: la membrana citoplasmática, la pared celular y la capa lipídica externa. La pared celular está compuesta de peptidoglicanos unidos covalentemente a la arabinogalactana, un polímero de arabinosa y galactosa. En la porción más distal y externa de los arabinogalactanos se hallan

esterificados largas cadenas carbonadas (C60 a C90) llamadas ácidos micólicos. La capa lipídica externa está compuesta de un amplio intervalo de lípidos complejos libres y junto con los ácidos micólicos, forma una pseudobicapa. [59]

Los glucolípidos son un grupo de compuestos (micolatos de trealosa, sulfolípidos, micósidos, etc) que se encuentran asociados no covalentemente a los ácidos micólicos y se ubican periféricamente en la pared. Los micolatos de trealosa (llamados factores de cordón porque su presencia produce cultivos que tienen forma de cordones serpenteantes) y sulfolípidos se encuentran principalmente en las cepas de micobacterias más virulentas. El lipoarabinomano (LAM) es una molécula que se halla anclado en la membrana citoplasmática. El LAM es considerado como el equivalente micobacteriano del lipopolisacárido de las Gram negativas debido a que provoca una importante respuesta antimicrobiana en macrófagos. En las cepas de micobacterias más virulentas la arabinosa terminal del LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM) a diferencia de las cepas no virulentas no están recubiertas (AraLAM). Además, el LAM también podría funcionar como poro para el paso de los nutrientes a través de la pared celular. [60]

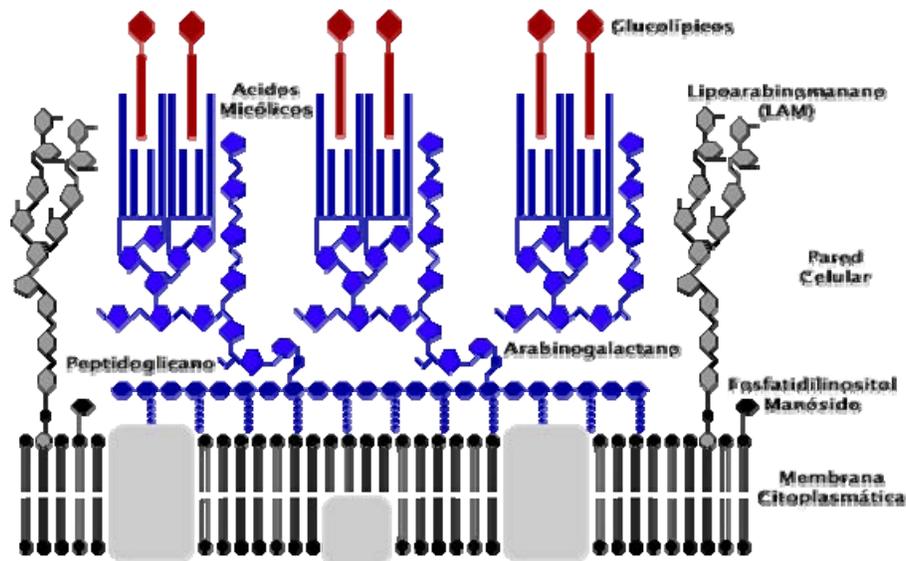


Figura 1. Esquema de la envoltura celular del género *Mycobacterium* [60]

La composición de su pared celular confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, que es responsable entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia en determinadas tinciones para su visualización microscópica. La impermeabilidad de la pared celular tiene una función muy importante en la supervivencia intracelular durante la infección en animales y protozoarios. [38, 59]

1.2.3 TINCIÓN

Las micobacterias son microorganismos difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales debido al alto contenido de lípidos de su pared celular, en especial ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos). Sin embargo, las micobacterias son usualmente consideradas como Gram positivas a pesar de que no son fácilmente teñibles por el método de Gram, observándose como zonas claras o "fantasmas".^[4]

Existen distintos métodos de tinción de micobacterias, las más comunes se basan en el uso de fucsina fenicada como colorante primario o auramina O.

- a) Las tinciones que utilizan fucsina fenicada (carbolfucsina) como colorante primario, como es el caso en Ziehl-Neelsen o variantes como la de Kinyoun, los microorganismos se tiñen de rojo sobre un fondo azul o verde dependiendo del colorante de contraste utilizado. La variante de Kinyoun o coloración fría, emplea cuerpos tensoactivos sin necesidad de calentar el colorante.
- b) Las tinciones que utilizan como colorante primario auramina O, auramina-rodamina produce que los microorganismos AAR bajo la luz ultravioleta, parezcan fluorescentes de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado.

Para lograr la penetración del colorante primario al interior de la micobacteria se debe recurrir al calor o a determinados detergentes según el método utilizado. Una vez dentro, el colorante no podrá ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido o ácidos minerales. Esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y es útil para la visualización de este grupo específico de bacterias. Aunque la naturaleza exacta del mecanismo de la ácido-alcohol resistencia no es completamente entendido, se piensa que el fenol permite la penetración del colorante, lo cual es facilitado por las altas temperaturas aplicadas en la tinción de Ziehl-Neelsen; además de que las micobacterias son capaces de formar complejos estables con ciertos colorantes arilmetanos como la fucsina o la auramina O. Los residuos de ácido micólico de la pared celular retiene el colorante primario aún después de la exposición a alcohol ácido o ácidos minerales fuertes.^[4]

La diferencia básica entre ambos métodos radica en el aumento microscópico requerido y por tanto el número de campos a visualizar. Los métodos con carbolfucsina precisan de un ocular-objetivo de inmersión de gran aumento (x 1.000), mientras que las técnicas fluorescentes requieren menos esfuerzo para observar la preparación con un ocular-objetivo de menor aumento (x 250) sin pérdida de sensibilidad. Ello permite una mayor rapidez de lectura y un menor cansancio del microscopista.

Debido a que los artefactos pueden estar presentes en la tinción, es necesario observar la morfología bacteriana cuidadosamente. Los BAAR son aproximadamente 1 a 10 μm de largo y típicamente son bastoncillos largos, 0.2 a 0.6 μm de ancho, con apariencia curvada o "torcida". Individualmente los bacilos pueden presentar áreas densamente teñidas y áreas de tinción alternada, produciendo una apariencia arrosariada. Las MNT se observan pleomórficas, como filamentos largos o formas cocoides con propiedades de tinción uniforme. [4]

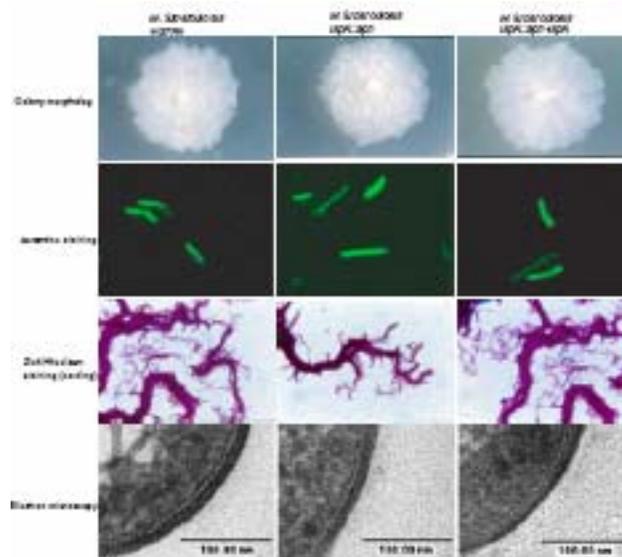


Figura 2. Tinción Ziehl-Neelsen y fluorescencia del género *Mycobacterium*[59]

1.2.4 SUSCEPTIBILIDAD A AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS

Las micobacterias presentan la característica de una pared bacteriana con alto contenido en lípidos complejos que le permiten ser resistentes a la desecación, al poder bactericida o bacteriostático de álcalis, ácidos y oxidantes.

La alta resistencia de las micobacterias a la desecación y congelación las hace capaces de sobrevivir por semanas o hasta meses sobre objetos inanimados si están protegidos de la luz solar. Las micobacterias son inactivadas por calor ($>65^{\circ}\text{C}$ por no menos de 30 min) y por luz UV. También son más resistentes a ácidos, álcalis y algunos desinfectantes químicos que muchas otras bacterias no formadoras de esporas. El verde malaquita, compuestos cuaternarios de amonio, hexaclorofeno y clorexidina solo actúan como bacteriostáticos en el mejor de los casos.[4] Jones y col mostraron que las MNT pueden ser muy tolerantes a concentraciones elevadas de verde de malaquita (hasta 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y pueden crecer de manera óptima en concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que es una concentración mayor a la que se encuentra en los medios de cultivo. [51]

Existen diferentes esterilizantes de uso común tales como vapores de óxido de etileno y formaldehído, compuestos de cloro, etanol 70%, glutaraldehído alcalino 2%, ácido peracético y peróxido de hidrógeno estabilizado. Sin embargo, algunos de estos agentes pueden ser inactivados en presencia de materia orgánica (como los alcoholes) por lo que no pueden ser usados como desinfectantes en esputo y otros materiales que contengan proteína.^[4] Algunos de estos desinfectantes son efectivos para eliminar micobacterias, sin embargo existen reportes del incremento en la resistencia de diferentes especies de micobacterias a varios desinfectantes.

Taylor y col. en el 2000 comparan la susceptibilidad de aislamientos clínicos y ambientales de *M. avium* a diferentes desinfectantes: cloro, monoclaramina, dióxido de cloro y ozono en medio de cultivo y en agua. Todos los aislamientos fueron resistentes a los desinfectantes probados y esta resistencia se incrementa 10 veces más, cuando se encuentran en agua que en medio de cultivo. ^[62]

Adicionalmente, en numerosos estudios se han aislado micobacterias de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano, demostrando que estos microorganismos no son eliminados por desinfectantes comunes (ozono, cloro, cloramina) y pueden persistir en estos sistemas por largos períodos de tiempo. ^[34, 40, 39, 52]

1.2.5 AISLAMIENTO

Las micobacterias suelen ser bastante exigentes y requieren de medios ricos y frescos. Algunas especies (*Mycobacterium genavense* o *Mycobacterium haemophilum*) precisan de suplementos especiales como son micobactina, hemina u otros componentes férricos para crecer. ^[11]

El aislamiento de MNT siempre va acompañado de diversos contaminantes incluyendo bacterias y hongos. Actualmente se cuenta con medios *selectivos* con diversos antibióticos para prevenir el crecimiento de la flora bacteriana o fúngica acompañante. ^[50]

En general, para el aislamiento primario a partir de muestras clínicas se prefieren medios *no selectivos* y aunque estos no contienen antibióticos, poseen algunas sustancias inhibitoras para el control de bacterias contaminantes, como son los colorantes de anilina (verde de malaquita o cristal violeta). Su concentración suele ser crucial para mantener el equilibrio entre la recuperación micobacteriana deseada y la posible contaminación de las muestras, si la concentración de la otra flora es muy elevada puede llegar a afectar seriamente el crecimiento micobacteriano.

Medios con huevo

Son medios ricos que contienen huevo (entero o sólo yema), fécula de patata, sales, glicerol y un agente inhibitor como es el verde de malaquita ^[51]. Las ventajas fundamentales radican en la buena recuperación de gran parte de las especies micobacterianas y su buena capacidad tanto inhibitora de la flora contaminante como amortiguadora que permite neutralizar algunos restos de diversos productos descontaminantes. Además, poseen una vida media prolongada cuando se conservan a 2-8 °C (6 meses). Sin embargo, son medios difíciles de preparar (coagulación a 85-95 °C) lo que conlleva algunas variaciones de un lote a otro, esto puede influir en la concentración final de los

antimicrobianos en las pruebas de sensibilidad *in vitro*. También presentan, algunos problemas para distinguir entre los restos del inóculo y el crecimiento micobacteriano y si se contamina la muestra se afecta todo el medio pudiendo llegar a licuarse. [4]

El medio más utilizado para el aislamiento de micobacterias es Löwenstein-Jensen, aunque existen otros en virtud de su mayor o menor capacidad inhibitoria de la flora presente (Petragnani Coletso o American Thoracic Society) que varían tan sólo en la concentración del verde de malaquita. [50]

Medios sólidos con agar

Estos medios sintéticos, tipo 7H10 y 7H11 de Middlebrook, son transparentes y permiten una detección rápida del crecimiento micobacteriano (10-12 días) que se puede distinguir de los residuos de la muestra en la siembra. Además de utilizarse para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. La inclusión de un 2% de glicerol permite un mejor crecimiento del complejo *M. avium-intracellulare*. El medio 7H11 contiene un 0,1% de hidrolizado de caseína que favorece la recuperación de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniacida. Los principales inconvenientes residen en un precio superior a los medios con huevo, una vida media corta (1 mes a 2-8 °C) y una mayor tasa de contaminaciones al contener una concentración menor de verde de malaquita. El almacenaje es delicado ya que un exceso de temperatura o exposición a la luz puede deteriorar el medio y estimular la producción de formaldehído que es tóxico para las micobacterias [4, 50]

Medios líquidos

En general, son medios enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y más rápidamente que los medios sólidos. Por ello se recomienda incluirlos siempre para el aislamiento primario de muestras clínicas. Además estos medios se utilizan como base para diversas pruebas de identificación bioquímica y de sensibilidad a los antimicrobianos. Por otro lado, tienen la desventaja de no visualizar la morfología de la colonia ni valorar los posibles cultivos mixtos. Aparte de los clásicos 7H9 de Middlebrook, Dubos, Youmans, Proskauer-Beck, etc., existen una serie de sistemas comerciales que, utilizando la base de los convencionales, logran un alto rendimiento. [4, 50]

1.2.6 RECUPERACIÓN DE MNT EN MUESTRAS AMBIENTALES

El aislamiento de micobacterias a partir de muestras ambientales se dificulta por dos razones:

1. Las muestras ambientales contienen un gran número de otros microorganismos diferentes (bacterias y hongos)
2. No todas las especies de micobacterias son igualmente resistentes a los diferentes agentes químicos empleados en los procesos de recuperación. [8, 56, 62]

Se han descrito diferentes métodos para el aislamiento de micobacterias de muestras ambientales, pero estos no son universalmente aplicables debido a las diferencias entre floras bacterianas presentes en las diversas áreas geográficas. [6, 7, 8]

Entre las técnicas que se han propuesto para la recuperación de MNT se encuentran:

- Soluciones de ácido oxálico (1.25%): muestran una alta efectividad en la reducción de la población de bacterias Gram-negativas, sin embargo, también muestran una gran reducción (96%) en la cuenta viable de MNT. [21]
- Formaldehído, puede usarse en procedimientos que involucren el uso de membrana de filtración, reduce la flora contaminante y permite una buena recuperación de MNT. Sin embargo, algunas especies de MNT pudieran no ser recuperadas con este tratamiento. Se recomienda su uso a una concentración de 1% y 5 min de exposición [21]
- El hipoclorito de sodio (0.2 µg/ml de cloro libre) mostró ser muy efectivo tanto en la reducción de la población bacteriana de Gram-negativa así como en la recuperación de MNT. Sin embargo, el tratamiento de las muestras en ocasiones exige el uso de tiosulfato de sodio el cual neutraliza el cloro presente en el agua, por lo que no puede utilizarse en la recuperación de MNT en muestras de agua. [21]

Hidróxido de sodio

El hidróxido de sodio (NaOH) es el agente químico más empleado, además de poseer propiedades mucolíticas. Al tratarse de un álcali muy potente resulta crítica la concentración empleada, así como el tiempo de exposición. Una descontaminación agresiva eliminará del orden del 20 al 90% a las micobacterias presentes en una muestra clínica. [5]

Engback y col. usaron 5 métodos distintos para recuperación de MNT siendo el más viable el método de lauril sulfato de sodio [5]. Kamala y col. compararon seis métodos distintos, encontrando que el tratamiento con SDS 3% y NaOH 1% es el método de recuperación más efectivo para muestras de agua y suelo [6]. Parashar y col. en India siguieron este último método para aislar micobacterias de un ambiente cálido y seco en la India, sin embargo, la contaminación no fue eliminada debido a las diferencias en el grado de contaminantes presentes en las muestras. Para el tipo de muestras que manejaron el mejor método de recuperación fue el de NaOH 4% con SDS al 3% y cetrimida al 2%, eliminando el 100% de la contaminación y aislando ambos tipos de micobacterias, tanto de lento como de rápido crecimiento. Los autores proponen que para lograr una eficiente recuperación de micobacterias ambientales pudiera ser necesario desarrollar un método para cada parte del mundo. [7]

Le Dantec y col. utilizaron una solución de NaOH 1% y SDS 3% para eliminar a otros microorganismos de las muestras de agua de los sistemas de distribución de París. Determinaron el límite de detección de este método de recuperación de MNT usando cultivos de *M. gordonae* a concentraciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 UFC por litro. El proceso de descontaminación redujo el número de micobacterias a 1% del número original. [39]

Cloruro de cetilpiridinio

El cloruro de cetilpiridinio (CPC) o cloruro de 1-hexadecil piridinio, es un agente tensoactivo catiónico (grupo activo con carga positiva) que se encuentra dentro de los detergentes más potentes en cuanto a su actividad desinfectante, siendo activo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [8]. Por su estructura química se le clasifica como un compuesto de amonio cuaternario, sus tres grupos alquílicos cortos y un grupo alquílico largo lo hace más activo en comparación con otras sales de amonio. Son rápidamente bactericidas a concentraciones muy bajas (del orden de una parte por millón, 1 ppm), siempre que en el material a tratar no exista materia orgánica.

Daña la integridad estructural de la membrana, es decir, la disposición ordenada de lípidos y proteínas, de modo que interfieren con su función ejerciendo un efecto neto de interferencia con procesos de transporte y metabolismo energético; así como salida de pequeñas moléculas de la célula [61]. La porción hidrofóbica penetra en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos, provocando alteraciones en dichas membranas, reflejadas en la pérdida de su semipermeabilidad, con salida de metabolitos de N y P desde el citosol. Es entonces cuando el detergente puede entrar al interior celular, con un efecto secundario de desnaturalización de proteínas. Su actividad se mejora a pH alcalino. [61]

El cloruro de cetilpiridinio ha sido recomendado como un medio de eliminación de organismos no ácido alcohol resistentes de esputo y por su baja toxicidad se emplea como desinfectante y antiséptico tópico. [8,9]

Smithwick y col. en 1975 proponen un método que licua y descontamina de manera efectiva las muestras de esputo. El procedimiento consiste en tratar la muestra con una solución de CPC 0.5% por 5 días hasta su licuefacción total y lo compara con el tratamiento inmediato de la muestra con NALC-NaOH. Sus resultados muestran que la contaminación es menor con respecto a la del método tradicional (NaOH/NALC), la frecuencia de aislamiento es la misma y que incluso otras micobacterias no tuberculosas son aisladas con mayor frecuencia. [9]

Du Moulin y Stottmeier en 1978 encontraron un método selectivo de recuperación de MNT para grandes volúmenes de agua. La adición de CPC al 0.04% (concentración final) en las muestras de agua eliminó de manera eficiente las bacterias no ácido alcohol resistentes (*P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *Flavobacterium sp*, *Acinetobacter calcoaceticus*) logrando una recuperación de micobacterias entre el 1 y 100% dependiendo de la especie. La exposición al CPC fue de 24 horas, por lo que sugieren que un menor tiempo de acción del descontaminante pudiera mejorar el % de recuperación. [8]

Carson y col. compararon la eficacia de distintas sustancias químicas en la recuperación de MNT de muestras de agua. El CPC (25µg/ml) demostró una buena recuperación de MNT (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, MCL0, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*) con una media de supervivencia de 84-93.7% después de 10 min de exposición, pero bajo estas condiciones el número de bacterias gram negativas que se añadieron como contaminantes no fue reducido (menos de una unidad logarítmica). Sin embargo, señalan que el incremento en la concentración (500 y 1000 µg/ml) y el

aumento en el tiempo de exposición (15-30 min) pudieran permitir una reducción en la cuenta viable de bacterias gram negativas. [21]

1.2.7 IDENTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevas y mejores técnicas de laboratorio ha permitido que nuevas especies de micobacterias no tuberculosas sean descubiertas. Actualmente se han identificado más de 100 especies diferentes [55]. Algunos de los métodos utilizados para la identificación de MNT son:

I. Identificación fenotípica

Microscopía. Una característica microscópica común de todo el género *Mycobacterium* es su ácido-alcohol resistencia. Existen además diferencias microscópicas que pueden orientar de manera presuntiva, la identificación de alguna especie. Por ejemplo *M. tuberculosis* en medio líquido, frecuentemente se observa como serpentina acordonada (factor cordón). El complejo *M. avium* puede distinguirse de *M. xenopi* por la apariencia microscópica de nido de pájaro o *M. lacus* que se caracteriza microscópicamente por ser un bacilo largo con prominente arrosamiento. [11, 53]

Velocidad de crecimiento. Se basa en los días de incubación que un subcultivo sólido necesita para la detección de colonias visibles macroscópicamente. Un punto crítico es la dilución del inóculo utilizada en dicho subcultivo. Las micobacterias que tardan más de 7 días serán catalogadas como de crecimiento lento mientras que las que crecen en menos de 7 días son de crecimiento rápido. [4]

Temperatura de crecimiento. Permite tanto la recuperación de determinadas especies como su identificación presuntiva, por ejemplo aunque en general las micobacterias se desarrollan a temperaturas entre 35-37°C, algunas especies precisan de temperaturas más bajas (30°C) para obtener un buen desarrollo como *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *M. haemophilum* mientras que otras requieren de temperaturas más elevadas como *Mycobacterium xenopi* cuya principal característica es su capacidad de crecer a 45°C, pero no a 28°C. Algunas micobacterias presentan características particulares que ayuda a diferenciarlas de otras especies, como es el caso de *Mycobacterium thermoresistibile* que puede crecer a 52°C o *M. szulgai* la cual se observa como escotocromógena a 37°C pero fotocromógena a 25°C. [11, 53]

Características de las colonias

- a) Producción de pigmento. Se basa en la capacidad de producir pigmentos carotenoides en relación con la exposición a la luz
- b) Morfología de las colonias. Las características morfológicas de las colonias se puede observar tanto en medios con base de huevo o de agar
- c) Pruebas bioquímicas. El número de estas pruebas ha llegado a ser muy amplio y a veces ambiguos, lo que ha dado lugar a problemas de interpretación de las mismas. Otros aspectos negativos de estas técnicas son la necesidad de un gran inóculo (cultivos muy crecidos) y la lentitud en la obtención de resultados, especialmente los negativos. En 1992 se propusieron unos requisitos mínimos para la definición de especies de micobacterias de crecimiento lento [58]. Entre estos

requisitos se encuentra un número limitado de pruebas bioquímicas que, junto con pruebas genéticas y moleculares, permiten la caracterización de las distintas especies de este grupo de micobacterias. En el caso de las **micobacterias de crecimiento rápido**,^[57] la gran variabilidad de los resultados para una misma prueba dentro de la misma especie hace no confiables estas pruebas para su caracterización fenotípica. Recientemente, se ha propuesto un esquema de identificación fenotípica para las especies no pigmentadas de crecimiento rápido basado fundamentalmente en la capacidad de crecer en medios con determinados azúcares como única fuente de carbono. Sin embargo, este esquema no es válido para el amplio grupo de cepas pigmentadas MNT de crecimiento rápido (sin implicaciones clínicas en patología humana, salvo casos anecdóticos), debido a la variabilidad de los resultados que hace virtualmente imposible una caracterización fenotípica correcta, debiendo recurrirse a técnicas moleculares.^[26,27]

La identificación de las micobacterias mediante pruebas bioquímicas exige experiencia y el conocimiento de su fundamento. Además, debe tenerse en cuenta que la identificación no puede apoyarse sólo en una prueba por muy específica que parezca (caso de la niacina y *M. tuberculosis*), sino en los resultados coherentes de un conjunto de ellas.^[58]

II. Identificación cromatográfica

El análisis cualitativo de la composición lipídica de la pared de las micobacterias permite diferenciar especies o grupos de especies. Existen tres tipos de técnicas cromatográficas utilizadas en la identificación de micobacterias: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La TLC y la HPLC permiten un análisis directo de los ácidos micólicos mientras que la GLC los analiza a través de sus productos de descomposición.

La TLC permite la diferenciación de ésteres de siete tipos de ácidos micólicos conocidos. Una vez que los ácidos micólicos han sido liberados de todas las células, pueden ser extraídos como micolatos por medio de metil-esterificación. Luego son colocados sobre una lámina de sílica gel (fase estacionaria), donde pueden ser separados por capilaridad con la elución de solventes (fase móvil). La identificación de los compuestos separados, los cuales se visualizan como manchas, es determinada por su posición y es generalmente realizada por comparación del patrón con cepas referencias corridas al mismo tiempo que la muestra.^[53]

Para obtener el cromatograma de HPLC, los ácidos micólicos son liberados de las células completas por medio de saponificación y extracción con cloroformo, para luego ser transformados a ésteres de bromofenacil adsorbidos por UV. Los extractos son inyectados en la columna, donde son eluidos por la fase móvil, un gradiente de metanol y cloruro de metileno. Las fracciones eluidas son cuantificadas por absorción UV usando un detector a 254-260 nm. Recientemente la sensibilidad del método ha mejorado reemplazando la detección por UV por absorción de fluorescencia.^[53]

En el análisis por HPLC, los ácidos micólicos son separados en base a su polaridad y la longitud de su cadena de carbonos, la más polar y la más corta eluye primero. En contraste a la TLC, la identificación de los compuestos eluidos no es importante. La distribución de los picos más grandes

en el cromatograma, la posición sobre la base de su tiempo de retención y el peso en comparación con los otros picos son la única información necesaria. Cada especie es caracterizada por el patrón con un número, posición y peso particular de los picos. La comparación visual de los cromatogramas con uno de especie conocida permite la identificación [53]

Con GLC no solo los ácidos micólicos son analizados sino también todos los componentes lipídicos de la pared celular. En la GLC los ácidos grasos, una vez que son extraídos como metil ésteres de las células completas por medio de metanolisis son sometidos a trifluoroacetilación, lo cual mejora la detección por alcohol. Luego son inyectados en el cromatógrafo de gas donde son movidos a través de una columna temperatura controlada por el acarramiento del gas. La cuantificación de los productos eluidos es determinada por medio del detector de ionización por flama. La identificación se realiza en base al tiempo de retención y puede ser confirmado por espectrometría de masas. [53]

III. Identificación molecular

En la actualidad, la identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una precisa y rápida identificación de las especies micobacterianas. Sus principales ventajas consisten en una aplicación universal sobre todos los aislamientos, posible detección rápida (directo de muestras o cultivos recientes), identificación de microorganismos de difícil cultivo, gran seguridad biológica y una adecuada relación coste-beneficio. Las desventajas, aparte de las contaminaciones potenciales y limitaciones en su empleo directo sobre muestras clínicas, es que estas técnicas no pueden hoy día sustituir completamente a la metodología tradicional, ya que apenas existe comercialización de las mismas y algunas como la secuenciación, requieren una inversión inicial elevada además de equipo y personal calificado.

Sin embargo, hoy en día es universalmente aceptado que el futuro de la identificación bacteriana recae en los métodos genéticos. El análisis de productos de PCR de genes específicos por enzimas de restricción es ampliamente usado para la identificación de micobacterias a nivel de especie. La secuenciación de genes conservados es un método sensible y exacto pero requiere de equipo costoso y consume tiempo. En años recientes las pruebas de DNA han sido muy utilizadas debido a su disponibilidad en kits comerciales, como el sistema AccuProbe Gen-Probe, (San Diego, Calif.) que es altamente específico y sensible con la desventaja de que solo identifica un número limitado de especies (*MTC*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* y *M. kansasii*).

Recientemente, la tecnología de tiras de DNA, basadas en la hibridación reversa de productos de PCR con sus sondas complementarias han sido aplicadas a la detección e identificación simultánea de micobacterias. Actualmente, dos pruebas de DNA INNO-LiPA MICOBACTERIA (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) y GenoType Mykobakterien (Hain Life-science GmbH, >Nehren, Germany) están disponibles comercialmente. [45]

La prueba de INNO-LiPA Micobacteria tiene como región blanco el espacio transcrito interno 16S-23S rDNA (ITS), el cual ha sido sugerido como representante de un blanco potencial dentro del

genoma bacteriano para encontrar sitios disponibles para sondas de las cuales derive información filogenética. Este locus genético es flanqueado por regiones muy bien conservadas del operon RNAr y es más pequeño. Trabajos previos sugieren la aplicabilidad de este particularmente con respecto a la micobacteria por el alto nivel de variación de secuencia espaciadora y la buena reproducibilidad de la secuenciación del ITS. [44, 54]

IV. Electroferograma de proteínas e isoenzimas basados en esquemas

Se han desarrollado electroferogramas para la rápida identificación y caracterización de cepas de *M. tuberculosis* y MNT los cuales pueden ser usados en laboratorios pequeños. [30,31] Basados en la medida de divergencia inmunológica en la estructura de ciertas moléculas enzimáticas como catalasa^[32] y superóxido dismutasa^[33]. Todas estas técnicas necesitan alguna infraestructura especializada y experiencia pero no son difíciles de ejecutar.

1.2.8 EPIDEMIOLOGIA

Actualmente se han identificado más de 100 especies diferentes de micobacterias no tuberculosas. Aunque muchas de ellas son saprófitas, algunas son potencialmente patógenas para el hombre, teniendo un impacto significativo en la mortalidad y morbilidad en humanos y un impacto económico importante en la agricultura.

De las especies conocidas de micobacterias, una tercera parte han sido asociadas con enfermedades en humanos. Las especies de MNT asociadas con enfermedad son:

M. avium, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. habana*, *M. interjectum*, *M. xenopi*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. immunogenum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. genavense*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi* y *M. goodii*, *M. thermoresistible*, *M. neoaurum*, *M. vaccae*, *M. palustre*, *M. elephantis*, *M. septicum* y *M. nonchromogenicum*.^[24]

En la década de los 1950's y 1960's numerosos reportes de bacilos ácido alcohol resistentes cultivados de materiales patológicos demostraron que estos organismos eran clínicamente importantes, por lo que el interés y la búsqueda de MNT en el ambiente fue renovada.

A mediados de 1980 y principios de 1990 debido al advenimiento de la infección con HIV, la tuberculosis resurge aún en países industrializados incrementándose por la aparición de cepas multidrogo resistentes.

En años recientes las micobacterias no tuberculosas han emergido como la principal causa de infecciones oportunistas en individuos con SIDA, por lo que su importancia en la salud pública se ha incrementado especialmente con la creciente población inmunodeficiente.

ENFERMEDADES POR MNT ANTES DE LA EPIDEMIA DEL SIDA

Antes del advenimiento del SIDA, las enfermedades causadas por MNT predominantes eran pulmonares, afectando principalmente a hombres de 60 años. Muchos pacientes presentaron condiciones pulmonares predisponentes secundarias a funciones laborales al exponerse al polvo en la agricultura o actividades domésticas o por inhalación de humo de carbón produciendo pneumoconiosis (pulmón negro).^[29, 25] Las principales micobacterias patógenas pulmonares fueron *M. kansasii*, *M. avium* y *M. intracellulare*, predominando una u otra dependiendo de la localidad. Las infecciones ocasionadas por *M. kansasii* fueron localizadas principalmente en la zona urbana, mientras que las enfermedades por *M. intracellulare* y *M. avium* se presentaron en áreas rurales. Las MNT también produjeron enfermedades extrapulmonares como linfadenitis cervical en niños siendo el agente causal *M. scrofulaceum* así como reportes de infecciones ocasionadas por *M. marinum* principalmente en piel, las cuales estaban asociadas con cortes o abrasiones de ésta y contacto con agua en albercas o por ocupación en la industria pesquera. En estos casos, la ruta de infección postulada fue el agua.^[36]

ENFERMEDADES POR MNT DESPUÉS DE LA EPIDEMIA DEL SIDA

En todo el mundo el panorama de las enfermedades por micobacterias no tuberculosas ha cambiado radicalmente por la emergente epidemia del SIDA. La incidencia de las enfermedades por estas micobacterias se ha incrementado rápidamente desde los primeros reportes de enfermedades por MNT en pacientes con SIDA en 1982^[36]. Actualmente entre el 25 y 50% de los pacientes con SIDA en los Estados Unidos y Europa son infectados con MNT. Las enfermedades por MNT en individuos inmunocompetentes son principalmente pulmonares, mientras que en los pacientes con SIDA e individuos inmunodeficientes, las enfermedades por MNT afectan otros órganos o son usualmente diseminadas.^[37]

MICOBACTERIOSIS

Las enfermedades causadas por MNT tienen diversas manifestaciones y han sido agrupadas de manera general como micobacteriosis.

Las micobacterias no tuberculosas son importantes agentes causales de infecciones nosocomiales y enfermedades ocupacionales, las infecciones nosocomiales están frecuentemente asociadas con los distribuidores de agua a hospitales y el equipo de lavado. Se demostró que *Mycobacterium genavense* proveniente de agua de la llave de un hospital fue causante de micobacteriosis no tuberculosa en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia.^[15]

En cuanto a la salud ocupacional, las MNT son consideradas agentes causales de pneumonitis hipersensible, asma y bronquitis como se observó en trabajadores de máquinas expuestos a fluidos metálicos y sus aerosoles, los cuales son usados en la industria metalera para enfriado y lubricación.^[16, 17, 18, 19, 20, 29]

Se ha observado un incremento en las infecciones por MNT en pacientes inmunocomprometidos aunque cada vez se diagnostican mayor número de infecciones micobacterianas en sujetos inmunocompetentes^[35].

Las MNT pueden producir enfermedad en individuos que ofrecen alguna oportunidad secundario a inmunidad alterada ya sea local o sistémica. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, pneumoconiosis, bronquioectasia, silicosis, fibrosis quística, escoliosis torácica, aspiración debida a enfermedad esofágica previa gastrectomía y alcoholismo crónico son algunas condiciones que se han ligado a enfermedades debidas a MNT. En algunos casos los factores predisponentes pueden ser muy obvios como bronquioectasia, procedimientos quirúrgicos, inyecciones, ruptura de la superficie de la piel debido a heridas y estados de inmunidad deficiente generalizados como en SIDA, uso de agentes inmunosupresores como en los pacientes con transplantes. Sin embargo las condiciones predisponentes son menos claras en otros individuos como en la adenitis infantil. ^[24]

Las MNT han sido reportadas causantes de enfermedades localizadas y diseminadas dependiendo de la predisposición local y/o grado de inmunidad deficiente. En pacientes inmunocompetentes diferentes MNT pueden causar enfermedad pulmonar localizada, adenitis, infecciones de tejido blando, infecciones de articulaciones/hueso, úlceras de piel; las enfermedades generalizadas se presentan con mayor frecuencia en individuos inmunodeficientes como pacientes transplantados o con leucemia. ^[24, 35]

- a) Infecciones pulmonares debidas a MNT. Se responsabiliza a algunas especies ser la causa principal de infecciones pulmonares por micobacterias como la cepa del complejo *M. avium-M. intracellulare* (MAC), *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. habana*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. malmonense*, *M. kansasii* relacionada a enfermedades pulmonares como bronquitis crónica, bronquioectasias y en enfermedad obstructiva crónica. *M. heckeshornense* es una nueva especie de micobacteria de lento crecimiento asociada con enfermedad cavitaria en individuos inmunocompetentes. ^[11, 24,]
- b) Glándulas linfáticas. Tanto los aislamientos de MAC como de *M. scrofulaceum* han sido reportados como causantes de linfadenitis, cuya distribución en la naturaleza es muy semejante. Otras especies identificadas como causante de linfadenitis cervical en países del oeste e India son *M. bohemicum*, *M. szulgai*, *M. interjectum* como especies nuevas semejantes a *M. scrofulaceum* que relacionadas a linfadenitis. ^[11, 24, 53]
- c) Hueso y articulaciones. Aislados de MAC, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. non-chromogenicum* y *M. kansasii* han sido reportados como causantes de infecciones en hueso y en articulaciones. ^[11, 24, 57]
- d) Infecciones cutáneas. *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. ulcerans* y *M. vaccae* han sido reportadas como causantes de infecciones en piel. *M. marinum* ha sido reconocida como organismo causante de lesión granulomatosa, adquirida en piscinas y tanques de peces. Estas son lesiones papulares en las extremidades que pueden ser confundidas con esporotricosis. *M. ulcerans* es responsable de la úlcera de buruli y *M. vaccae* también ha sido reportada como causa de infecciones en piel. ^[24]

- e) Infección de heridas y sepsis. *M. fortuitum* causa lesiones piogénicas en tejidos blandos, articulaciones y abscesos producidos por inyección. Mientras que *M. chelonae* - *M. abscessus* es causante de infecciones de heridas. Nuevas especies relacionadas como es *M. immunogenum* ha sido recientemente reconocida como causante de sepsis, lo mismo que *M. marinum* también responsable de infecciones en hueso/articulaciones/tendones especialmente en pacientes con SIDA. *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii*, *M. thermoresistible* y *M. palustre* además de ser causantes de infecciones de heridas, también producen bacteremias. Miembros del complejo *M. terrae* (*M. terrae*, *M. nonchromogenicum* y *M. triviale*) pueden estar asociados con enfermedad micobacterial. Ocasionalmente *M. nonchromogenicum* y *M. chelonae* han sido identificadas como causas de infecciones inducidas por acupuntura. *M. septicum* es una nueva especie de rápido crecimiento asociada con bacteremias relacionadas con catéter. [24, 57]
- f) Enfermedades intestinales crónicas: Enfermedad de Crohn. El agente causal es *M. paratuberculosis*, una especie altamente relacionada con *M. avium*. Miembros de esta especie han sido reportados como agente causal de enteritis (enfermedad de John) en el ganado vacuno, cabras y ovejas. [24, 38]
- g) Enfermedad diseminada en individuos inmunocomprometidos. Las MNT más importantes que causan enfermedad diseminada son: MAC, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. simiae*, complejo *M. fortuitum*-*M. chelonae*, *M. genavense*, *M. haemophilum*. [11, 24]
- h) Linfadenitis cervical en niños. Las micobacterias han sido ampliamente conocidas como agentes responsables de linfadenitis cervical en niños. La edad de los niños en la mayoría de los casos es de 6 meses a 2 años y coincide con el periodo de tiempo en que comienza la erupción de los dientes. La infección es limitada a los nódulos linfoides cervicales y mandibulares. La inflamación de los nódulos linfoides es usualmente la primera evidencia de la infección. La terapia antimicobacteriana es poco efectiva y la remoción quirúrgica de los nódulos linfoides infectados ha sido el mejor tratamiento. Es así como los niños sirven de centinelas para la presencia de micobacterias en agua. [38]
- i) Pneumonitis hipersensible. Ha habido reportes de pneumonitis hipersensible como consecuencia de exposición a aerosoles que contienen micobacterias. Estos reportes incluyen situaciones ocupacionales como trabajadores expuestas a aerosoles generados de metales fluidos por moledores de metal, personas expuestas a aerosoles generados en piscinas, spas, baños calientes de tina o humidificadores. Las micobacterias aisladas en estos casos fueron *M. avium*, *M. chelonae*, y *M. immunogenum*. [38]

VÍA DE INFECCIÓN

Existe una variedad de situaciones donde la distribución geográfica micobacterial y ambiental convergen con el hombre y permiten su exposición a estas. No se ha confirmado la transmisión de MNT de persona a persona por lo que se sugiere que el agua es el principal vehículo de transmisión

ya que se ha observado una mayor coincidencia con ella [25]. Los humanos son expuestos a las micobacterias en agua por contacto, ingestión e inhalación siendo un ejemplo la linfadenitis cervical en niños resultado de la ingestión de micobacterias en el agua para beber y posiblemente de objetos contaminados en el suelo que son llevados a la boca. La resistencia de las micobacterias a diferentes desinfectantes hace que estas se encuentren presentes en tinas de agua caliente, soluciones usadas en tratamientos médicos como violeta de genciana, emulsiones agua-aceite usadas para enfriar herramientas de los trabajadores en metal. El polvo, los alimentos y cigarrillos pueden también ser una fuente de infecciones micobacterianas. [2, 3, 38]

Las actividades humanas también influyen en la distribución y prevalencia de micobacterias. Una de ellas es el tratamiento del agua con cloro u otros desinfectantes (ozono) con el fin de potabilizarla lo que permite la selección de algunas micobacterias ambientales dependiendo de la resistencia innata que presenta cada una. Mientras que el complejo *M. avium* exhibe una mayor resistencia al cloro en comparación a otras especies, *M. aurum* una de las especies más débiles son 10 a la 100 veces más tolerantes que *E. coli*. [38]

La capacidad que presentan las micobacterias de crecer en aguas naturales que contienen bajas concentraciones de materia orgánica, además de la diferencia en su susceptibilidad al cloro puede modificar la prevalencia de una especie sobre otra. [38]

Antes del advenimiento del SIDA y en la ausencia de transmisión de MNT de persona a persona, se sugirió que la infección pulmonar tenía como vía de infección el aerosol [25]. La única excepción fue la linfadenitis causada por *M. scrofulaceum* en niños y los granulomas cutáneos causados por *M. marinum*. Sin embargo, en pacientes con SIDA, la infección podía ocurrir vía pulmonar, tracto gastrointestinal o ambas. De ahí, que un amplio rango de fuentes y modos de transmisión han sido investigados en la era del SIDA.

Los aislamientos de MNT han sido no solo en aguas de fuentes naturales sino también en sistemas de distribución de agua a hogares (agua de la llave fría o caliente, máquinas de hielo, nebulizadores, regaderas). [39]. Las MNT pueden sobrevivir, colonizar, persistir, crecer y multiplicarse en los sistemas de distribución de agua potable. [10-13]

Existen cada vez más evidencias que sugieren que el agua es el vehículo por el cual la micobacteria coloniza e infecta al humano. Los organismos pertenecientes al complejo *M. avium* han sido repetidamente aislados de los sistemas de distribución de agua para beber en los Estados Unidos y algunos países del mundo, coincidiendo que el genotipo aislado de pacientes en brotes intrahospitalarios es el mismo que se aisló en agua de los grifos y regaderas de los cuartos de los pacientes. [34]

Como se mencionó anteriormente, las micobacterias no siempre son eliminadas por desinfectantes comunes y pueden tolerar un amplio intervalo de pH y temperatura, lo que las hace persistir en sistemas de distribución de agua por largos periodos de tiempo. Joret y col. sugirieron que las micobacterias pueden recuperar sus habilidades para crecer después de la depleción del desinfectante residual. Debido a la resistencia de las micobacterias al cloro, se explica por qué estas son frecuentemente recuperadas de los sistemas de distribución de agua. [39]

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por MNT se han incrementado tanto en personas inmunocomprometidas como en inmunocompetentes, a pesar de ello la distribución e incidencia geográfica de MNT en el mundo se desconoce. Se ha propuesto que la transmisión de MNT ocurre a través de fuentes ambientales siendo el agua el principal vehículo. Aunque se han descrito diferentes métodos de recuperación de micobacterias de muestras ambientales no se ha logrado desarrollar un método universalmente aplicable.

3. OBJETIVOS

- ♣ Aislar e identificar MNT en agua de riego proveniente de los Canales de Xochimilco de la Ciudad de México.
- ♣ Determinar el mejor método para el aislamiento de micobacterias no tuberculosas.

4. METODOLOGÍA

4.1 Recolección de las muestras de agua.

Se seleccionaron veinte sitios representativos de la zona ecológica de Xochimilco. Se recolectó un litro de agua de cada sitio de muestreo en botellas estériles de polipropileno con tapa de rosca. La muestra fue tomada a la mitad de la extensión del canal y a tres cuartas partes de profundidad.

Tabla 1. Sitios seleccionados en el área ecológica de Xochimilco para la recuperación de MNT

Sitio	Características y Uso de la Zona
Trancatitla	Zona agrícola y de pastoreo
Aplatlaco	Actividades agrícolas con productos de flores y plantas de ornato. Zona habitacional del extremo opuesto
Tezhuilo	Zona agrícola y en los últimos dos meses del año se realizan actividades culturales. Zona de menos perturbación aparentemente.
San Diego	Zonas más perturbadas. Asentamientos humanos y descargas de aguas residuales así como una zona de recarga de agua
Seminario	Zona de asentamientos humanos, actividades agrícolas y ganaderas principalmente bovinos
Pizocoxpa	Zona agrícola con asentamientos humanos irregulares
Santísima	Zona de las más perturbadas. Asentamientos regulares e irregulares, crianza de cerdos
Paso del águila	Zona agrícola y de pastoreo, poco perturbada
Zacapa	Zona agrícola y con asentamientos humanos regulares
Bordo	Actividades agrícolas y de pastoreo, zonas menos perturbadas.
El Toro	Zona turística con asentamientos humanos
Fernando Celada	Zona de embarcaderos, aledaño a zona urbana
Cuemanco	Sitio anexo a la pista de remo y canotaje donde se realizan actividades deportivas, turísticas y agrícolas.
Draga	Zona de recarga de agua para los Canales de Xochimilco
Cotetexpan	Zona de asentamientos humanos irregulares y existen algunos invernaderos de plantas y flores.
Japón	Zona agrícola, por la inaccesibilidad es de las zonas que aparentan estar menos perturbadas.
Huetzali	Zona agrícola aparentemente sin mucha perturbación, aledaño al parque ecológico de Xochimilco.
Urrutia A	Zona agrícola y de los lugares más alejados de los Canales
Urrutia B	Zona agrícola y de los lugares más alejados de los Canales
Xaltocan	Zona de descarga de aguas de plantas de tratamiento aledaño a la zona urbana y de asentamientos humanos bien establecidos.

Pretratamiento de la muestra

El litro de agua fue transferido a botellas del mismo material de 250ml. Se centrifugaron a una velocidad de 10 000 rpm/4°C por 20 min. Se descartó el sobrenadante y se concentró a un volumen final de 5 ml con solución salina estéril

4.2 Recuperación de MNT.

La recuperación de micobacterias a partir de muestras de agua se realizó utilizando dos técnicas para eliminación de otras floras. Una con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y dodecil sulfato de sodio (SDS); y la otra con cloruro de cetilpiridinio (CPC). Ambas soluciones se emplearon en diferentes concentraciones, para el CPC las concentraciones fueron 0.5 y 0.05% mientras que para el NaOH las concentraciones fueron 1 y 2%.

a) NaOH

A un volumen de 500 µl de agua se le adicionó 750 µl de la solución de NaOH 1 o 2% y SDS al 3%, se agitó por 30 min a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 7 con ácido fosfórico al 40%. Las muestras se centrifugaron a 3000xg por 30 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se eliminó con un volumen de solución salina estéril 2 veces. El sedimento se resuspendió en 500µl de solución salina estéril y se inoculó 60 µl en medio Lowenstein-Jensen (LJ). Los cultivos fueron incubados a 37°C por 2 meses realizando observación diaria del crecimiento.

El límite de detección del método de descontaminación fue determinado por el uso de *M. goodnae* a concentraciones de 10¹ a 10⁴ UFC/L. Se contó el número de células en placas de Middlebrook 7H11. El proceso reduce el número de micobacterias a un 1% del número original.^[39]

b) CPC

A un volumen de 500 µl de la muestra se le adicionó CPC a una concentración final de 0.05 o 0.5% y se incubó en agitación por 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 5000xg por 20 min a 25°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó dos veces con solución salina estéril. La muestra se resuspendió en 500 µl de solución salina estéril y se inoculó 60 µl en LJ, incubándose a 37°C durante 60 días.

Las colonias obtenidas por cultivo en LJ fueron teñidas con la técnica Ziehl-Neelsen (ZN) para confirmar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). La morfología colonial y microscópica de la colonia fueron registrados.

4.3 Aislamiento

Una vez confirmada la presencia de BAAR, se sembró la colonia en placas de medio Middlebrook 7H10 enriquecido (M7H10) para obtener colonias aisladas. Los cultivos puros fueron sembrados en medio líquido Middlebrook 7H9 (M7H9) adicionado con ADC para las pruebas de identificación bioquímicas y moleculares. El cultivo se almacenó a -70°C para su conservación.

4.4 Identificación Molecular

Los aislamientos fueron identificados por pruebas bioquímicas convencionales y por métodos moleculares con el kit INNO-LiPA MYCOBACTERIA (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) de uso in vitro (método molecular basado en hibridación reversa).

INNO-LiPA MYCOBACTERIA

El kit genera material amplificado biotinilado de la región espaciadora del ARNr 16S-23S utilizando secuencias de oligonucleótidos cebadores (primers) biotinilados. El material amplificado se utiliza para la detección e identificación del género *Mycobacterium* de 16 especies: complejo de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. goodii*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum* y *M. ulcerans*, *M. celatum*, *MAIS* (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*), *M. malmoense*, *M. haemophilum*, complejo de *M. chelonae*, complejo de *M. fortuitum* y *M. smegmatis*.

Principio de ensayo

El primer evento es el aislamiento del ADN bacteriano a partir de muestras de cultivos plenamente desarrollados (cultivos en medios líquidos o sólidos). La amplificación se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La muestra de ADN se introduce en una mezcla de reactivos que contiene componentes esenciales para la amplificación, incluyendo desoxirribonucleósidos 5 trifosfatos (dNTPs), cebadores biotinilados, y ADN polimerasa termoestable. Los cebadores utilizados en este ensayo amplifican la región espaciadora de ARN ribosómico (*ARNr*) 16S – 23S de las especies de *Mycobacterium*. Las dos cadenas de la hélice de ADN se separan (desnaturalización) por calentamiento, exponiendo las secuencias diana a los cebadores biotinilados. Estas secuencias de cebadores oligonucleótidos son complementarias de las regiones que flanquean a la secuencia sonda-diana.

Tras un ciclo de desnaturalización, alineamiento y extensión, se produce una copia exacta biotinilada, de la secuencia molde. El proceso se repite durante 40 ciclos, obteniendo la secuencia DNA biotinilada amplificada múltiples veces.

El material de ADN biotinilado amplificado se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos, inmovilizadas sobre tiras de membrana de nylon. Tras la hibridación, se adiciona estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, que se une a cualquier híbrido biotinilado que se haya formado con anterioridad. La incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y el cromógeno nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) genera un precipitado de color púrpura/marrón. Cada tira de tipificación lleva fija 22 sondas de ADN paralelas una para cada especie, y 2 sondas control, la primera asegura que la adición de la solución de conjugado – la cual permite la detección- se realizó correctamente y la segunda línea detecta la presencia de *Mycobacterium* en la muestra e indica si se añadió o no una cantidad adecuada de material amplificado para la hibridación

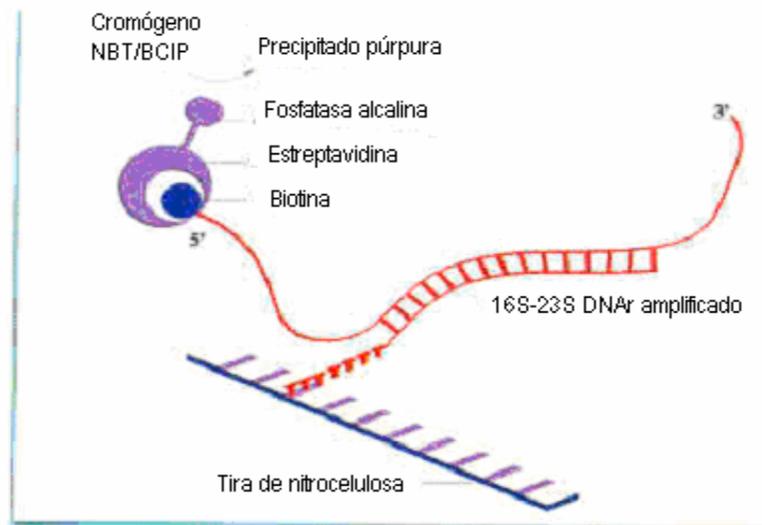


Figura 3. Esquema del principio de hibridación reversa de INNO-LiPA para la identificación de MNT

Procedimiento

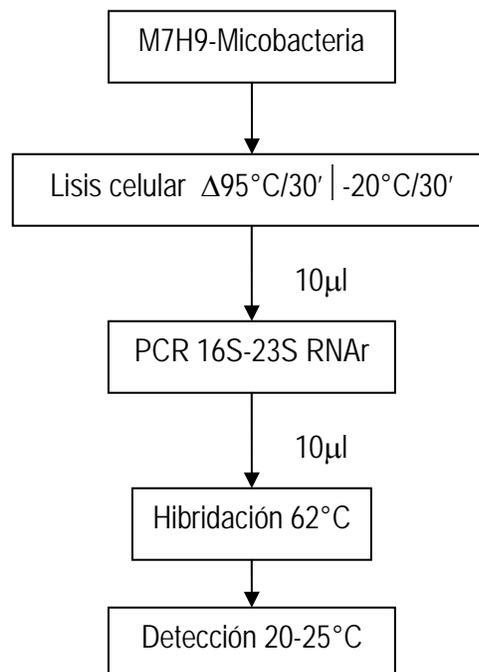


Figura 4. Esquema general del proceso de identificación por INNO-LiPA

1. Extracción de DNA
 - 1.1 Se tomaron 0.2 ml de medio líquido en un tubo para microcentrifugación con tapón de rosca y se concentraron por centrifugación (15 minutos, 17 900xg)
 - 1.2 El sobrenadante se desechó y se llevó a cabo una centrifugación adicional para eliminar cualquier líquido que todavía permanezca adherido a las paredes del tubo
 - 1.3 Las partículas celulares fueron resuspendidas en 20 μ l de amortiguador TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) e inactivadas por calor a 95°C durante 30 minutos.
 - 1.4 Posterior a la centrifugación a 17 900xg durante 10 segundos, el paquete celular fue congelado a -20°C durante 30 minutos
 - 1.5 Se agitó en vórtex y se centrifugó a 17 900xg durante 10 segundos
 - 1.6 Se usó 10 μ l del sobrenadante en un volumen de reacción total de 50 μ l
2. Amplificación de la región espaciadora del ARNr 16S-23S de las especies de *Mycobacterium*
 - 2.1 La preparación de la mezcla maestra se realizó de la siguiente manera:
(N x 19.7 μ l) de agua para PCR
(N x 10 μ l) de tampón de amplificación
(N x 10 μ l) de solución de cebadores MYC
(N x 0.3 μ l) de Taq polimerasa (5 U/ μ l)
El *tampón de amplificación* contiene todos los dNTP y NaN₃ al 0.05% como conservador y la *Solución de cebadores MYC* contiene los cebadores biotinilados, MgCl₂ y NaN₃ como conservador
 - 2.2 La mezcla se agitó brevemente en vórtex y se pipetearon 40 μ l en cada uno de los tubos de amplificación
 - 2.3 Al final se añadieron 10 μ l del preparado de DNA a la mezcla anterior y se insertaron en el termociclador PE 9700 precalentado y calibrado
 - 2.4 La presencia del producto amplificado se comprobó en gel de agarosa al 2%, cargando 10 μ l de producto amplificado. El amplicón apareció como una única banda de 400 a 550 pb.
 - 2.5 Concluido el proceso de amplificación, las muestras no utilizadas de inmediato se almacenaron a -20°C
3. Hibridación y lavado astringente con sondas específicas inmovilizadas en una tira
Muestras: producto amplificado de la región espaciadora del ARNr 16S-23S micobacteriano
Hibridación
 - 3.1 Se calentó un baño con agitación a 62°C +/- 0.5°C.
 - 3.2 Las tiras fueron marcadas con lápiz por encima de la línea marcadora azul que hay en cada tira
 - 3.3 Se pipetearon 10 μ l de solución de desnaturalización (solución alcalina que contiene EDTA) en la esquina superior de cada cubeta y se añadieron 10 μ l de producto amplificado biotinilado a la solución anterior, mezclando cuidadosamente pipeteando arriba y abajo.
 - 3.4 El proceso de desnaturalización siguió su curso durante 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C)
Se añadieron 2 ml de la solución de hibridación precalentada al producto amplificado desnaturalizado contenido en cada cubeta, asegurándose de no contaminar las cubetas adyacentes durante el pipeteado.

3.5 Se insertó cada tira en su cubeta correspondiente, con el lado marcado de la membrana boca arriba y se incubaron en el baño a $62^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con agitación durante 30 ± 3 minutos.

Lavado astringente.

3.6 Manteniendo la bandeja ligeramente inclinada, se aspiró el líquido de la cubeta con una pipeta, posteriormente se adicionaron 2 ml de solución de lavado astringente precalentada a cada cubeta. El aclaramiento se obtuvo sacudiendo la bandeja durante 60 ± 30 seg a temperatura ambiente, y se aspiró la solución de cada cubeta

3.7 El lavado se hizo por duplicado

3.8 Por último se incubó cada tira en 2 ml de solución de lavado astringente precalentada en el baño con agitación a $62^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 10 ± 2 minutos.

4. Desarrollo de la coloración

Todas las incubaciones subsiguientes se llevaron a cabo a $20-25^{\circ}\text{C}$ en un agitador.

4.1 Utilizando 2 ml de solución de aclarado de trabajo. Cada tira fue lavada dos veces durante 60-90 segundos.

Solución de aclarado. Tampón fosfato que contiene NaCl, Triton y MIT al 0.05%/CAA al 0.48% como conservante, a diluir al 1/5 en agua destilada o desionizada antes de su uso. Siempre que se mantenga a una temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$, la solución de aclarado de trabajo permanece estable durante 2 semanas.

4.2 Se añadieron 2 ml de solución de conjugado de trabajo a cada cubeta y se incubó durante 30 ± 3 minutos en agitación, posteriormente se eliminó por aspiración.

La *solución de conjugado* contiene estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina diluida en amortiguador Tris

4.3 Se realizó el lavado de las tiras por duplicado durante 60-90 segundos utilizando 2 ml de solución de aclarado de trabajo y se hizo un lavado final utilizando 2 ml de tampón sustrato.

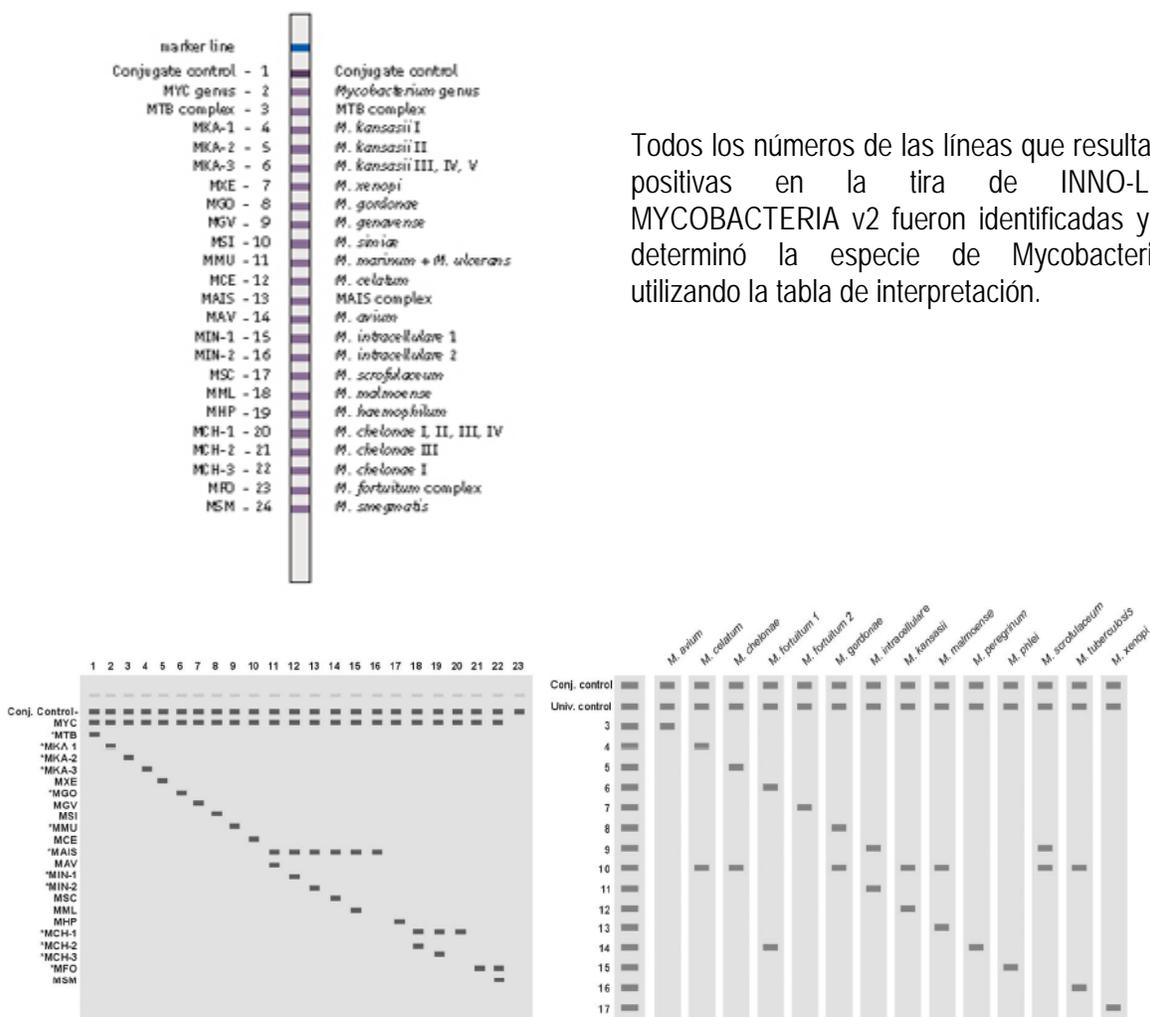
4.4 Se añadieron 2 ml de solución de sustrato de trabajo a cada cubeta y se incubó durante 30 ± 3 minutos en agitación.

4.5 El desarrollo de la coloración fue interrumpida lavando las tiras dos veces en 2 ml de agua destilada mientras la agitación continuó durante 3 minutos.

4.6 Con la ayuda de unas pinzas, se retiraron las tiras de las cubetas y fueron colocadas sobre papel absorbente. Una vez que las tiras estuvieron completamente secas se hizo la lectura de los resultados. Las tiras reveladas y secas fueron guardadas en la oscuridad.

5. Interpretación del patrón

Una línea se considera positiva cuando al final del procedimiento del ensayo aparece una banda de color púrpura claro o marrón. La presencia de una línea claramente visible se considera una reacción positiva.



Todos los números de las líneas que resultaron positivas en la tira de INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 fueron identificadas y se determinó la especie de Mycobacterium utilizando la tabla de interpretación.

Figura 5. Interpretación de las bandas de color púrpura en las tiras del kit INNO-LiPA

Control de calidad

La línea azul ubicada por encima de todas las demás es la línea marcadora que sirve para controlar la colocación de la tarjeta plástica de lectura. La primera línea positiva es la línea de control del conjugado. Esta línea controla la adición de conjugado reactivo y solución de sustrato de trabajo durante el procedimiento de detección. Debería ser siempre positiva y tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira en una misma ejecución del ensayo.

La segunda línea es la línea de la sonda específica del género Mycobacterium que detecta la presencia de Mycobacterium en la muestra probada e indica si se añadió o no una cantidad adecuada de material amplificado para la hibridación, ya que la intensidad de las líneas positivas restantes debe compararse con la intensidad de esta línea.

La sensibilidad diagnóstica fue del 98.8%. La precisión tras los ensayos iniciales fue del 91.6% y, después de los ensayos de discrepancia, del 97.6%. Su especificidad es del 100%, (ninguno de los materiales amplificados no micobacterianos reaccionó con la sonda específica del género *Mycobacterium*)

4.5 Identificación bioquímica

Los métodos tradicionales están bien establecidos, estandarizados, reproducibles y relativamente baratos, pero limitados en número para las especies en las que un gran número de cepas han sido estudiadas. Diferentes especies pueden presentar características morfológicas y perfiles bioquímicos convergentes. La variación ocurre entre cepas y sus propiedades pueden no resultar como aquellas marcadas por la cepa tipo. ^[58]

Velocidad de crecimiento

La prueba de velocidad de crecimiento es el tiempo que se requiere para formar colonias maduras, visiblemente aisladas sin magnificación sobre medio sólido. Las micobacterias que forman colonias en los primeros 7 días se denominan de rápido crecimiento, mientras que aquellas que requieren un periodo más prolongado se denominan de lento crecimiento. El medio es inoculado con 0.1ml de una dilución 10^{-4} de una suspensión de cultivo estándar preparada a una densidad óptica a 580nm de 0.25 (1mg/ml peso húmedo). Los cultivos son incubados a 35-37°C y observados diariamente hasta el quinto o séptimo día y luego semanalmente hasta la formación de colonias visibles. ^[58]

Temperatura de crecimiento

El crecimiento en relación con la temperatura puede usualmente ser adecuadamente determinada por la observación de cultivos a 37 y 30°C. Cuando una identificación más definitiva es necesaria, los aislados deben cultivarse a 28, 30, 35-37, y 42 o 45°C. ^[58]

Pigmentación

La prueba de producción de pigmento debe realizarse con colonias de cultivos jóvenes. Tres tubos de medio son inoculados con una suspensión de cultivo estándar diluida. Dos de los tubos son protegidos de la luz y uno no es cubierto. Cuando se detecta crecimiento en el tubo no cubierto, uno de los tubos envueltos debe ser examinado. Si las colonias no están pigmentadas, el otro tubo cubierto es expuesto a la luz (bulbo de tungsteno de 100w) a 20cm del cultivo por 1 a 5 horas. La máxima oxigenación del cultivo es necesaria para la inducción del pigmento, la cual es controlada por una enzima de foto-inducción oxígeno dependiente. El tubo es protegido de nuevo y reincubado. Después de 24 horas se compara este tubo con el protegido sin exposición a la luz. ^[58]

Morfología colonial

La morfología colonial de las micobacterias puede ser evaluada por la observación microscópica de cultivos jóvenes (5 a 14 días), colonias aisladas sobre placas invertidas bajo el objetivo 10x de un microscopio estereoscópico con luz transmitida. El mejor medio para hacerlo es un medio sólido claro como el agar Middlebrook 7H10 o 7H11. El gran número de especies de MNT han hecho difícil

una identificación tentativa por este método, así que la información provista por esta técnica es frecuentemente usada como complementaria para otras pruebas más específicas. [58]

Crecimiento en piruvato

La adición de piruvato sódico al medio de LJ a una concentración final de 0.5% (Medio Lowenstein-Jensen suplementado con piruvato sódico o medio Stonebrink) ha demostrado ser efectiva para la recuperación de cepas disgónicas o multirresistentes de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. malmoense* y sobre todo de *M. bovis*. En presencia de piruvato las cepas de *M. bovis* adquieren la capacidad de utilizar el glicerol y la glucosa para presentar un crecimiento eugónico. Sin embargo, el piruvato sódico puede perjudicar la recuperación de *M. kansasii*. *M. avium* puede aislarse en LJ, pero el crecimiento puede potenciarse añadiendo al medio piruvato o glicerol y ajustando el pH a 6; el glicerol, aunque estimula el crecimiento de casi todas las especies de micobacterias puede perjudicar el crecimiento de *M. bovis* e incluso inhibirlo. [49, 58]

Arilsulfatasa

La arilsulfatasa hidroliza el enlace entre el grupo sulfato y el anillo aromático del disulfato tripotásico de fenoltaleína para formar fenoltaleína libre, la cual es fácilmente detectada por un color rojo cuando un alcali es adicionado. La actividad arilsulfatasa puede ser detectada en todas las micobacterias después de un tiempo prolongado, 3 días posterior a la incubación la prueba ayuda a la identificación de las principales especies de rápido crecimiento clínicamente importantes (*M. fortuitum*-*M. chelonae*-) y algunas de lento crecimiento como *M. xenopi*, *M. triviale* y *M. celatum*. Los tubos con 2ml de agar Dubos base oleica, que contiene 0.08 de disulfato de fenoltaleína (sal tripotásica) y 0.01% de glicerol, son inoculados con una asada del cultivo e incubados. Después de 3 días la prueba es revelada por la adición de 0.3 ml de Na₂CO₃ 1M. [58]

El desarrollo de un color rosa indica una prueba positiva

Control positivo: *M. fortuitum*

Control negativo: *M. avium* o *M. intracellulare*

Catalasa

La catalasa es una enzima soluble, intracelular capaz de degradar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Dos pruebas son usadas para detectar la actividad catalasa, una semicuantitativa que refleja diferencias en la cinética enzimática y otra que prueba su tolerancia al calor. La enzima es detectada por la adición de H₂O₂ al cultivo, observándose la formación de burbujas. [58]

La prueba *semicuantitativa* divide a las micobacterias en dos grupos, aquellas que producen baja catalasa y aquellas que producen alta catalasa, basado sobre la longitud de la columna de burbujas producida (menos o más de 45mm)

Método: un tubo con LJ coagulado verticalmente es inoculado con 0.2 ml de una suspensión bacteriana, se incuban 2 semanas a 35°C con la tapa a media rosca. Después del tiempo de incubación, se adiciona 1ml de una solución recién preparada de Tween 80 al 10% y peróxido de hidrógeno al 30% (1:1). Esperar 5 min y medir la columna de burbujas formada.

Control <45mm: *M. tuberculosis* H37Ra

Control >45mm: *M. kansasii*

Para la prueba de catalasa *thermo-resistente*, una asada es resuspendida en un tubo con 0.5ml de buffer de fosfatos 0.067M (pH 7) e incubado a 68°C por 20 min. Después de este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se adiciona 0.5ml de la mezcla Tween-H₂O₂. La formación de burbujas es registrada 20 min después.

Control positivo: *M. kansasii*

Control negativo: *M. tuberculosis* H37Ra

Toma de hierro

La prueba de toma de hierro es usada para detectar micobacterias de rápido crecimiento capaces de convertir el citrato férrico de amonio en óxido de hierro el cual es visible como un color café rojizo en las colonias. La ingesta de hierro es útil en la diferenciación de *M. chelonae* y *M. abscessus*, comúnmente negativas, de muchas otras micobacterias de rápido crecimiento que son positivas. Los aislados de *M. mucogenicum* producen color canela menos perceptible. Las micobacterias de lento crecimiento no son capaces de acumular el óxido de hierro.

Un tubo con LJ es inoculado con 0.2ml de suspensión bacteriana e incubado a 37°C hasta que el crecimiento es visible. Se Agrega una gota de una solución acuosa de citrato férrico de amonio al 20% por cada mililitro de medio L-J. Después de una incubación de 21 días a 37°C, se lee la prueba. Un color café rojizo en las colonias y una decoloración canela en el medio indican una prueba positiva. [58]

Control positivo: *M. fortuitum*

Control negativo: *M. chelonae* o *M. abscessus*

Acumulación de niacina.

La niacina (ácido nicotínico) funciona como un precursor en la biosíntesis de coenzimas NAD y NADP. Aunque todas las micobacterias producen ácido nicotínico, algunas tienen un bloqueo en la vía de transporte y excreción de niacina. La niacina acumulada en el medio de cultivo es detectada por su reacción con un halido cianógeno en la presencia de una amina primaria. A un cultivo LJ con buen desarrollo se le adiciona 1 ml de agua destilada estéril. Se coloca el tubo horizontalmente permitiendo que el agua cubra toda la superficie. La incubación se realiza a 37°C durante 30 min para llevar a cabo la extracción. Se transfiere 0.5ml del líquido a un tubo y se añade 0.5 ml de bencidina al 4% (en alcohol, mezcla incolora) y 0.5 ml de bromuro de cianógeno al 10%. Al finalizar la reacción, añadir NaOH para evitar la formación de HCN. Un color rosa indica una reacción positiva. [58]

Control positiva: *M. tuberculosis* H37Ra

Control negativo: *M. avium*

Reducción de nitratos.

Las micobacterias difieren cuantitativamente de su habilidad para reducir los nitratos a nitritos. Método: En un tubo se colocan unas gotas de agua estéril y se resuspende dos asadas emulsificadas de un cultivo en LJ de 3 a 4 semanas, luego se agregan 2 ml de buffer de nitratos (NaNO₃ 0.1M en buffer de fosfatos 0.22M pH 7). La mezcla se agita ligeramente e incuba a 37°C por 2 horas. Se agrega una gota de ácido clorhídrico al 50% (50 ml de HCl en 50 ml de agua), 2 gotas de una solución acuosa al 0.2% de sulfanilamida y 1 gota de solución acuosa al 0.1% de

dicloruro de N-(1-naftil) etilendiamina. El desarrollo de una coloración de rosa a rojo que contraste con el control se considera una prueba positiva. [58]

Control positiva: *M. tuberculosis* H37Ra

Control negativo: *M. avium*

Pirazinamidasa

La enzima pirazinamidasa hidroliza la pirazinamida (PZA) en amonio y ácido pirazinoico, es detectado por la adición de sulfato férrico amoniacal. Esta prueba es frecuentemente usada para separar *M. marinum* de *M. kasasii* y *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

El medio de prueba consiste en un caldo base Dubos conteniendo 0.1g de PZA, 2.0 g de ácido pirúvico y 15.0 g de agar por litro. El medio es dispensado en tubos (5ml), esterilizado por autoclave y solidificado en posición vertical. El agar es inoculado con una gran carga del cultivo y se incuba por 4 días a 37°C. Después de este tiempo se adiciona 1 ml de sulfato ferroso amoniacal al 1%. Si en la preparación se observa una banda rosa por arriba del agar, la prueba es positiva. [58]

Control positivo: *M. avium* o *M. intracellulare*

Control negativo: medio sin inocular

Tolerancia al cloruro de sodio

Pocas micobacterias son capaces de crecer o tolerar la presencia de cloruro de sodio al 5%. *M. triviale* es la única micobacteria de lento crecimiento capaz de hacerlo. Las micobacterias patógenas de rápido crecimiento, excepto *M. mucogenicum* y muchos aislados de *M. chelonae*, también crecen en NaCl al 5%.

El medio LJ conteniendo 5% de NaCl y LJ sin sal son inoculados con 0.2 ml de la suspensión bacteriana e incubados a 30 o 35°C. El crecimiento es registrado a las 4 semanas. [58]

Control positivo: *M. fortuitum*

Control negativo: *M. tuberculosis* H37Ra

Reducción de telurito.

La telurito reductasa reduce el telurito de potasio incoloro a un precipitado metálico negro de telurio. La prueba es usada para separar *M. avium* y *M. intracellulare* de muchas otras micobacterias no cromógenas. Algunas micobacterias de rápido crecimiento pueden presentar una prueba telurito positiva como *M. fortuitum* y *M. chelonae* que tampoco son cromógenas.

Dos gotas de una solución acuosa al 0.2% de telurito de potasio son añadidas a 5 ml de cultivo de 7 días en Middlebrook 7H9. Se incuba a 37°C y se examina diariamente por 4 días o más. Se considera una prueba positiva cuando se observa un precipitado negro [58]

Control positivo: *M. avium*

Control negativo: *M. kansasii*

Hidrólisis de tween 80

Las lipasas producidas por algunas micobacterias hidrolizan el detergente mono oleato sorbitan polioxietileno (Tween 80) en ácido oleico y polioxietileno sorbitol. El rojo neutro en el pH 7 del medio de prueba es unido por Tween 80 y tiene un color ámbar a pH neutro. Si el Tween 80 es hidrolizado, el rojo neutro no es largamente unido y revierte a su usual color rojo a pH 7. La prueba permite la diferenciación entre las especies de MNT de lento crecimiento.

La solución sustrato consiste en 0.5 ml de Tween 80 en 100 ml de buffer de fosfatos 0.067M (pH 7.0) al cual se le añaden 2 ml de una solución acuosa al 1% de rojo neutro. La solución es distribuida en cantidades de 4 ml en tubos con tapón de rosca y se esterilizan por autoclave. Una asada de la micobacteria es inoculada en el tubo. Se incuba a 37°C y se revisa a las 24h, 5 y 10 días. Un cambio en el color de ámbar a rosa o rojo señalan una reacción positiva. [58]

Control positivo: *M. kansasii*

Control negativo: *M. avium*

Ureasa

La habilidad de un aislamiento para hidrolizar urea en amonio y CO₂ es usada para identificar tanto micobacterias escotocromógenas como no cromógenas. *M. scrofulaceum* es ureasa positiva, mientras que *M. avium* y *M. intracellulare* son organismos ureasa negativos. La prueba de la ureasa es particularmente útil en el reconocimiento de cepas pigmentadas de *M. avium*.

El medio de prueba es preparado por una mezcla de 1 parte de medio agar base urea concentrado con 9 partes de agua destilada. El medio se distribuye en 4 ml en tubos y se esterilizan. Posteriormente son inoculados con una asada emulsificada del cultivo y se incuba por 3 días a 37°C. Se considera una prueba positiva si se observa un color rojo o rosa. Si después de 10 días no hay cambio de color se considera la prueba como negativa. [58]

Control positivo: *M. scrofulaceum*

Control negativo: *M. gordonae*

Crecimiento en agar McConkey

La prueba sobre crecimiento en agar McConkey es útil en la identificación de ciertas especies de micobacterias de rápido crecimiento. El medio debe prepararse sin la adición de cristal violeta, ya que el crecimiento de algunas especies puede ser inhibido por la presencia de este colorante. La prueba consiste en sembrar una estría continua a partir de un cultivo sólido. La prueba es positiva para el complejo *M. fortuitum-chelonae*. Algunas otras micobacterias pueden presentar un ligero desarrollo sobre el medio, sin embargo, se considera una prueba positiva cuando el crecimiento se observa hasta el final de la estría sembrada. [42]

Control positivo: *M. fortuitum*

Control negativo: *M. avium*

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de MNT en agua superficial de los Canales de Xochimilco

En 19 de los 20 sitios estudiados se aislaron micobacterias no tuberculosas. Se obtuvo un total de 91 aislamientos, de los cuales solo 19 presentaban una morfología colonial diferente. (Tabla 2)

Tabla 2. Número de aislamientos obtenidos e identificados

No. de muestras	20
Aislamientos totales	91
Morfologías coloniales diferentes	19
Aislamientos identificados por BQs	20
Aislamientos identificados por INNO-LiPA	10

Descripción de los aislamientos

La evaluación de las características macroscópicas de las colonias se llevó a cabo mediante el examen visual del desarrollo en la superficie de las placas de agar Middlebrook 7H10. Las colonias fueron caracterizadas de acuerdo a su tamaño, forma, elevación, margen (borde), color, superficie, densidad y consistencia. Algunos cultivos presentaron morfología colonial parecida entre sí, aunque no igual, sin embargo compartían la característica particular de intensificar su pigmento con el paso del tiempo por lo que pudiera tratarse de variantes coloniales de la misma especie.^[14] (Tabla 3)

Los aislamientos fueron clasificados en base al criterio de Runyon en los siguientes grupos: Grupo I: fotocromógenas, Grupo II: escotocromógenas, Grupo III: no fotocromógenas (estos tres primeros grupos son de lento crecimiento) y el Grupo IV: de crecimiento rápido.

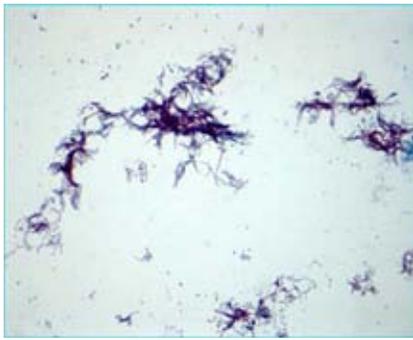
Tabla 3. Características macroscópicas de las colonias de MNT recuperadas en agua superficial de los Canales de Xochimilco

DESCRIPCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS		
MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCOPICA (Tinción de Ziehl-Neelsen)	CLASIFICACIÓN DE RUNYON
♣ Colonias de 2 mm de diámetro, circulares, convexa, margen entero, color naranja, mate, opacas, cremosas	Bacilos largos, delgados, agregados en cúmulos	Rápido crecimiento
Variante 1: Colonias de 1-2mm de diámetro, circulares, umbeliforme, margen ondulado, color naranja, mate, translúcidas, quebradiza	Bacilos cortos en forma de coma y cocoide agregados en cúmulos	Rápido crecimiento
Variante 2: Colonias de 2 mm de diámetro, circular, planas, margen ondulado, color naranja, mate, translúcida, quebradiza.	Bacilos cortos, delgados, afilados como agujas en cúmulos.	Rápido crecimiento
♦ Colonias de 1 mm de diámetro, circulares, convexas, margen entero, color blanco, brillantes, opaca, cremosas	Bacilos largos delgados, en cúmulos.	Rápido crecimiento
Colonias de 4 mm de diámetro, circulares, elevadas, margen ondulado, color crema, mate, opaca, rugosas	Bacilos pleomórficos, sin agregación	Rápido crecimiento
Colonias de 2 mm de diámetro, circulares, elevadas, margen entero, color naranja, brillantes, opaca, cremosas	Bacilos cortos, anchos, que se agrupan en hileras	Rápido crecimiento
Colonias de 2 mm de diámetro, circulares, planas, margen ondulado color blanco, mate, translúcida, quebradiza	Bacilos cortos, en acúmulos	Rápido crecimiento
♥ Colonias de 3 a 5 mm de diámetro, irregulares, elevadas, margen ondulado, color blanco, mate, opacas, quebradiza	Bacilos pleomórficos, sin agregación	Rápido crecimiento
Colonias de 3 a 5 mm de diámetro, circulares, convexas, margen entero, color amarillo naranja, brillantes, opacas, cremosas	Bacilos cortos en acúmulos, tinción homogénea	Rápido crecimiento
Colonia de 2 a 3 mm de diámetro, circular umbilicada, margen entero, color blanco, mate, opaca, cremosa	Bacilos cortos, anchos, en forma de coma, sin agregación	Rápido crecimiento
Colonias de 3 mm de diámetro, circulares, elevadas, margen entero, color blanco, mate, translúcida, quebradiza	Bacilos en forma cocoide, en acúmulos	Rápido crecimiento
Colonias < 1mm de diámetro, circulares, elevadas, margen entero, color amarillo pálido, brillantes, opacas, cremosas	Bacilos muy cortos, anchos, forma cocoide, en cúmulos	Rápido crecimiento

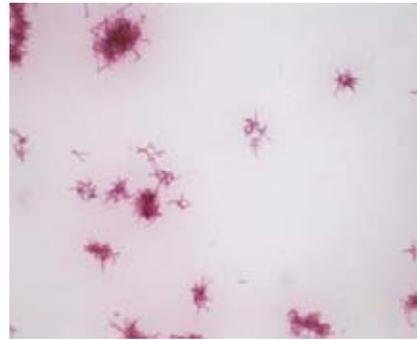
Colonias de < 1 mm de diámetro, circulares, umbeliformes, margen entero, color blanco, brillante, opaca, cremosa	Bacilos cortos, delgados, afilados	Rápido crecimiento
Colonias de 2 mm de diámetro, circulares, umbeliforme, margen entero, color gris, mate, opaca, cremosa.	Bacilos cortos, redondos, anchos, se tiñen fuertemente	Rápido crecimiento
Colonias de 1 mm de diámetro, circulares, elevadas, margen entero, color amarillo, mate, opaca, butirosa	Bacilos cortos, anchos, en pequeños cúmulos	Escotocromógena
Colonias de 1-2 mm de diámetro, circulares, convexas, margen entero, color amarilla naranja, brillante, opaca, cremosa	Bacilos cortos, sin agregación	Escotocromógena
•Colonias de 2 mm de diámetro, circulares, elevadas, margen entero, color amarillo claro, brillantes, opacas, cremosas	Bacilos largos, delgados, curvos, en pequeños cúmulos	Escotocromógena
Colonias de 2 mm de diámetro, circulares, elevadas, margen entero, color amarillo intenso, mate, opaca, cremosa	Bacilos cortos, anchos, en cúmulos	Escotocromógena
Colonias de 1 a 0.5 mm de diámetro, circulares, elevadas, margen aserrado, color amarillo, brillantes, transparentes, quebradiza	Bacilos cortos, anchos, agregados en pares o hileras	Escotocromógena
Colonias de < 1mm de diámetro, circulares, elevadas, margen entero, color ante, brillante, transparente, cremosa	Bacilos largos, delgados, se tiñen débilmente	No fotocromógena
♠Colonias de 1 mm de diámetro, circulares, convexa, margen entero, color blanca, mate, opaca, butirosa	Bacilos medianos, agregados en cúmulos	No fotocromógena

♠♥♦♣• Las morfológicas coloniales marcadas, fueron las más frecuentes (ver gráfica 2).

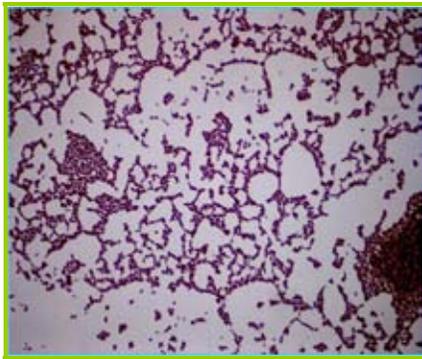
La recuperación de MNT en los sitios estudiados mostró micobacterias con diferente morfología microscópica observándose desde bacilos largos y delgados hasta micobacterias en forma cocoide como se observa en las microfotografías (Figura 6)



Bacilos largos, delgados, agregados en cúmulos



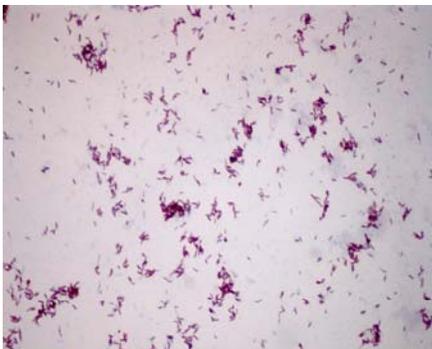
Bacilos largos, delgados, curvos, en pequeños cúmulos apretados



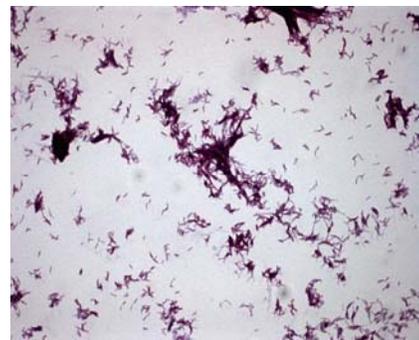
Bacilos cortos, anchos, sin agregación.



Bacilos cortos en forma de coma y cocoide agregados en cúmulos



Bacilos pleomórficos, sin agregación



Bacilos cortos, delgados, afilados, apariencia de agujas en cúmulos.

Figura 6. Morfologías bacterianas microscópicas más frecuentes de las MNT aisladas en agua superficial de los Canales de Xochimilco

5.2 Evaluación de métodos de recuperación de MNT

Los métodos utilizados para el aislamiento de MNT en agua fueron hidróxido de sodio (NaOH) y cloruro de cetilpiridinio (CPC) en dos diferentes concentraciones cada uno. Ninguno de los métodos mostró un 100% de recuperación de MNT en las muestras. Los dos métodos de recuperación de MNT presentaron pérdida de cultivos ya sea porque se aislaron solamente otros microorganismos contaminantes (en ocasiones produciendo una licuefacción del medio y por tanto la pérdida total del cultivo) o bien debido a la susceptibilidad de la micobacteria al descontaminante empleado. La tabla 4 muestra por sitio, el número de diferentes MNT recuperadas y el método con el que se aisló.

Tabla 4. Efecto de los diferentes métodos de recuperación en el aislamiento de MNT en canales de Xochimilco

Sitio	Aislamientos totales	NaOH 2% SDS 3%	NaOH 1% SDS3%	CPC 0.5%	CPC 0.05%
Trancatitla	4	4	0	0	0
Aplatlaco	12	3	5	2	2
Tezhuilo	5	1	2	0	2
San Diego	3	0	1	0	2
Seminario	8	3	1	1	3
Pizocoxpa	2	0	2	0	0
Santísima	7	3	1	1	3
Paso del águila	6	2	2	0	1
Zacapa	6	2	4	0	0
Bordo	3	0	1	0	2
El Toro	5	0	0	4	1
Fernando Celada	6	6	0	0	0
Cuemanco	1	0	0	0	1
Draga	1	0	1	0	0
Cotetexpan	4	2	1	0	1
Japón	2	0	1	1	0
Huetzali	3	2	0	1	0
Urrutia A	7	1	3	0	3
Urrutia B	6	0	4	1	1
Xaltocan	0	0	0	0	0
Total	91	29	29	11	22

- ◆ En negritas cultivos sin crecimiento
- ◆ En azul cultivos sin recuperación de MNT, aislamiento de otros microorganismos no pertenecientes al género *Mycobacterium*.
- ◆ Rojo cultivos con gran número de microorganismos contaminantes lo que produjo la degradación del medio

La recuperación más alta de MNT se logró con NaOH1% y SDS/3%, por el contrario el mayor número de muestras en donde no se recuperaron MNT ya sea por efecto del método usado o por contaminación del cultivo fue con CPC 0.5%. El NaOH 1%/SDS 3% (10%) junto con el NaOH2%/SDS3% (15%), presentan los porcentajes más bajos de pérdida de cultivos por contaminación (Tabla 5).

Los cultivos en los cuales no se obtuvo aislamiento por el método de NaOH/SDS fue en su mayoría por inhibición de las micobacterias mientras que los aislamientos que no se obtuvieron con el método de CPC fueron secundarios a exceso de contaminación. (Tabla 4 y 5)

Tabla 5. Recuperación de MNT en las 20 muestras procesadas por diferentes métodos

MÉTODO DE AISLAMIENTO	No. DE MUESTRAS POSITIVAS PARA MICOBACTERIAS (%)	No. DE MUESTRAS SIN CRECIMIENTO	CONTAMINACIÓN POR OTRAS ESPECIES (%)
NaOH 2%/SDS 3%	11/20 (55)	6/20 (30)	3/20 (15)
NaOH 1%/SDS 3%	14/20 (70)	4/20 (20)	2/20 (10)
CPC 0.5	7/20 (35)	5/20 (25)	8/20 (40)
CPC 0.05	12/20 (60)	3/20 (15)	5/20 (25)
TOTAL	44/80 (55)	18/80 (22)	18/80 (22)

El mayor número de aislamientos se obtuvo con NaOH, siendo el NaOH al 2%/SDS 3% el método con mayor número de morfologías coloniales diferente, no obstante, fue este método el que mostró el porcentaje más alto (30%) de pérdida de cultivos por inhibición de crecimiento y un menor porcentaje de recuperación de MNT (Tabla 5). Con el NaOH 1%/SDS 3% el número de morfologías coloniales diferentes fue menor que el obtenido con el NaOH2%/SDS 3% sin embargo tiene el mismo porcentaje de aislamientos totales que este y la pérdida de cultivos es menor. Por otro lado el CPC al 0.05% mostró un bajo porcentaje de aislamientos, pero una gran diversidad en cuanto a morfología colonial (Tabla 6).

Tabla 6. Recuperación de MNT por los diferentes métodos de purificación y enriquecimiento

MÉTODO DE RECUPERACIÓN	AISLAMIENTOS TOTALES (%)	No. AISLAMIENTOS CON MORFOLOGIA COLONIAL DIFERENTE
NaOH 2%/SDS 3%	29 (31.9)	13 (68.4)
NaOH 1%/SDS 3%	29 (31.9)	10 (52.6)
CPC 0.5%	11 (12.0)	7 (36.8)
CPC 0.05%	22 (24.2)	12 (63.2)
TOTAL	91	19*

♣ Es el número total de morfologías coloniales diferentes observadas considerando todas las muestras y ambos método

Algunas muestras solo fueron recuperadas con las concentraciones más bajas tanto de CPC como de NaOH. Aún más, en algunas muestras la recuperación de micobacterias solo se obtuvo con uno u otro descontaminante mostrando las diferencias en susceptibilidad de las micobacterias a los agentes químicos utilizados (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de los métodos de recuperación de MNT empleados en la susceptibilidad micobacteriana

AISLAMIENTO (CLASIFICACION RUNYON)	RECUPERADO SOLO CON NaOH	RECUPERADO SOLO CON CPC
Grupo IV	10/14	1/14 [▲]
Grupo IV	4/4	0/4
Grupo IV	3/9	5/9
Grupo IV	2/2	0/2
Grupo IV	1/5	3/5
Grupo IV	0/1	1/1
Grupo IV	0/1	1/1
Grupo II	0/1	1/1
Grupo IV	1/2	0/2
Grupo II	0/1	1/1
Grupo IV	1/2	0/2
Grupo II	1/1	0/1
Grupo II	1/1	0/1
Grupo IV	2/2	0/2
Grupo IV	0/1	1/1

▲ Tres aislamientos fueron recuperados por ambos métodos

5.3 Identificación bioquímica y molecular

La identificación de los aislamientos se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y por métodos moleculares con el kit INNO-LiPA (Innogenetics, Ghent, Belgium).

El kit INNO-LiPA ofrece un número limitado de tiras reactivas, por lo cual, para la identificación de los aislamientos obtenidos de las muestras de agua se seleccionaron 10 aislamientos con morfología colonial diferente. Se identificaron 5 especies: *M. smegmatis*, *M. fortuitum-M. peregrinum*, *M. chelonae complex* (grupo I, II, II, IV, *M. abscessus*), *M. gordonae*, *M. intracellulare* (Tabla 8).

La identificación realizada por INNO-LiPA indica que la especie mas frecuente es la del complejo *M. fortuitum-M. peregrinum*, solo 3 (dos pigmentadas y de lento crecimiento y una pigmentada y de rápido crecimiento) de las 10 micobacterias identificadas no fueron positivas para la sonda MFO. (Tabla 8).

Tabla 8. Identificación de 10 aislamientos por INNO LiPA MICOBACTERIA v2

AISLAMIENTO (CLASIFICACIÓN RUNYON)	Sonda género específico	Sonda de hibridación	Especie
Grupo IV	+	MFO	<i>M. smegmatis</i>
		MSM	
Grupo IV	+	MFO	<i>M. fortuitum-M.peregrinum complex</i>
Grupo II	+	MGO	<i>M. gordonae</i>
Grupo IV	+	MFO	<i>M. fortuitum-M.peregrinum complex</i>
		MCH-1	<i>M. chelonae complex</i> (grupo I, II, III, IV, <i>M.abscessus</i>)
Grupo II	+	MAIS	<i>M. intracellulare</i> (sequevar Mac-A)
		MIN-2	
Grupo IV	+		
		MFO	<i>M. fortuitum-M. peregrinum complex</i>
Grupo IV	+	MFO	<i>M. fortuitum-M. peregrinum complex</i>
Grupo IV	+	MFO	<i>M. fortuitum-M. peregrinum complex</i>
Grupo III	+	MFO	<i>M. fortuitum-M.peregrinum complex</i>
		MCH-1	<i>M. chelonae complex</i> (grupo I, II, III, IV, <i>M.abscessus</i>)
Grupo IV	-		

Las tiras de tipificación indicaron la presencia de más de una especie en los cultivos probados, observándose una banda púrpura muy tenue a diferencia de las bandas más intensas que se encontraron para las otras especies (las cuales son las reportadas en la tabla 8). Solo 2 de los 10 aislamientos mostraron ser una sola especie. Las especies "contaminantes" fueron: *M. simiae*, complejo *M. tuberculosis*, complejo *M. avium*, complejo *M. chelonae*

Por cuestiones operativas solo se aplicaron las pruebas bioquímicas a 20 de los 91 aislamientos obtenidos, identificando 7 especies: 4 de rápido crecimiento (*M. phlei*, *M. vaccae*, *M. fortuitum*, *M. alvei*) y 3 de lento crecimiento (*M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. terrae*). Por pruebas bioquímicas la especie más frecuente fue *M. terrae*, mientras que *M. fortuitum* solo fue encontrada en 1 de 20 aislamientos identificados (Tabla 9).

Tabla 9. MNT identificadas por pruebas bioquímicas convencionales

MNT IDENTIFICADAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES		
AISLAMIENTO (CLASIFICACIÓN RUNYON)	NO. DE AISLAMIENTOS IDENTIFICADOS	ESPECIE
Grupo IV	2	<i>M. szulgai</i>
Grupo IV	1	<i>M. phlei</i>
Grupo III	4	<i>M. terrae</i>
Grupo II	2	<i>M. gordonae</i>
Grupo IV	1	<i>M. alvei</i>
Grupo III	1	<i>M. terrae</i>
Grupo III	6	<i>M. terrae</i>
Grupo II	2	complejo <i>M. fortuitum</i>
Grupo IV	1	<i>M. vaccae</i>

Solo 5 aislamientos con morfologías coloniales similares se identificaron por ambos métodos, sin embargo, no hubo concordancia en los resultados obtenidos en la identificación, excepto en un aislamiento (*M. gordonae*). [Tabla 10]

Tabla 10. Aislamientos de MNT identificados a nivel de especie por INNO-LiPA y por pruebas bioquímicas convencionales

<i>AISLAMIENTO</i>	<i>BIOQUIMICAS</i>	<i>INNO-LiPA</i>
Grupo IV	<i>M. szulgai</i>	<i>M. smegmatis</i>
Grupo IV	<i>M. alvei</i>	<i>M. fortuitum-M. peregrinum complex</i>
Grupo III	<i>M. terrae</i>	<i>M. fortuitum-M. peregrinum complex</i> <i>M. chelonae complex</i>
Grupo IV	<i>M. phlei</i>	<i>M. fortuitum-M. peregrinum complex</i>
Grupo II	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>

Debido a las diferencias en los resultados de la identificación por ambos métodos, no se puede determinar con exactitud la especie a la que pertenece cada uno de los aislamientos estudiados. Sin embargo, algunas características especiales permiten proponer cuál es la especie más probable. En el aislamiento identificado por pruebas bioquímicas como *M. szulgai* y por el método molecular como *M. smegmatis*, la especie más probable es *M. smegmatis*, ya que una característica distintiva de *M. szulgai* es su fotocromogenicidad a 25°C, la cual no fue observada para este aislamiento.

En los 3 aislamientos restantes (dos no pigmentos y uno no pigmentado) en los que no coincide la identificación de ambos métodos, la especiación proporcionada por INNO-LiPA no es congruente con la morfología de la colonia o el resultado obtenido en algunas pruebas bioquímicas. Los 3 aislamientos fueron identificados por INNO-LiPA como complejo *M. fortuitum-M. peregrinum*, sin embargo, ninguno de ellos presentó una prueba positiva de crecimiento en agar McConkey, la cual es una prueba clave en la identificación de esta especie. Además, uno de los aislamientos es una cepa pigmentada y *M. fortuitum* es una especie no pigmentada (Tabla 10).

Distribución de MNT

La mayoría de los sitios estudiados son zonas agrícolas (13), más de la mitad de estos tienen asentamientos humanos irregulares y solamente 5 sitios tienen actividades de pastoreo y de recreación. Los aislamientos de MNT se encontraron con mayor frecuencia en las zonas agrícolas, únicamente cuatro no fueron aislados en este tipo de zona: un aislamiento de lento crecimiento identificado como *M. intracellulare* (por el método molecular) y uno pigmentado de rápido crecimiento identificado como *M. vaccae* (por pruebas bioquímicas) que fueron recuperadas solo en la zona turística; *M. gordonae* (identificada por ambos métodos) y una cepa escotocromógena de lento crecimiento se encontraron exclusivamente en zonas de asentamientos humanos.

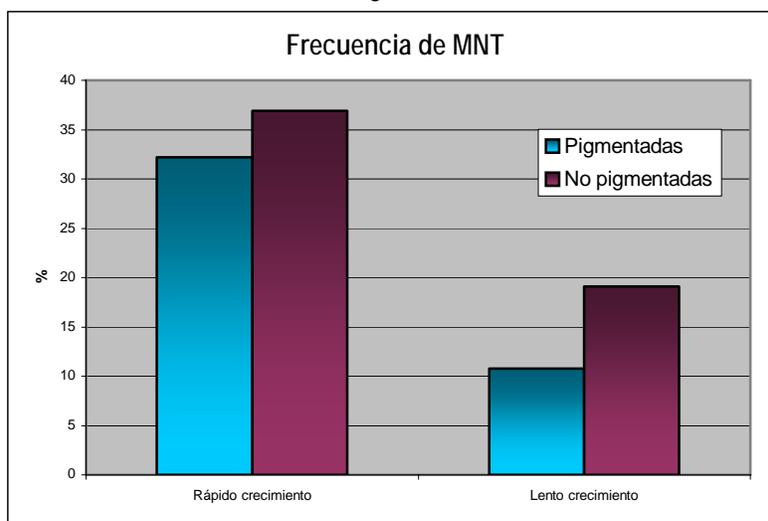
Tres especies de MNT fueron encontradas en cada uno de los sitios estudiados: *M. smegmatis*, *M. fortuitum* y *M. terrae*. La distribución de las MNT recuperadas en los veinte sitios del área ecológica de Xochimilco se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. MNT recuperadas en las diferentes zonas estudiadas

	MNT RECUPERADAS (CLASIFICACIÓN RUNYON)
Agrícola	Grupo II, Grupo III, Grupo IV
Agrícola y Pastoreo	Grupo II, Grupo IV
Agrícola, Pastoreo y Asentamientos humanos	Grupo III, Grupo IV
Agrícola y Asentamientos humanos	Grupo III, Grupo IV
Agrícola y Turística	Grupo III, Grupo IV
Asentamientos humanos y Pastoreo	Grupo II, Grupo III, Grupo IV
Asentamientos humanos y Turística	Grupo III, Grupo IV
Asentamientos Humanos	Grupo II, Grupo III, Grupo IV
Turística	Grupo II, Grupo III, Grupo IV

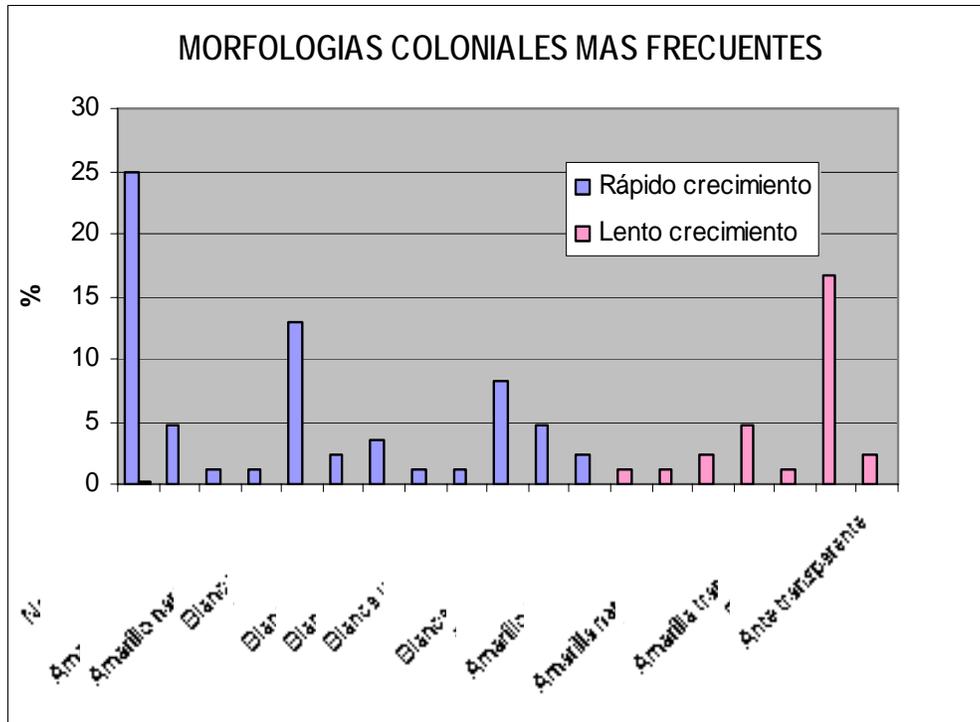
Los aislamientos de MNT de crecimiento rápido fueron los más frecuentes y se encontraron cepas pigmentadas y no pigmentadas con la misma frecuencia, mientras que, en los aislamientos de lento crecimiento predominaron las cepas pigmentadas (Gráfica 1).

Gráfica 1. Frecuencia de aislamiento de MNT de rápido y lento crecimiento en muestras de agua de los Canales de Xochimilco



Los aislamientos de MNT fueron organizados de acuerdo a las características morfológicas de las colonias en 19 grupos (ver tabla de descripción morfológica). La frecuencia de recuperación se muestra en la gráfica 2. Las MNT de rápido crecimiento más frecuente fueron naranja opaca*, blanca brillante* y blanca rugosa*. Las cepas de lento crecimiento de mayor frecuencia fueron blanca opaca* y amarilla brillante*.

Gráfica 2. Frecuencia de morfologías coloniales de MNT recuperadas en muestras de agua de los Canales de Xochimilco



6. DISCUSIÓN

El aislamiento de micobacterias a partir de muestras ambientales se dificulta debido a que las muestras ambientales contienen abundante flora diversa y no todas las especies de micobacterias son igualmente resistentes a los diferentes procesos de recuperación.

Existen numerosos estudios comparativos de métodos de recuperación de MNT en los que se demuestra la eficacia de las soluciones de hidróxido de sodio con lauril sulfato de sodio como método de aislamiento de muestras ambientales [5,6]. Kamala y col. compararon seis métodos de recuperación encontrando que el tratamiento con SDS 3% y NaOH 1% es el método de recuperación más efectivo para muestras de agua y suelo [6]. Sin embargo, un estudio realizado por Parashar en la India [7], muestra que el uso de concentraciones de NaOH al 1-2% son insuficientes para obtener una buena recuperación de MNT por lo que es necesario utilizar hasta el 4% del alcali para reducir el número de microorganismos contaminantes, por lo que la concentración de NaOH depende de la calidad de la muestra ambiental.

De las muestras de agua de riego provenientes de los Canales de Xochimilco, se aislaron diferentes especies de micobacterias no tuberculosas, y estas se acompañaron invariablemente de una gran variedad de microorganismos, lo que dificultó el aislamiento primario. Se utilizó uno de los métodos más empleados para la recuperación de micobacterias ambientales (NaOH/SDS) con dos diferentes concentraciones 1 y 2%. La selección de estas concentraciones se realizó con base a la experiencia de diferentes autores en recuperación de MNT en muestras de medio ambiente. [5, 6, 7, 39]

Por otra parte, el tratamiento alcalino es capaz de inhibir el crecimiento de las micobacterias y disminuir la posibilidad de su recuperación. Le Dantec y col.[39] determinaron que el proceso de recuperación con una solución de NaOH 1% y SDS 3% redujo al 1% del número original de MNT demostrando que este método elimina un gran número de micobacterias. A fin de evitar la pérdida de cultivos por inhibición del crecimiento se utilizó además del NaOH, otro método de recuperación que asegurara el aislamiento de MNT, por lo que se seleccionó el CPC.

A finales de los 70's se publicaron estudios en los que se recomendaba al CPC como un buen medio de eliminación de organismos no ácido alcohol resistentes en muestras de esputo[9,48] e incluso se propuso como medio de transporte y/o almacenaje de muestras clínicas que no pudieran ser trabajadas dentro de las primeras 48 horas. [9]

Aunque el uso de CPC no reemplazó al método tradicional (NaOH/NALC), llegó a conocerse como un buen bactericida de microorganismos no ácido alcohol resistente incluso a concentraciones muy bajas (del orden de una parte por millón, 1 ppm). Recientemente en algunas investigaciones [20,34, 40] lo han utilizado como método de aislamiento de MNT en muestras de agua, sin embargo, no hay un consenso en cuanto a la concentración y el tiempo de exposición para una buena recuperación de micobacterias. De igual manera el CPC se utilizó en dos concentraciones diferentes 0.5% y 0.05% y con un tiempo de exposición de 30 min.

A pesar del uso de dos descontaminantes con dos concentraciones diferentes, nuestros resultados muestran que ninguno de los métodos de recuperación empleados permite un aislamiento de MNT del 100%.

La pérdida de los cultivos con CPC 0.05% se debió principalmente a la ineficacia para eliminar la flora contaminante; por otro lado la recuperación de micobacterias con NaOH 2%/SDS 3% fue bajo debido a la inhibición del crecimiento, probablemente a causa de la lisis que incluyó a las MNT.

El NaOH 1%/SDS 3% fue el método con el que se obtuvo la mayor recuperación de MNT (70%), además de presentar porcentajes bajos de pérdida de cultivos ya sea por contaminación o bien por inhibición de crecimiento, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kamala^[6]. Parashar utilizó NaOH al 1% como método de recuperación de micobacterias en muestras de agua, con un grado de contaminación de hasta un 100%, por lo que recomendó el uso de concentraciones más elevadas de NaOH. Nuestros resultados muestran que la recuperación de micobacterias de las muestras de agua de los Canales de Xochimilco es efectiva con concentraciones de NaOH 1% y que el empleo de concentraciones más elevadas como lo indica Parashar en su estudio^[7] resulta en eliminación no solo de flora contaminante sino también de micobacterias. Al inicio de nuestro estudio, debido al origen de las muestras se utilizó NaOH al 4%, sin embargo, la concentración tan elevada de NaOH no solo eliminó los microorganismos contaminantes sino también a las micobacterias presentes en la muestra, obteniendo una nula recuperación, caso contrario a lo encontrado por Parashar en donde el empleo de NaOH 4% logra una recuperación de MNT en el 100% de las muestras. Lo anterior apoya la importancia de desarrollar un método de aislamiento de muestras ambientales en cada región del mundo en estudio para lograr una eficiente recuperación de MNT.

En general el grado de contaminación en los cultivos es mayor cuando se emplea CPC, sin embargo, el incremento de la concentración (de 0.05 a 0.5%) no hace más efectivo al método de aislamiento, ya que además de incrementar el % de contaminación también se incrementa la inhibición del crecimiento. Du Moulin y Stottmeier^[8] demostraron la efectividad del CPC al 0.04% como método de eliminación de microorganismos no ácido alcohol resistentes (10^3 unidades viables/ml), logrando una recuperación de micobacterias entre el 1 y 100% dependiendo de la especie, sin embargo el tiempo de exposición al CPC fue de 24 horas. Esto indica que quizás sea necesario incrementar el tiempo de exposición a CPC por más de 30 min a concentraciones de 0.05%.

La susceptibilidad de las micobacterias a los diferentes métodos de aislamiento es otro parámetro crítico para la selección del mejor método. Algunos estudios muestran que existen diferencias entre distintas especies de MNT en cuanto resistencia innata a los diferentes agentes químicos. Carson y col. compararon cinco métodos de recuperación de MNT: ácido oxálico, formaldehído, cloro, CPC y cloruro de cetiltrimetilamonio. La reducción en la cuenta viable para las cinco especies de MNT (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, MCL0, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*) estudiadas fueron diferentes, desde un 94.4% hasta un 0.8%. Por ejemplo, para MCL0 el porcentaje de recuperación con ácido oxálico fue de tan solo 5.6%, mientras que con CPC la recuperación fue de 81.1%^[21]. Aislamientos clínicos de *M. chelonae*, mostraron una supervivencia mayor a 24hr en formaldehído al 2% (solución

acuosa), en cambio, cepas ATCC de *M. chelonae* y *M. fortuitum* fueron rápidamente inactivadas después de dos horas de exposición. [56]

La recuperación de algunas micobacterias fue posible únicamente con solo uno de los métodos de recuperación. Tres aislamientos de rápido crecimiento y dos cepas pigmentadas y de lento crecimiento fueron aisladas cuando las muestras se trataban con NaOH pero no con CPC. Un aislamiento de rápido crecimiento y tres pigmentadas y de lento crecimiento fueron recuperadas únicamente con CPC y no con NaOH. Los resultados obtenidos muestran una clara diferencia de susceptibilidad a los dos métodos de aislamiento empleados, lo que indica que algunas especies no hubieran sido recuperadas si solo se emplea uno de los descontaminantes. [38, 62, 56, 21]

De los 91 aislamientos de MNT obtenidos se encontraron 19 morfologías coloniales diferentes, hasta el momento se ha realizado la especiación por pruebas bioquímicas convencionales de solo 20 aislamientos. Para la identificación empleando el kit INNO-LiPA, de todos los 91 aislamientos obtenidos se seleccionaron 10 por su morfología colonial notablemente diferente.

Los resultados de los métodos bioquímicos tradicionales a pesar de estar bien establecidos, estandarizados y ser relativamente poco costosos con frecuencia son ambiguos y erróneos, ya que están limitados en extensión a las especies para las cuales un gran número de cepas ya han sido estudiadas. Los errores de identificación pueden resultar, especialmente porque las características fenotípicas no han sido identificadas en muchas de las especies recientemente descritas que fueron reconocidas en base a la secuencia 16S ARNr.

La determinación de la especie por métodos bioquímicos se realiza comparando el perfil bioquímico del aislamiento y el perfil bioquímico de la cepa tipo. La mayoría de las especies que están bien caracterizadas bioquímicamente son aquellas que se aíslan con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas. Sin embargo, existe un gran número de micobacterias ambientales para las cuales no se ha estandarizado su patrón bioquímico. A fin de realizar una mejor identificación de las micobacterias aisladas de las muestras de agua, se hizo una recopilación de todos los perfiles bioquímicos disponibles, tanto de especies ambientales como de aquellas que son clínicamente significativas. (ANEXO 3)

En nuestro caso los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los aislamientos obtenidos no fueron concluyentes debido a la variación en la actividad enzimática y las características fenotípicas entre las especies que no es una propiedad absoluta debido a su variación. Al comparar el perfil, este no resultó idéntico entre la cepa tipo y el aislamiento, ya que además de existir variaciones intraespecie para una misma prueba, existe la carencia de resultados en algunas pruebas por parte de la cepa tipo, generando que el resultado no sea concluyente.

Algunas especies no fueron identificables a nivel de especie, sino únicamente a nivel de complejo. Como en el caso del complejo *M. fortuitum* en el que además de todas las pruebas convencionales, es necesaria la aplicación de pruebas adicionales como la utilización de diferentes compuestos como citrato, manitol o inositol como únicas fuentes de carbono. [42]

Por otro lado, en la especiación de MNT por pruebas moleculares (INNO-LiPA) se identificó en 6 de 10 aislamientos el complejo *M. fortuitum-M. peregrinum*, sin embargo, las características fenotípicas de algunos de estos aislamientos no corresponden a los reportados para el complejo *M. fortuitum*

Existen numerosos estudios que evalúan la especificidad y sensibilidad del kit INNO-LiPA. Miller y col. encontraron una identificación correcta en 59 de los 60 aislamientos clínicos probados (la mitad de ellos especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*) [43]. Stuffys y col. en el 2001 identificaron 157 cepas de micobacterias, 47 cepas de referencia (37 especies diferentes) y 110 aislamientos clínicos. Compararon los resultados del kit con pruebas convencionales y PCR-PRA (análisis de enzimas de restricción) del gen hsp 65. Lo que encontraron fue una exactitud del 99.4% y una sensibilidad del 100% a nivel de género [44]. Makinen y col. en el 2002 estudiaron 81 aislamientos clínicos seleccionados de una colección de cepas, reportando una exactitud del 89.4%, se sugiere que las diferencias observadas entre los estudios anteriores y este (exactitud varía desde 89.4% hasta 99.4%), pudieran reflejar variación genética observada ya en subespecies micobacterianas aisladas de diferentes áreas geográficas. [45]

Los estudios que evalúan la especificidad y sensibilidad de INNO-LiPA (para ese entonces solo identificaba 8 especies de MNT y el complejo *M. tuberculosis*) existentes anteriores al 2002 muestran un alto grado de confiabilidad en la identificación de MNT por esta prueba molecular. Sin embargo todos ellos estudian cepas referencia o aislamientos clínicos, ninguno lo utiliza en la identificación de MNT de muestras ambientales.

El kit INNO-LiPA que utilizamos para la identificación de nuestros aislamientos ambientales, corresponde a una nueva versión que identifica 8 especies adicionales. Tortoli y col. en el 2003 evaluó esta nueva versión utilizando 197 cepas, 53 de las cuales eran cepas referencias de micobacterias y 11 no pertenecían al género *Mycobacterium* (*Nocardia* spp, *Gordona* spp, *Tsukamurella* spp, *Rhodococcus*). A nivel de género se demostró un 100% de especificidad y sensibilidad (ninguna de las cepas que no pertenecían al género *Mycobacterium* dieron una prueba positiva) y a nivel de especie la especificidad del kit fue del 92.2%. [46]

En los aislamientos que obtuvimos solo uno fue negativo para la sonda género específica, los 9 aislamientos restantes fueron positivos para la sonda de género.

Tortoli reporta en ese mismo estudio [46] varias reacciones cruzadas detectadas con la sonda MFO que es específica para *M. fortuitum complex*. Las especies probadas no podían ser identificadas por el kit (*M. thermoresistible*, *M. agri*, *M. alvei*, *M. mageritense*, *M. senegalense*), sin embargo, dieron una marca positiva para *M. fortuitum*.

Así que los resultados de identificación obtenidos por INNO-LiPA para los aislamientos recuperados de las muestras de agua superficial de los Canales de Xochimilco no pueden considerarse concluyentes debido a las reacciones cruzadas que pueden presentarse con la sonda MFO. El kit permite identificar únicamente 16 especies de micobacterias que son comúnmente

aisladas en muestras clínicas, los aislamientos que se identificaron por INNO-LiPA provienen de muestras ambientales por lo que si el aislamiento obtenido corresponde a una especie de MNT no incluidas en la tira reactiva, se forman uniones inespecíficas con la sonda MFO. [42]

En la mayoría de los aislamientos identificados por el kit INNO-LiPA se detectaron más de una especie, sugiriendo que el cultivo pudiera ser mixto, a pesar de que no se observaban dos morfologías coloniales distintas en este.

Los estudios de Stuffys y Makinen que emplean el kit para la identificación de MNT^[44,45] también encuentran la presencia de otras bandas además de la especie específica en la tira. En algunos casos, la cepa probada estaba mezclada a pesar de no mostrar evidencia macroscópica de ello, pero en otros casos el cultivo se encontró puro por pruebas moleculares. La aparición a esas bandas no esperadas fue atribuida a la sensibilidad de la prueba a la temperatura. Aún cuando los reactivos fueron precalentados como indica el procedimiento, la temperatura no permanece óptima ni constante durante el pipeteo de los mismos, pudieron haber producido hibridaciones inespecíficas.

Otra razón posible por la que se observan bandas menos intensas en la tira reactiva es la variación intraespecie. Se ha reportado la existencia de variaciones intra-especies dentro de los aislamientos de micobacterias y esta se ha asociado con las diferencias geográficas de su origen^[47]. Makinen y col., encontraron que INNO-LiPA solo amplificó el 62.5% de los aislamientos de *M. chelonae* probados, lo que muestra la heterogenicidad intraespecies de la región 16S-23S. Las bandas no esperadas en las tiras de los aislamientos probados pudieran ser debidos a una heterogenicidad intra especie mas que por la presencia de más de una especie en el cultivo^[45].

Actualmente se desconoce la frecuencia y distribución de las MNT en el mundo. Existen algunos estudios que reportan la frecuencia y prevalencia de las MNT en agua de algunos países.

Le Dantec y col en Francia estudiaron muestras de dos plantas de tratamiento y de los sistemas de distribución de agua de 12 sitios localizados a través de París y que están fuera del desarrollo urbano. La recuperación de MNT fue del 72% y la mayoría de las MNT no fue identificada. De las especies identificables la mayoría corresponde a micobacterias saprófitas siendo las más frecuentes *M. gordonae* y *M. nonchromogenicum*. De las especies potencialmente patógenas aisladas las más frecuentes fueron. *M. chelonae* y *M. fortuitum*.^[39]

Covert y col. en Estados Unidos estudiaron muestras de agua potable y de tratamiento de 21 estados. Se aislaron MNT en el 33% de las muestras, tanto micobacterias de lento como rápido crecimiento. Las especies más frecuentes fueron *M. mucogenicum*, *M. intracellulare*, *M. gastri*, *M. kansasii* y *M. gordonae*.^[34]

Torvinen y col. estudiaron 16 sistemas de distribución de agua potable en 8 localidades de Finlandia. La frecuencia de aislamientos fue de 35%. Solo el 64% de los aislamientos totales fueron especies identificables: *M. lentiflavum*, *M. tusciae* y *M. gordonae*.^[40]

Kamala y col. seleccionaron 15 pueblos al azar en el área cerca de Madras, al sur de la India, estudiaron muestras de agua, suelo y polvo casero (piso, cocina, tejado). Se encontró una gran

proporción de MNT patógenas y no patógenas. La especie predominante en agua y polvo fue MAIS complex y en suelo predominó *M. fortuitum* complex^[41].

En las muestras de agua superficial de los Canales de Xochimilco, los aislamientos de rápido crecimiento fueron los más frecuentes, tanto de cepas pigmentadas como no pigmentadas. Los aislamientos de lento crecimiento fueron en su mayoría cepas pigmentadas. Las especies de MNT encontradas fueron *M. fortuitum-M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*, siendo la más frecuente *M. fortuitum-M. peregrinum* (identificadas por INNO-LiPA) y *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. fortuitum*, *M. alvei*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. terrae* (identificadas por pruebas bioquímicas).

Se logró una recuperación de MNT en 19 de los 20 sitios estudiados (95%). La mayoría de los sitios estudiados corresponden a zonas agrícolas y de pastoreo, solo algunos se emplean como zonas habitacionales exclusivamente o de recreo. La mayoría de las MNT aisladas se encontraron en zonas agrícolas, únicamente cuatro no fueron aislados en este tipo de zona: *M. intracellulare* (identificada por el método molecular) y *M. vaccae* (identificado por pruebas bioquímicas) que fueron recuperadas solo en la zona turística; *M. gordonae* (identificada por ambos métodos) y una cepa escotocromógena de lento crecimiento se encontraron exclusivamente en zonas de asentamientos humanos. *M. intracellulare* recuperadas únicamente a partir de zonas habitacionales y de recreo, pertenece al complejo MAC que es altamente prevalente en infecciones por micobacterias no tuberculosas.

Tres especies de MNT fueron encontradas en todos los sitios estudiados: *M. smegmatis*, *M. fortuitum* y *M. terrae*. *M. smegmatis* se le considera como saprófita, sin embargo, *M. fortuitum-M. peregrinum* complex es una MNT de rápido crecimiento potencialmente patógena.

7. CONCLUSIONES

- ❖ Ninguno de los métodos de recuperación de MNT fue el óptimo.
- ❖ La mayor recuperación de MNT se obtuvo con NaOH 1 % / SDS 3% .
- ❖ El método mas pobre para el aislamiento de MNT fue con el empleo de CPC mismo que se mejora con el incremento del tiempo de exposición.
- ❖ Los aislamientos de MNT de rápido crecimiento tanto cepas pigmentadas como no pigmentadas fueron los más frecuentes. Mientras que, los aislamientos de MNT de lento crecimiento fueron en su mayoría cepas pigmentadas.
- ❖ Con frecuencia más de una especie fue detectada para los aislamientos MNT identificados con el kit INNO-LiPA.

PERSPECTIVAS

- ♣ Debido a la falta de concordancia en la identificación de las MNT recuperadas de las muestras de agua de los Canales de Xochimilco por ambos métodos (pruebas bioquímicas e INNO-LiPA), es necesario la inclusión de un método molecular capaz de identificar la mayoría de las especies de micobacterias existentes y con una sensibilidad alta como PCR-PRA o secuenciación para determinar con mayor precisión la especie.

ANEXO 1**TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN**

Una vez realizado el frotis, se cubre el portaobjetos con fucsina fenicada y se calienta a emisión de vapores durante 5 min. Se lava con agua corriente y se decolora con alcohol ácido durante 1 min. Se realiza otro lavado con agua corriente y se cubre el portaobjetos con solución de azul de metileno por 1 min. Finalmente se lava con agua y se deja secar al aire.

Preparación de reactivos

Carbol fucsina

Fucsina básica.....	0.3 g
Alcohol etílico 95%	10 ml
Fenol (cristales derretidos).....	5 g
Agua destilada.....	90 ml

Alcohol ácido

Alcohol etílico.....	97 ml
Acido clorhídrico conc.....	3 ml

Azul de metileno

Azul de metileno.....	0.3 g
Agua destilada.....	100 ml

PREPARACIÓN DE MEDIO L-J

Componentes	PESO
KH ₂ PO ₄	2.40 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.24 g
Citrato de Magnesio.....	0.60 g
Asparagina.....	3.60 g
Glicerol.....	12 ml
Agua desionizada.....	600 ml
Verde de malaquita 2%.....	20 ml
Huevo.....	1000 ml

Las sales y el glicerol se disuelven en el agua con calentamiento y se esterilizan 15 min, 121°C. La solución de verde de malaquita al 2% se prepara en un matraz aparte, se cubre inmediatamente y se esteriliza también bajo las mismas condiciones. El huevo lavado con agua y jabón, se sumerge en una solución de etanol al 70% durante 30 min. Se rompe el cascarón bajo condiciones estériles, se homogeniza con ayuda de una licuadora y se vacía al medio con sales. Se añade poco a poco el

verde de malaquita y se deja reposar en obscuridad durante una hora. El medio se vacía en tubos de vidrio y se coagulan a 85°C en el coagulador.

Middlebrook 7H10 Agar Base (Sigma)

Componentes (g/L)

Sulfato de amonio, 0.50
Acido L-Glutámico, 0.50
Fosfato de potasio monobásico, 1.50
Fosfato de sodio dibásico, 1.50
Citrato de sodio, 0.40
Citrato de amonio férrico, 0.04
Sulfato de magnesio, 0.025
Cloruro de calcio, 0.0005
Sulfato de zinc, 0.001
Sulfato de cobre, 0.001
Piridoxina, 0.001
Biotina, 0.0005
Vede de malaquita, 0.00025
Agar, 15.00

Middlebrook OADC Growth Supplement (Sigma)

Componentes: (por vial)

Albúmina Bovina Fracción V 2.50 g
Dextrosa 1.00 g
Catalasa 0.002 g
Acido Oleico 0.025 g
Cloruro de sodio 0.425 g
Agua destilada 50 ml

Middlebrook 7H9 Broth Base (Sigma)

Componentes (g/L)

Sulfato de amonio, 0.50
Fosfato dibásico de sodio, 2.50
Fosfato monobásico de potasio, 1.00
Cloruro de sodio, 0.10
Sulfato de magnesio, 0.05
Cloruro de calcio, 0.0005
Sulfato de zinc, 0.001
Sulfato de cobre, 0.001
Citrato de amonio férrico, 0.04
Acido L-Glutámico, 0.50
Piridoxina, 0.001
Biotina, 0.0005

Middlebrook ADC Growth Supplement (Sigma)

Componentes: (por vial)

Albúmina Bovina Fraction V 2.5 g

Dextrosa 1.0 g

Catalasa 0.0015 g

Agua destilada 50 ml

ANEXO 2

Aislamientos identificados por pruebas bioquímicas convencionales*

CEPA	MICROSCOPIA	COLONIA	TEMPERATURA CRECIMIENTO (°C)			VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	FORMACIÓN DE PIGMENTO OBS/LUZ	PIRUVATO*	NIACINA	NITRATO	CATA-LASA 68°C	CATALASA SQ	HIDRÓLISIS T80	TELU-RITO	TOMA DE HIE-RRO	ARILSUL-FATASA	NACL 5%	MAC-CONCKEY	Urea	PZA
			35	25	42															
1N2N	Bacilos largos delgados ZN+ en acúmulos	Rugosa/cremosa	+	+/-	-	LENTO	NARANJA +/+	ED	-	+	+	>45 mm	+5d	-	-	+14d	-	-	-	+
6N1N	Bacilos cortos ZN+ en acúmulos	Rugosa/cremosa	+	+	-	LENTO	NARANJA +/+	ED	-	+	+	>45 mm	+5d	.*	-	+14d	-	-	-	+
7C0.5A	Bacilos cortos ZN+ pleomórficos	Lisa/cremosa	+	+/-	-	LENTO	AMARILLO NARANJA +/+	BD	-	-	+	>45 mm	+10d	-	-	+14d	-	-	+	+
7C0.05A	Bacilos cortos ZN+ con cuerpos densos, cordones	Lisa/cremosa	+	+	-	LENTO	AMARILLA NARANJA +/+	ED	-	-	+	>45 mm	+10d	-	-	+14d	-	-	+	+
1N2B	Bacilos cortos delgados ZN+	Lisa/cremosa	+	+	-	LENTO	-/-	BD	-	-	+	>45 mm	+5d	-	-	+14d	-	-	-	+
7N1BG	Bacilos largos ZN+ en acúmulos	Seca/rugosa	+	+	-	LENTO	-/-	BD	-	-	+	>45 mm	+5d	-	-	+14d	-	-	-	+
2N1B	Bacilos +/- cortos, delgados ZN+ en acúmulos	Rugosa/seca	+	-	-	LENTO	-/-	ED	-	-	+	>45 mm	+5d	+	-	+14d	-	-	-	+
7N2B	Bacilos largos ZN+ en acúmulos	Lisa/cremosa	+	+	-	LENTO	-/-	ED	-	-	+	>45 mm	+5d	.*	-	+14d	-	-	-	+
7N2B	Bacilos pleomórficos ZN+ en mechones, apariencia desordenada	Lisa/cremosa	+	+	-	LENTO	-/-	ED	-	-	+	>45 mm	+5d	-	-	+14d	-	-	-	+
7C0.05B	Bacilos cortos ZN+ en acúmulos	Rugosa/cremosa	+	+/-	-	LENTO	-/-	ED	-	-	+	>45 mm	+10d	-	-	+14d	-	-	-	+
9N1B	Bacilos medianos delgados ZN+ en acúmulos	Lisa/cremosa	+	+	-	LENTO	-/-	ED	-	-	+	>45 mm	+10d	-	-	+14d	-	-	-	+
8N2B	Bacilos cortos delgados ZN+ en acúmulos	Seca/rugosa	+	-	-	LENTO	-/-	NEG	-	-	+	>45 mm	+5d	-	-	+14d	-	-	-	+
3N1N	Bacilos medianos, delgados ZN+	Lisa/cremosa	+	+	-	LENTO	-/-	BD	-	+	+	>45 mm	+5d	+	-	+14d	-	-	-	+
3N4	Bacilos pleomórficos ZN+ con cuerpos densos	Lisa/seca	+	+	-	LENTO	-/-	BD	-	+	+	>45 mm	+10d	-	-	-14d	-	-	-	+
11C0.5	Bacilos cortos ZN+ forma cocoide	Lisa/cremosa	+	+/-	-	LENTO	-/-	BD	-	+	+	>45 mm	+10d	-	-	-14d	-	-	-	-
MN0.5	Bacilos muy cortos ZN+ en acúmulos	Lisa/cremosa	+	+/-	-	LENTO	-/-	BD	-	+	+	<45 mm	+5d	-	-	+14d	-	-	+	+
1N2S	Bacilos largos, delgados ZN+	Lisa/cremosa							-	+	+	>45 mm	+10d	-	-	+14d	-	-	-	+
18C0.05A	Bacilos cortos ZN+ forma cocoide	Lisa/cremosa	+	+	-	RAPIDO	AMARILLO NARANJA +/+	BD	-	-	-	>45 mm	+10d	+/-	-	+3d	-	-	+	+
2C0.05N	Bacilos cortos ZN+ en acúmulos	Seca/rugosa	+	+	-	RAPIDO	AMARILLO NARANJA +/+	BD	-	-	+	>45 mm	+10d	-	-	-3d	+	-	+	+
5N1B	Bacilos cortos ZN+ en acúmulos	Rugosa/cremosa	+	-	-	RAPIDO	-/-	BD	-	-	-	>45 mm	+10d	-	-	-3d	-	-	-	+
10N1G	Bacilos cortos, delgados ZN+ forma arrosariada	Rugosa/cremosa	+	+/-	-	RAPIDO	-/-	ED	-	+D	+	>45 mm	+5d	+	-	+3d	-	-	-	+
II LLUVIAS	Bacilos cortos ZN+ forma cocoide en acúmulos	Rugosa/cremosa	+	+	-	RAPIDO	-/-	BD	-	+	+	>45 mm	-10d	+	-	+3d	+	+	-	+
15N1B	Bacilos cortos ZN+ en acúmulos	Seca/lisa	+	+/-	-	LENTO	-/-	ED	-	+	+	>45 mm	+D10d	+	.*	+14d	+	+	-	+

*El signo de más y menos indican la presencia o ausencia, respectivamente, de la característica; los espacios en blanco indican que no hay información o no está disponible sobre esa característica en particular; V variable, +/- usualmente presente, -/+ usualmente ausente. El porcentaje entre paréntesis se refiere al porcentaje de cepas positivas probadas, el resultado de la prueba está dada en base a esos porcentajes. ♦ED escaso desarrollo, BD buen desarrollo

ANEXO 3

Pruebas bioquímicas reportadas de las cepas tipo*

CEPA	MICROSCOPIA/ Caract. especiales	COLONIA	TEMPERATURA CREC. (°C)			VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	FORMACIÓN DE PIGMENTO OBS/LUZ	PIRU- VATO*	NIACI- NA	NITRA- TO	CAT 68°C	CATALASA SQ	HIDRO- LISIS T80	TELU- RITO	HIE- RRO	ARILSULFA- TASA	NACL 5%	MAC- CONCKEY	UREA	PZA
			35	25	42															
<i>M. bovis</i>		Rugosa/plana transparente	+			LENTO	- / -		- (4)	- (9)	- (2)	<45 (69)	- (21)		-	- (0)	- (0)	-	+ / - (50)	-
<i>M. avium</i>	Se confunde con <i>M. simiae</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. xenopi</i>	Lisa transparente/ rugosa	+			LENTO	- / - (87)		- (0)	- (4)	+ / - (60)	<45 (98)	- (2)	+ (81)	-	- (1)	- (0)	- / +	- (2)	+
<i>M. xenopi</i>		Lisa			+	LENTO	- / -		- (0)	- (7)	+ / - (31)	>45 (85)	- (12)	+ / - (65)	-	+ / - (36)	- (0)	-	- (0)	V
<i>M. haemophilum</i>	Requiere hemina y nitrate Fe de amonio	Rugosa/lisa	+			LENTO	- / -			-	-	<45	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. malmoense</i>	Crece mejor en pH bajos	Lisa	+			LENTO (<6 semanas)	- / - (88)		- (0)	- (1)	- / +	<45 (99)	+ (99)	+ (74)	-	- (0)	- (0)		- (9)	+
<i>M. shimoidei</i>		Rugosa	+			LENTO	- / -		-	-	-	<45	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. genavense</i>	Cocobacilos, colonias se hacen blancas o crema con el tiempo	Lisa/ plana Transparente	+	+	+	LENTO (1 a 3 meses)	- / -		-	-	+	>45	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>M. celatum</i>	Pequeña, lisa, amarilla pálida	Lisa/ plana transparente	+		+	LENTO (20-35 días)	- / - (100)		-	- (0)	+	<45 (100)	- (0)	+	- (0)	+	- (0)	- (0)	- (0)	+
<i>M. ulcerans</i>		Rugosa	+	+		LENTO	- / -		-	-	+	<45	-		-	-	-	-	V	+
<i>M. terrea complex</i>		Lisa/rugosa	+			LENTO	- / - (93)		- (1)	+ / - (67)	+	>45 (93)	+	+ / - (46)	-	- (2)	- (2)	V	- (13)	V
<i>M. triviale</i>		Rugosa	+			LENTO	- / - (100)		- (0)	+	+	>45 (100)	+	- (25)	-	+ / - (56)	+	-	- / + (33)	V
<i>M. gastri</i>		Lisa/Rugosa	+			LENTO	- / - (100)		- (0)	- (0)	- (11)	<45 (100)	+	+ / - (50)	-	- (0)	- (0)		- / + (44)	-
<i>M. branderi</i>		Lisa umbonada	+	+	+	LENTO	- / -			-	+	<45	-		+	-	-	-	-	
<i>M. canettii</i>	Se confunde con <i>M. tuberculosis</i>	Lisa conv a rugosa				LENTO	- / -		+	+	-	ND	-		ND	-	-	-	ND	
<i>M. heidelbergense</i>		Lisa pequeña	+			LENTO (4 semanas)	- / -			-	+	ND	+		-	-	-	-	+	
<i>M. lacus</i>	Bacilo largo muy arrosariado	Pequeña seca	+	+	+	LENTO (2 a 3 semanas)	- / -			+	ND	<45	+ / -		+	-	-	-	+	
<i>M. shottsii</i>	Cocobacilo disgénico	Rugosas desinflada	+			LENTO (4 a 6 semanas)	- / -		+	-	V	ND	-		-	-	-	-	+	
<i>M. triplex</i>	Bacilos cortos	Lisas	+			LENTO (2 a 3 semanas)	- / -			+	+	>45	-		-	-	-	-	+	
<i>M. palustre</i>		Lisas	+	+	+	LENTO (3 a 4 semanas)	AMARILLO + / +			+ / -	+	<45	+		-	-	-	-	+	
<i>M. kubicae</i>	Fuertemente ZN+, bastones curvos	Lisas abultadas	+	+		LENTO	AMARILLO + / +			+	ND	>45	-		-	-	-	-	-	
<i>M. doricum</i>		Lisa	+	+		LENTO (2 semanas)	AMARILLO + / +			+	+	<45	-		-	-	-	-	+	
<i>M. conspicuum</i>	Cocobacilos	Lisa	+	+		LENTO (<3 semanas)	AMARILLO PÁLIDO + / +			-	-	100 +	<45	+	-	ND	+ 10 D	-	-	-
<i>M. tusciae</i>	Bacilos en bastón colonias centro elevado c/ franja plana	Rugosa	+	+		LENTO (1 mes LJ)	+ / +		-	+	+	<45	+10D	ND	ND	- 10D	-	-	+	ND
<i>M. heckeshornense</i>	Colonias pequeñas	Lisa	+		+	LENTO (4sem)	+ / +		-	-	+	<45	-	ND	ND	-	-	-	-	-

* El signo de más y menos indican la presencia o ausencia, respectivamente, de la característica; los espacios en blanco indican que no hay información o no está disponible sobre esa característica en particular; V es variable, +/- es usualmente presente, -/+ usualmente ausente. ND no determinada. El porcentaje entre paréntesis se refiere al porcentaje de cepas positivas probadas, el resultado de la prueba está dada en base a esos porcentajes. ♦ ED escaso desarrollo, BD buen desarrollo

Micobacterias no tuberculosas

CEPA	MICROSCOPIA/ Caract. especiales	COLONIA	TEMPERATURA CRECIMIENTO °C			VELOCIDAD CRECIMIENTO	FORMACIÓN DE PIGMENTO OBS/LUZ	PIRU- VATO*	NIACI- NA	NITRA- TO	CAT 68°C	CATALASA SQ	HIDRO LISIS T80	TELU- RITO	HIE- RRO	ARILSULFA- TASA	NACL 5%	MAC- CONCKEY	UREA	PZA
			35	25	42															
<i>M. kansasii</i>	No crece a 45°C	Lisa rugo /lisa	+		+	LENTO	-/+ (96)		-(4)	+(99)	+(91)	>45 (93)	+(99)	-/+ (31)	-	-(0)	-(0)	-	-/+ (49)	-
<i>M. marinum</i>	Se confunde con <i>M. kansasii</i>	Lisa/ lisa rugosa	+	+		LENTO	-/+ (100)		-/+ (21)	-(0)	-(30)	<45	+(97)	-/+ (39)	-	-/+ (41)	-(0)	-	+(83)	+
<i>M. simiae</i>		Lisa	+	+		LENTO	-/+ (90)		+/- (63)	-(28)	+(95)	>45(93)	-(9)	+(82)	-	-(0)	-(0)		+/- (69)	+
<i>M. asiaticum</i>		Lisa	+			LENTO	-/+ (86)		- (0)	-(15)	+(95)	>45(95)	+(95)	- (20)	-	-(0)	-(0)		-(10)	-
<i>M. xenopi</i>	Colonias irregulares con proyecciones en bastón, se confunde con <i>M. avium</i>	Lisa			+	LENTO			-	-	-/+	<45	-	-	+				-	
<i>M. goodnae</i>		Lisa	+			LENTO	+/ (99)		- (0)	-(1)	+(96)	>45(90)	+(100)	-(29)	-	V	-(0)	-	V (31)	-/+
<i>M. scrofulaceum</i>	Se confunde con <i>M. avium</i>	Lisa	+		+	LENTO	+/ (97)		- (0)	-(5)	+(94)	>45(84)	- (2)	+/- (64)	-	V	-(0)	-	V (31)	+/-
<i>M. szulgai</i>		Lisa o rugosa	+			LENTO	+/- 37° (93) -/+ 25° (93)		- (0)	+(100)	+(93)	>45(98)	-/+ (49)	+/- (53)	-	V	-(0)	-	+(72)	+
<i>M. flavescens</i>		Lisa	+			LENTO	+/ (100)		- (0)	+(92)	+(100)	>45(94)	+(100)	-/+ (44)	-	-(0)	+/- (62)	-	+(72)	+
<i>M. Intermedium</i>	Cocobacilo	Lisa	+	+	+	LENTO (2 semanas LJ)	-/		-	-	+	>45	+	ND	ND	+ 10 D	ND		+/-	-
<i>M. lentiflavum</i>	Cocobacilos, colonias amarillas palidas, muy pequeñas	Lisa	+	+		LENTO (3-4 semanas)	-/			-	+/-	<45	-	ND	ND	- 10 D - 3D	ND		-	+/-
<i>M. interjectum</i>	Cocobacilo, colonias amarillas o con variante blanca	Lisa	+			LENTO	+/ +		-	-	+	V <45	-	ND	ND	V -	ND		+	+
<i>M. bohemicum</i>	Pequeñas de 1-2 mm de diámetro	Lisa	+	+	+	LENTO	+/ +		-	-	+	<45	-	ND	ND	- 10 D - 3 D	-		Debil +/-	-
<i>M. botniense (solo ambiental)</i>	Se confunden con <i>M. xenopi</i> , crecen mejor en LJ que en M7H10	Planas lisas	+		+	LENTO (5 a 8 semanas)	AMARILLAS + / +			-	-	<45	-			+			-	
<i>M. cookii</i>	Bacilos en bastón	Lisas		+		LENTO	AMARILLA-NARANJA + / +			-	ND	ND	-			+			-	
<i>M. hiberniae</i>	Cocobacilos	Rugosas con el tiempo	+	+		LENTO	ROSADAS +/ +			+	+	>45	V			-			-	
<i>M. hoderi</i>		Lisa/rugosa	+	+		RAPIDO	+/ +			-	ND	ND	+			ND	ND	ND	+	
<i>M. frederiksbergense</i>		Lisas		+		RAPIDO (5 a 7 días)	AMARILLO CADMIO +/ +			+	ND	ND	+			ND	ND	-	-	
<i>M. chlorophenicum</i>	Cocoides, bacilos enramados que se fragmentan	Mucoides	+	+		RAPIDO (1 semana)	AMARILLANARANJA +/ +			-	ND	ND	ND			+	+	ND	ND	
<i>M. madagascariense</i>		Lisas	+	+		RAPIDO	AMARILLANARANJA +/ +			-	ND	ND	+			+	-	-	+	
<i>M. murale</i>	Cocobacilos	Lisas	+	+		RAPIDO	AMARILLO AZAFRANADO +/ +			-	+/-	ND	+			+	-	-	+	
<i>M. vanbaalenii</i>		Lisas	+	+		RAPIDO	AMARILLO AZAFRANADO +/ +			+	ND	ND	+			+	ND	ND	+	

♣ El signo de más y menos indican la presencia o ausencia, respectivamente, de la característica: los espacios en blanco indican que no hay información o no está disponible sobre esa característica en particular; V es variable, +/- es usualmente presente, -/+ usualmente ausente. ND no determinada. El porcentaje entre paréntesis se refiere al porcentaje de cepas positivas probadas, el resultado de la prueba está dada en base a esos porcentajes.

♦ ED escaso desarrollo, BD buen desarrollo

CEPA	MICROSCOPIA/ Caract especiales	COLONIA	TEMPERATURA CRECIMIENTO °C			VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	FORMACIÓN DE PIGMENTO OBS/LUZ	PIRU- VATO*	NIACI- NA	NITRA- TO	CAT 68°C	CATALASA SQ	HIDRO LISIS T80	TELU- RITO	HIE- RRO	ARILSULFA- TASA	NACL 5%	MAC- CONCKEY	UREA	PZA
			35	25	42															
<i>M. fortuitum (3)</i>	Citrato -	Rugosa/lisa		+	+	RAPIDO	-/ (100)	-	+(100)	+(90)	>45 (93)	-/+ (43)	+(92)	+	+(97)	+(85)	+	+(70)	-	
<i>M. chelonae</i>	Citrato+. No crece en NaCl ni en McConkey	Lisa/rugosa		+		RAPIDO	-/ (100)	-/+	-(1)	+/- (53)	>45 (92)	-/+ (39)	+(89)	-	+(95)	V	+	+(89)	-	
<i>M. abscessus</i>	Citrato -	Lisa/rugosa		+		RAPIDO	-/-	-	-		>45	V		-	+	+/-	+	+	-	
<i>M. mucogenicum</i>	Parcialmente ZN+, se confunde con <i>M. chelone</i>	Lisa mucoides	+	-/+		RAPIDO (2 a 4 días)	-/-	-	V	-	<45	+			+	-	+	+	-	
<i>M. smegmatis</i>		Lisa/rugosa		+		RAPIDO	+/+ (50)	-	+(95)	-	<45(82)	+	+	+(100)	- (0)	+	+(100)		-	
<i>M. septicum</i>	Pleomórficos mas cocobacilares	Rugosa/lisa	+	-/+		RAPIDO (<1 semana)	BEIGE -/ (100)	-	+	ND	ND	ND	ND	+	V	+	+	ND	ND	
<i>M. senegalense</i>		Rugosa		+		RAPIDO	-/-	-	+	ND	ND	ND	+	-	+	+		+	ND	
<i>M. immunogenum</i>	Bacilos curvos	Rugosa/lisa	+			RAPIDO (<1 semana)	-/ (10)	-	-(100)	ND	ND	ND	ND	-(100)	+(100)	-	+	ND	ND	
<i>M. wolinskyi</i>	Se confunde con <i>M. smegmatis</i>	Lisa a mucoides	+	+	+	RAPIDO (2-4 días)	-/ (100)	-	+(100)	-/+ (100)	<45(89)	ND	ND	+	- (5)	+(100)		ND	ND	
<i>M. goodii</i>	Se confunde con <i>M. smegmatis</i>	Lisa mucoides/ rugosa	+	-/+	+	RAPIDO	-/ <7 días (78) AMARILLO +/ 7- 10días M7H10	-	+(100)	-(7)	<45(50)	ND	ND	+	- (0)	+(88)	+	ND	ND	
<i>M. mageritense</i>	Bacilos largos fuertemente ZN+ forma de bastón	Lisa mucoides/ rugosas	+	+	+	RAPIDO (2 a 5 días)	-/ (100)	ND	+(70)	-(0)	ND	- (100)	ND	+(40)	+(80)	+(80)	+	+(60)	+(100)	
<i>M. alvei</i>	Bacilos cortos, fuertemente ZN+	Grandes y rugosas	+	+		RAPIDO (2 semanas 37°C)	- / -		+	+	ND	+			+	-	-	+		
<i>M. brumae</i>		Grandes y rugosas	+	+		RAPIDO (4 o 5 días)	- / -		+	+	ND	+			-	-	-	+		
<i>M. confluentis</i>	Cocobacilos, las colonias después de 2 meses cambian de café a negras	Lisas	+	+	+	RAPIDO (2 a 4 días)	- / -		+	+	>45	-			-	-	-	+		
<i>M. holsaticum</i>	Cococido a 20°C, las colonias son disgónicas, pueden verse amarillas con el tiempo	Lisas y húmedas	+	+	+	RAPIDO (1 semana)	- / -		+	-	ND	V			-	+	-	+		
<i>M. phlei</i>		Rugosa		+		RAPIDO	+/+	-	+	+	>45	+	+	+	-	+	-		-	
<i>M. vaccae</i>		Lisa		+		RAPIDO	+/+	-	+	+	>45	+	+	+	-	V	-		-	
<i>M. elephantis</i>	Cocobacilos teñidos débilmente		+	+	+	RAPIDO	AMARILLO + / +		+	+	>45	+			-	+	-	+		
<i>M. hassiacum</i>	Crece a 65°C y la colonia es seca	Lisas, húmedas	+		+	RAPIDO (2 a 6 días)	+ / +		-	+	>45	-			-	+	-	+		
<i>M. novocastrense</i>	La consistencia de la colonia es butirácea	Lisas	+	+	+	RAPIDO	- / +		+	+	>45	+			+	+	+/-	+		

♣ El signo de más y menos indican la presencia o ausencia, respectivamente, de la característica; los espacios en blanco indican que no hay información o no está disponible sobre esa característica en particular; V es variable, +/- es usualmente presente, -/+ usualmente ausente. ND no determinada. El porcentaje entre paréntesis se refiere al porcentaje de cepas positivas probadas, el resultado de la prueba está dada en base a esos porcentajes.

♦ ED escaso desarrollo, BD buen desarrollo

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Dawson, D. J. 2000. Mycobacterial terminology. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3913
- [2] Eaton, T., J. O. Falkinham 3rd, and C. F. von Reyn, 1995. Recovery of *Mycobacterium avium* from cigarettes. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2757-2758
- [3] Collins, C. H., J. M. Grange, and M. D. Yates. 1984. A review: mycobacteria in water. *J. Appl. Bacteriol.* **57**:193-211
- [4] Pfyffer, E. G., Brown-Elliott A. B., Wallace R. Jr. *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures*, 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition, United States of America, ASM Press, pag 532-552.
- [5] Engbaek, H. C., B. Vergmann, and B. Weis Bentzon. 1967. The sodium lauryl sulphate method in culturing sputum for mycobacteria. *Scand. J. Respir. Dis.* **48**: 268-284
- [6] Kamala, T., C. N. Paramasivan, D. Herbert, P. Venkatesan, and R. Prabhakar, 1994. Evaluation of procedure for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1021-1024
- [7] Parashar, D., D. S. Chauhan, V. D. Sharma, A. Chauhan, S.V.S. Chauhan and V. M. Katoch. 2004. Optimization of Procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in Northern India. *Am. Soc. Microbiol.* **70**:3751-3753
- [8] du Moulin G. C., K. D. Stottmeier, 1978. Use of cetylpyridinium chloride in the decontamination of water for culture of mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:771-773
- [9] Smithwick, R. W., Stratigos, C. B., David, H. L. 1975. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **1**:411-413
- [10] Marsollier L., T. Stinear, J. Aubri, J. P. Saint André, R. Robert, P. Legas, A. L. Manceau, C. Audrain, C. Bourdons, H. Kouakou, B. Carbonnelle. 2004. Aquatic plant stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in environment. *Appl Environ. Microbiol.* **70**:1097-1103
- [11] Gruffth H., J. O. III Falkinham, B. C. Parker. 1981. Recent experience in the epidemiology of disease caused by atypical mycobacteria. *Rev Infect Dis*, **3**(5):990-996
- [12] Steinert M., K. Birkness, E. White, B. Fields, F. Quinn. 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive with cyst walls. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2256-2261
- [13] von Reyn, C.F., R. D. Waddell, T. Eaton, R. Arbeit, J. N. Maslow, T. W. Barber, R. J. Brindle, C.F. Gilks, J. Lumio, J. Lahdevirta, A. Ranki, D. Dawson, and J. O. Falkinham III. 1993. Isolation of *Mycobacteria avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire and Kenya. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3227-3230
- [14] Koneman Elmer W, Allen Stephen D., Dowell V. R., Sommers Herbert M. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color.* Editorial Médica Panamericana. México 1989. págs 100-103, 137-140
- [15] Hillebrand-Haverkort, M. E., A. H. Kolk, L. F. Kox, J. J. Ten Velden, and J. H. Ten Ven. 1999. Generalized *Mycobacterium genavense* infection in HIV-infected patients: detection of the mycobacterium in hospital tap water. *Scand. J. Infect. Dis.* **1**:63-68

- [16] Freeman, A., J. Lockey, P. Hawley, P. Biddinger, and D. Trout. 1998. Hypersensitivity pneumonitis in a machinist. *Am. J. Ind. Med.* **34**:387-392
- [17] Lummus, Z. L., J. E. Lockey, and I. L. Bernstein. 1998. Microbial flora of metalworking fluids associated with occupational respiratory disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1**:166
- [18] Muilenberg, M. L., H. A. Berge, and T. Sweet. 1993. Hypersensitivity pneumonitis and exposure to acid-fast bacilli in coolant aerosols. *J. Allergy Clin. Immunol.* **91**:311
- [19] Shelton, G. B., W. D. Flanders, and K. G. Morris. 1999. Mycobacterium sp. As a possible cause of hypersensitivity pneumonitis in machine workers. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:270-273
- [20] Wallace, R. J. Jr., Y. Zhang, R. W. Wilson, L. Mann, H. Rossmore. 2002. Presence of a single genotype of the newly described species Mycobacterium immunogenum in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5580-5584
- [21] Carson L. A., L. B. Cusick, L. A. Bland and M. S. Favero. 1988. Efficacy of chemical design methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1756-1760
- [22] Duvall CW. 1908. Studies in atypical forms of tubercle bacilli isolated directly from the human tissues in cases of primary cervical adenitis. *J Exp Med.* **9**:403-29
- [23] Pinner M. 1935. Atypical acid fast microorganisms. *Am Rev Tuberc* 1935: **32**:424-45
- [24] Katoch V. M. 2004. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J. Med. Res.* **120**:290-304
- [25] Falkinham J. O. III. 2003. Mycobacteril aerosols and respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases.* **9**:763-767
- [26] Vestal AL. 1977. Identification test techniques. In: Procedure for isolation and identification of mycobacteria. Atlanta Georgia: US Department of Health. Education and Welfare Publication (CDC 77-8230), p 65-89
- [27] Katoch VM, Sharma VD. 1997. Advances in the diagnosis of mycobacterial infections. *Indian J Med Microbiol.* **15**:49-55
- [28] Kiehn T. E., F. F. Edwards, P. Brannon, A. Y. Tsang, M. Mary, W. H. G. Jonathan et al.. 1985. Infections caused by MAC in immunocompromized patients, diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics. *J. Clin. Microbiol.* **21**:168-73
- [29] Corbett E. L., L. Blumberg, G. J. Chuchyard, N. Moloj, K. Mallory, T. Clayton, B. Williams, R. E. Chaisson, R. J. Hayes, K. M. de Cock.1999. Nontuberculous Mycobacteria. Defining disease in a prospective cohort of south African miners. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**:15-21
- [30] Sharma V. D., V. M. Datoch, C. T. Shivannavar, U. D. Gupta, R. K. Sharma, V. P. Bharadwaj, et al. 1995. Protein and isoenzyme patterns of mycobacteria I. Their role in identification of rapidly growing mycobacteria. *Indian. J. Med. Microbiol.* **13**:115-118
- [31] Sharma V. D., V. M. Katoch, C. T. Shivannavar, U. D. Gupta, R. K. Sharma, V. P. Bharadwaj, et al. 1995. Protein and isoenzyme patterns of mycobacteria. II. Their role in identification of slowly growing mycobacteria. *Indian. J. Med. Microbiol.* **13**:119-23
- [32] Wayne L. G., G. A. Diaz. 1979. Reciprocal immunological distances of catalase derived from strains of *M. avium*, *M. tuberculosis* and related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**:19-24
- [33] Shivannavar C. T., V. M. Katoch, V. D. Sharma, M. A. Patil, K. Katoch, V. P. Bharadwaj, et al. 1996. Development of SOD ELISA to determine immunological relatedness among mycobacteria. *Int. J. Lepr.* **64**:58-65

- [34] Covert, T. C., M. R. Rodger, A. L. Reyes, G. N. Jr. Stelma. 1999. Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol.* **65**:2492-2496
- [35] Lumb R., R. Stapledon, A. Scroop, P. Bond, D. Cunliffe, A. Goodwin, R. Doyle, I. Bastian. 2004. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by Mycobacterium avium complex in immunocompetent adults. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4906-4910
- [36] Zakowski, P., S. Fligiel, G. W. Berlin, and L. Johnson, Jr. 1982. Disseminated Mycobacterium avium-intracellulare infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* **248**:2980-2982
- [37] Falkinham, J. O., III. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:177-215
- [38] Primm T. P., C. A. Lucero, J. O. III Falkinham. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **17**:98-106
- [39] Le Dantec C, Duguet J. P., Montiel A., Dumoutier N., Dubrou S. And Vincent V. 2002. Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. *Appl Environ Microbiol* **68**:5318-5325
- [40] Torvinen E, S. Suomalainen, M. Lehtola, I. T. Miettinen, O. Zacheus, I. Paulin, M. L. Katila. 2004. Mycobacteria in Water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl Environ Microbiol* **70**:1973-1981
- [41] Kamala T, C. N. Paramasivan, D. Herbert, P. Venkatesan, R. Prabhakar. 1994. Isolation and identification of environmental micobacteria in the Mycobacterium bovis BCG Tial Area of South India. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2180-2183
- [42] Silcox V.A, Good C. R, Floyd M.M. 1981. Identification of clinically significant Mycobacterium fortuitum complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* **14**:686-691
- [43] Miller, N., S. Infante, T. Cleary. 2000. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:1915-1919.
- [44] Suffys, P. N., A. Da Silva Rocha, M. de Oliveira, C. E. Días Campos, A. M. Werneck Barreto, F. Portales, L. Rigouts, G. Wouters, G. Jannes, G. Van Reybroeck, W. Mijs, and B. Vanderborcht. 2001. Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4477-4482
- [45] Makinen, J., A. Sarkola, M. Marjamaki, M. K. Viljanen, and H. Soini. 2002. Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3478-3481
- [46] Tortoli E., A. Mariottini, G. Mazzarelli. 2003. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4418-4420
- [47] Picardeau, M., G. Prod'Hom, L. Raskine, M. P. LePennec, and V. Vincent. 1997. Genotypic characterization of five subspecies of Mycobacterium kansasii. *J. Clin. Microbiol.* **35**:25-32
- [48] Phillips, B. J., and W. Kaplan. 1976. Effect of cetylpyridinium chloride on pathogenic fungi and Nocardia asteroides in sputum. *J. Clin. Microbiol.* **3**:272-276
- [49] Sepúlveda A., García-Martos P., Rodríguez M.J., Márquez A., Puerto J.L., Saldarreaga A. Evaluación del medio de Stonebrink para la recuperación de micobacterias. *Rev Diagn Biol* v.50 n.4 Madrid oct.-dic. 2001

- [50] Atlas Ronald M. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1993, United States of America. pag. 52, 91, 313,314, 401,519-521, 592-600, 633-635, 705, 706, 734,754, 791, 804, 805, 846, 847, 984
- [51] Jones J.J., J.O. III Falkinham. 2003. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **47**:2323-2326
- [52] Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou, and V. Vincent. 2002. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1025-1032
- [53] Tortoli E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiol. Reviews*. **16**:319-354
- [54] Roth A, M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, H. Mauch. 1998. Differentiation of Phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**:139-147
- [55] J. P. Euzéby's List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>)
- [56] Carson L. A., N. J. Petersen, M. S. Favero, S. M. Aguero. 1978. Growth characteristics of atypical micobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl. Environ Microbiol.* **36**:839-846
- [57] Brown-Elliott B., R. J. Jr. Wallace. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Reviews*. **15**:716-746
- [58] Vincent V., B. Brown-Elliott, K. C. Jr. Jost, R. J. Jr. Wallace. 2003. Mycobacterium: phenotypic and genotypic identification. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition, United States of America, ASM Press, pag 560-584.
- [59] Sander P., M. Rezwan, B. Walker, S. K. Rampini, R. M. Kroppenstedt, S. Ehlers, C. Keller, J. R. Keeble, M. Hagemeyer, M. J. Colston, B. Springer and E. C. Bottger. 2004. Lipoprotein processing is required for virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*. **52**(6): 1543-1552
- [60] Fenton M. J. and M. W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. *Infection and Immunity*. **64**:683-690
- [61] Curso de Microbiología General de Enrique láñez. Acción de los agentes químicos sobre las bacterias (www.adoxaweb.com)
- [62] Taylor R. H., J. O. III Falkinham, C. D. Norton, Chevallier M. W. 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1702-170