

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

MICOBACTERIAS EN EL AGUA PARA EL USO Y CONSUMO
HUMANO EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE
MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M. EN C. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL

Directora de Tesis: Dra. Yolanda López Vidal

México, D.F. 2012



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.

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 284ª del 03 de agosto del 2011, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL**, con número de cuenta **9980979-3** con la tesis titulada **"MICOBACTERIAS EN EL AGUA PARA EL USO Y CONSUMO HUMANO EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MEXICO"** dirigida por la Dra. Yolanda López Vidal.

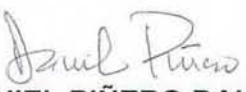
Presidente: Dra. Elva Escobar Briones
Secretario: Dra. Yolanda López Vidal
Vocal: Dr. Samuel Ponce de León Rosales
Vocal: Dra. Clara Inés Espítia Pinzón
Vocal: Dra. Luisa I. Falcón Álvarez

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, a 02 de marzo de 2012.



DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA



DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p. Dr. Manuel Enrique Vázquez Valdés, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dra. Yolanda López Vidal.
Coordinación de PDCB
DPD/YLV/evb

La presente investigación se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal en el programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas.

El trabajo contó con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA) a través del proyecto de investigación PAPIIT-IN227611, CONACyT SALUD2007-COI-68729 y 60577M.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo 2003-2007 (130055) y por CONACyT 60577M.

Saber no es suficiente, debemos aplicar

Desear no es suficiente, debemos hacer

Johann W. Von Goethe

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial

Dra. Yolanda López Vidal

Dra. Marisa Mazari Hiriart

Dr. Juan José Calva Mercado

A los miembros del jurado

Dra. Elva Escobar Briones

Dra. Yolanda López Vidal

Dr. Samuel Ponce de León Rosales

Dra. Clara Espitia Pinzón

Dra. Luísa Falcón Álvarez

DEDICATORIAS

A Díos
por darme todo lo que tengo

Para Alejandra, Paola y Adriana
Por ser el impulso a mi superación, el balsamo
en momentos adversos y la alegría de mi corazón

A Luís
Por estar en esos momentos que ocuparon mi tiempo, por dar, por ser

A mis padres, hermanos y hermanas
Por su calidez y enseñanza en la perseverancia
para conseguir los objetivos

A todo mi grupo PIMM del laboratorio
Por su compañerismo, permanente disposición y
valiosas críticas de este trabajo

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice general	X
Índice de figuras	XIII
Índice de Mapas	XVI
Índice de tablas	XVIII
Abreviaturas	XX
Resumen	XXII
Abstract	XXIII
Introducción	1
Características generales de las MNT	2
Clasificación de las MNT	7
Clasificación clínica de las MNT	8
Patogénesis de MNT	10
Factores de persistencia	12
Pared celular de Micobacterias	13
Epidemiología	14
Micobacterias no tuberculosas en agua	17
Métodos de recuperación de MNT	21
Identificación de MNT	22
Justificación	31
Objetivo general	33
Objetivos particulares	34
Material y métodos	36

Resultados	53
Discusión	72
Conclusiones	83
Perspectivas	86
Referencias	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Microfotografía de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR= teñidos con la técnica de Ziehl Neelsen aislados de agua de reuso de los canales de Xochimilco a 100X.	4
Figura 2. Fotografías de colonias de cultivos de MNT en medio Middlebrook 7H10 aisladas de agua de reuso donde se observan diferencias en la morfología colonial macroscópica y en el pigmento.	5
Figura 3. Crioelectromicroscopía de la pared celular micobacteriana, en la figura 3a se observa una criosección de <i>M. bovis</i> BCG y en la figura 3b una crioelectro tomografía.	14
Figura 4. En la figura del lado derecho se observa una esquema del gen <i>16S</i> RNAr mientras que en la del lado izquierdo la secuencia del gen.	26
Figura 5. Esquema del fragmento del gen <i>hsp65</i> .	27
Figura 6. Esquema que muestra la forma del gen <i>rpoB</i> .	28
Figura 7. Fotografía de colonias de especies de MNT aisladas de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano.	57
Figura 8. Fotografía de especies de MNT aisladas de agua de uso y consumo humano.	59
Figura 9. Medio Lowestein Jensen con crecimiento de colonias micobacterianas de diferente tamaño, forma y color.	60
Figura 10. Microfotografía de morfología microscópica de BAAR diferentes teñida con Ziehl Neelsen de cultivos positivos de muestras de agua, 100x.	61
Figura 11a y 11b. Perfiles de los fragmentos de restricción con las enzimas <i>BstEII</i> y <i>HaeIII</i> de las micobacterias no tuberculosas (MNT) a partir de la amplificación <i>groELII</i> (<i>hsp65</i>) Gel 1, cepas 2, 4, 7, 8, 13, 18, 27; B. gel 2, cepas 36, 48, 53, 62, 85, 95, 96. Carriles nones, enzima <i>BstEII</i> , carriles pares enzima <i>HaeIII</i> , carril 15 marcador de peso molecular 50 pb, carril 16 marcador de peso molecular 100 pb.	62
Figura 12. Filogenia de máxima similitud de la secuencia casi completa del gen <i>16S rRNA</i> recuperada a través del modelo GTR+G+I que mostró una inferencia de relación de los 14 aislados del medio ambiente con el uso de 131 secuencias de referencia de <i>Mycobacterium</i> y 8 secuencias de otros grupos que fueron <i>Gordonia</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Rhodococcus</i> y <i>Tsukamurella</i> . La mayoría de los clados se presentan de forma colapsada.	67

Figura 13. Árbol filogenético con base al gen *hsp65*

68

Figura 14. Árbol filogenético con base al gen *rpoB*.

69

ÍNDICE DE MAPAS

	Página
Mapa 1. Señala la localización de las dos áreas geográficas estudiadas (Río Cuitzmala en el estado de Jalisco y Sistemas de distribución de agua y agua de reuso en la ZMCM).	38
Mapa 2. Área geográfica que muestra el río Cuitzmala, la reserva ecológica y los puntos de muestreo. Estado de Jalisco.	40
Mapa 3. Señala los sitios de muestreo de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano en la ZMCM.	41
Mapa 4. Canales de Xochimilco representativos de agua superficial de reuso para riego, los puntos rojos señalan los sitios de muestreo.	42

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de Runyon.	8
Tabla 2. Clasificaciones clínicas de MNT por tejido afectado.	9
Tabla 3. Características físicoquímicas, indicadores de contaminación microbiológica.	54
Tabla 4. Aislamiento de MNT en agua de los sistemas de distribución.	56
Tabla 5. Aislamiento de MNT en agua de reuso para riego.	58
Tabla 6. Identificación de MNT por PCR-PRA.	63
Tabla 7. Identificación de MNT por MLSA (<i>16S RNA</i> , <i>hsp65</i> y <i>rpob</i>).	64

ABREVIATURAS

MNT	Micobacterias no tuberculosas
ZMCM.	Zona Metropolitana de la Ciudad de México
MLSA	Análisis de secuencias multilocus
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
MOTT	Otras Micobacterias diferentes a tuberculosis
PPEM	Micobacterias ambientales potencialmente patógenas
CDC	Centro de Control de Enfermedades
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ATS/IDSA	Sociedad Americana de Tórax/Sociedad Americana de Enfermedades infecciosas
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados
PVC	Polivinilcarbonato
UFC	Unidades formadoras de colonia
NaOH	Hidróxido de sodio
SDS	Laurilsulfato de sodio
CPC	Cloruro de cetilpiridinium
pb	Pares de bases
M-FC	Medio de cultivo específico para crecimiento de <i>E. coli</i>
Agar K-F	Medio de agar específico para enterococos fecales
SSIE	Solución salina isotónica estéril
LJ	Lowestein-Jensen
APHA	Asociación Americana para la salud pública
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
BAAR	bacilo alcohol resistentes
ATCC	American Type Culture Collection
PRA	Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción
BLASTN	Alineamientos en una Base Local
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NOM	Norma Oficial Mexicana
KCl	Cloruro de potasio
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
dNTPs	Desoxiribonucleótidos trifosfatos
Tris-boratos-EDTA	Hidroximetil-ácido etilendiaminetetracético
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

RESUMEN Y ABSTRACT

Investigamos la presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en tres sistemas acuáticos mexicanos para evaluar la prevalencia y distribución de las especies de MNT. En las muestras de agua se evaluaron diferentes parámetros físicoquímicos en búsqueda de una correlación con la distribución de MNT. Así mismo, se determinaron las afiliaciones taxonómicas por medio de la secuenciación de los fragmentos *hsp65*, *rpoB* y *16S rRNA*. Las MNT se recuperaron de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano y de agua de reuso para riego de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM). Las especies aisladas fueron asociadas a temperatura de 21°C y pH >7.7. El análisis filogenético mostró que ocho de las 14 especies aisladas fueron clasificadas sin ambigüedad: *M. peregrinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. arupense*, *M. gordonae* y *M. chitae*. Una cepa fue tentativamente identificada como *M. manteni*/*M. scrofulaceum* y otra cepa se relacionó a *M. porcinum*/*M. septicum*. En agua de reuso para riego se aislaron siete especies mas de las detectadas en los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano. Dos de las especies encontradas en agua de reuso para riego *M. avium* y *M. fortuitum* son consideradas patógenos oportunistas humanos importantes.

We investigated the presence of nontuberculous mycobacteria (NTM) in three Mexican aquatic systems to evaluate the prevalence with the distribution of NTM species. Key physicochemical parameters of the water samples were determined to find correlations with the species' distributions. We used multilocus sequence analysis (MLSA) based on *hsp65*, *rpoB*, and *16S* rRNA fragments to determine their taxonomic affiliations. NTM were recovered from water distribution systems and reclaimed water from the Mexico City Metropolitan Area (MCMA). The isolated species were associated with a temperature of 21°C and pH >7.7. The phylogenetic analysis showed that eight of the 14 different NTM strains were unambiguously classifiable: *Mycobacterium peregrinum*, *M. nonchromogenicum* (2), *M. smegmatis* (2), *M. fortuitum*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. arupense*, *M. gordonae*, and *M. chitae*. One strain was tentatively identified as *M. manteni*/*M. scrofulaceum* and another strain was related to *M. porcinum*/*M. septicum*. All NTM species identified in the water distribution system were also detected in the reclaimed water, but some species from the reclaimed water were not found in the water distribution systems. Two of the identified species found in the reclaimed water, *M. avium* and *M. fortuitum*, are considered important human opportunistic pathogens.

Introducción

Características generales de las micobacterias no tuberculosas

El incremento en el interés por las micobacterias no tuberculosas (MNT) existe en diferentes áreas de la ciencia y algunas de las razones son por las afectaciones importantes que ocasionan en la salud (Griffith 2010), por la gran variedad de especies aisladas del medio ambiente (Tortoli 2006), así como por su intervención en el medio ambiente en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), contaminantes orgánicos cancerígenos y mutagénicos que se encuentran en altas concentraciones en el medio ambiente, en especial alrededor de industrias antiguas productoras de gas (Leys 2005)(Miller 2004).

El enfoque al estudio de las MNT en este trabajo es dirigido a la búsqueda de MNT en ambientes acuáticos en México que pueden ser causantes de colonización y eventualmente enfermedad en la población. Un incremento importante en las infecciones por MNT se ha reportado a nivel mundial ocasionando gran variedad de síndromes clínicos tanto en personas con alguna deficiencia inmunológica como en personas sin un aparente problema de salud (Kim 2008; Piersimoni 2009; Amorim 2010; Colombo 2010). México no es la

excepción, en los años noventa Molina-Gamboa *y col.* reportaron que el 30% de infecciones por micobacterias aisladas de pacientes con inmunodeficiencia adquirida fueron por MNT y mas del 50% no fue identificada a nivel de especie ya que no existían aún herramientas de diagnóstico molecular ni tenían la importancia con la que cuentan actualmente (Molina-Gamboa 1996).

Las micobacterias son una familia de bacilos rectos o ligeramente curvos clasificados dentro de tres grupos principales: 1) *Mycobacterium tuberculosis*, 2) *Mycobacterium leprae* y las Micobacterias no Tuberculosas (MNT). Las MNT pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae* y constituyen el grupo mas grande de la misma, forman parte del género *Mycobacterium* contenido en el orden de los Actinomycetales. Los reportes de infecciones por MNT en el humano son inexistentes a través de su historia. Los informes mas recientes e únicos datan de alrededor de medio siglo por lo que los estudios tanto clínicos como de gabinete y laboratorio se comparan con los de la tuberculosis. La existencia de las MNT se reportó poco tiempo después de que Robert Koch descubriera el agente etiológico de la tuberculosis (1882).

Las MNT identificadas como diferentes a las micobacterias patógenas fueron consideradas por mucho tiempo como saprófitas, es decir, organismos de vida libre aisladas de diferentes fuentes del medio ambiente como suelo,

vegetación, animales, protozoarios y agua entre otros. Por microscopía, son bacilos rectos o ligeramente curvos (0.2 a 0.6 μm de ancho por 1.0 a 10 μm de largo). La mayoría son microorganismos aerobios aunque algunas especies requieren ambientes microaerofilicos, no presentan movimiento, no forman esporas, son polimórficos y algunas especies retienen mayor colorante que aparentan tener gránulos citoplásmicos (Figura 1).

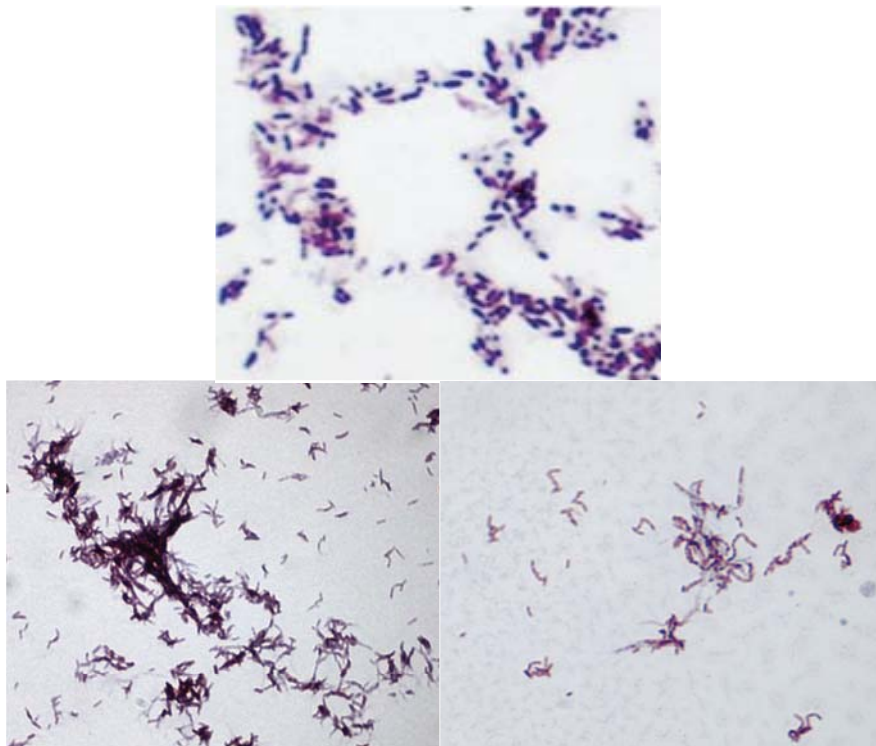


Figura 1. Microfotografía de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), teñidos con la técnica de Ziehl Neelsen, aislados de agua de reuso de los canales de Xochimilco (100X).

La mayoría de las especies de MNT crece fácilmente en medios relativamente simples con excepción de *M. haemophilum* y *M. genavense*,

micobacterias de requerimientos nutricionales exigentes que utilizan micobactina, hemina u otros compuestos de hierro; la temperatura óptima para su crecimiento varía de 30°C a 40°C y ocasionalmente, se observa crecimiento a temperaturas mas elevadas o mas bajas (Versalovic 2011).

Las MNT se caracterizan por presentar una morfología colonial diferente según la especie cuando se crecen en medio sólido Middlebrook 7H10 o 7H11. Se observan diferentes tamaños en las colonias, son lisas o rugosas, pigmentadas o sin pigmento, que depende de la producción de compuestos carotenoides secretados por las bacterias para protegerse de condiciones adversas (estrés); (Versalovic 2011) (Figura 2).

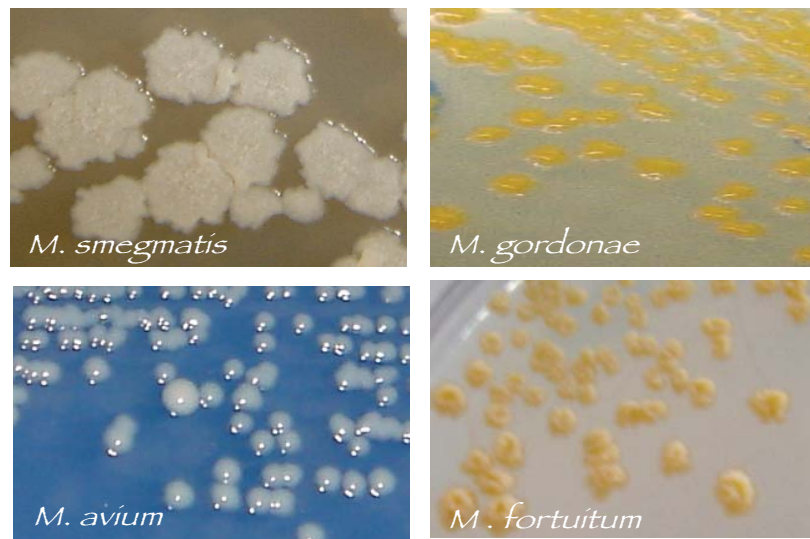


Figura 2. Fotografías de colonias de cultivos de MNT en medio Middlebrook 7H10 aisladas de agua de reuso donde se observan diferencias en la morfología colonial macroscópica y en el pigmento.

Las MNT recibieron diferentes nombres a lo largo del tiempo, en 1899, Moeller las denominó "bacilos pseudotuberculosos"; Borrel y Marmoreck (1901), las llamaron "bacilos paratuberculosos", Pinner, (1932), y Tímpe y Runyon, (1954), emplearon los términos "micobacterias atípicas", Hauduroy, (1955) como "micobacterias anormales"; Runyon (1959), "micobacterias anónimas", Corpe Runyon y Lester (1963), "micobacterias inclasificadas"; en 1963, Mattheus les denomina MOTT (*Mycobacteria other than tubercule bacilli*); en 1969, Marks y Selkon las denominan "micobacterias oportunistas"; Wolinsky, (1979), "micobacterias no tuberculosas"; Wayne y Sramek, (1992), PPEM (Micobacterias ambientales potencialmente patógenas) y Ruíz y col. (1998), "Micobacterias ambientales".

Desde el año 2006 la Sociedad Americana de Tórax acuñó el nombre de micobacterias no tuberculosas, terminología que aunque es una de las mas utilizada aún no está aceptada a nivel internacional (Griffith 2007). En 1890 se reconoció por primera vez que las MNT eran micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* aunque su potencial patógeno fue reconocido hasta el inicio del siglo XIX al identificar a *Mycobacterium avium* como la especie responsable de infectar aves. En esta época aún no eran reconocidas como causantes de enfermedad en el humano ya que al ser inoculada la bacteria al cobayo éste no presentó la

enfermedad típica que presentaba al ser infectado con *M. tuberculosis*. Fue hasta 1909, que fueron reconocidas como causantes de enfermedad en humanos cuando Charles Duval aisló e identificó MNT de pacientes infectados (Duval 1907).

Clasificación de MNT

Las MNT se clasificaron de formas diferentes a los largo del tiempo, el botánico Ernest Runyon en 1959, las clasificó en cuatro grupos, la clasificación de Runyon se basa en la velocidad de crecimiento, producción de pigmento en la luz o en la oscuridad y características fenotípicas. Con base a ésta clasificación se agrupan en cuatro categorías; del grupo I al III son micobacterias de lento crecimiento (colonias visibles posterior a los 7 días del inóculo) y el grupo IV son micobacterias de rápido crecimiento (colonias visibles de 3 a 5 días). La clasificación de Runyon sigue siendo utilizada para clasificar a las MNT en categorías (Tabla I).

Tabla 1. Clasificación de Runyon		
Runyon I	Fotocromógenas (crecimiento lento)	<i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium marinum</i>
Runyon II	Escotocromógenas (crecimiento lento)	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium gordonae</i> <i>Mycobacterium szulgai</i>
Runyon III	No cromógenas (crecimiento lento)	<i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium xenopi</i> <i>Mycobacterium terrae</i>
Runyon IV	No cromógenas (crecimiento rápido)	<i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i>
La clasificación de Runyon divide a las micobacterias en dos grupos grandes (crecimiento lento y rápido) y en cuatro grupos por su pigmentación		

Murray P., Baron E., Jorgensen J, Pfaller M., Tenover F., Tenover R. 2003 Manual de Microbiología Clínica, 8a edición, Vol 1, pag 532-584, ASM Press.

Clasificación clínica de las MNT

La gran variedad de especies identificadas y la diversidad en la clínica promovió otra clasificación de MNT apoyado en la frecuencia de infecciones por órgano o tejido así como en la frecuencia de especies aisladas, de tal suerte que algunos autores presentaron algunas clasificaciones por tejido afectado como observamos en la Tabla 2 (Wolinsky 1979; Jarzembowski 2008).

Tabla 2. Clasificaciones clínicas de MNT por tejido afectado	
Wolinsky (1979)	Jarzebouski (2008)
Pulmonar	Infección pulmonar crónica
Linfadenitis	Linfadenitis superficial
Tejido blando	Tejido blando y osteoarticular
Huesos y articulaciones	Enfermedad diseminada
Genitourinario	Infección iatrogénica
Diseñinada	
Otras	

1) Estos mismos autores señalan la frecuencia por especie en cada tejido y aunque existe variación entre las especies responsables por tejido y por área geográfica en general presentan gran similitud.

A pesar de todos los intentos por clasificar tanto al grupo de MNT como a la patología que producen en el humano, la ausencia de estudios epidemiológicos sistemáticos, definición de caso estándar e identificación de la especie o subespecie de MNT responsable de la patología entre otras razones ha sido imposible realizarla. La información sobresaliente hasta el momento es que

alrededor del 90% de las infecciones por MNT comprometen al pulmón y el resto a nódulos linfoides, tejido blando y huesos. Muy rara vez el sistema nervioso central, oído u ojo están comprometidos.

Gracias a los avances en las técnicas moleculares el cual inició al principio de los 1990s, la clasificación de las micobacterias basado en las características genotípicas ha incrementado el número de especies y reclasificado taxonómicamente a otras micobacterias, y actualmente se reconocen alrededor de 150 especies (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

Patogénesis de MNT

Las MNT son capaces de infectar animales así como, al humano. La vía de entrada es diversa aunque el órgano mas frecuentemente afectado es el pulmón. El aislamiento de MNT de alguna secreción o tejido no siempre establece el diagnóstico y por lo tanto la enfermedad ya que en muchas ocasiones se considera colonización. Se sabe que la fisiopatología de las MNT es diversa ya que va a depender de la especie y ocurre desde una colonización transitoria, una infección limitada a una diseminada que conduce a la muerte. La respuesta inmune

celular estimulada por las MNT es del tipo TH1 que es una respuesta protectora o la no protectora, la TH2. Se sabe que las primeras células en enfrentar a las MNT son monocitos responsables de su fagocitosis y posterior eliminación. El tema de la patogénesis de las MNT es muy extenso y no es el objetivo de esta tesis por lo que solo señalo que el Centro de Control de Enfermedades (CDC) marca tres observaciones importantes en la patogénesis de MNT:

Los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida presentan infección por MNT diseminada solo posterior a que la cuenta de linfocitos T CD4+ disminuyen por debajo de 500/ μ l que sugiere que los productos de células T se requieran para la resistencia contra la infección por micobacterias.

En el grupo de pacientes sin infección con el virus de la inmunodeficiencia humana las infecciones por MNT se asociaron con síndromes genéticos como mutaciones, alteraciones en la síntesis y vías de señalización de IFN γ e interleucina 12, así como mutaciones en algunos receptores.

Las infecciones pulmonares previas ya sea adquiridas o congénitas, se asocian a un incremento en las infecciones por MNT (Griffith 2007).

Factores de persistencia de las MNT

Las MNT son capaces de sobrevivir en objetos inanimados por semanas o meses en ambientes sin nutrientes y sin luz. Son altamente resistentes a la congelación, a los medios ácidos o alcalinos y menos resistentes a temperaturas superiores a 65°C o luz ultravioleta. Existen reportes de la resistencia de MNT a desinfectantes, esta resistencia es diferente de acuerdo al tipo de desinfectante, concentración del mismo y especie de MNT estudiada. Las MNT presentan resistencia importante a métodos de desinfección comunes como cloro, compuestos de amonio cuaternario, hexaclorofeno, entre otros (LeDantec 2002; Schwartz 2003; Falkinham 2003), así como resistencia a diferentes antibióticos usados de primera elección. La característica principal de su resistencia a condiciones adversas se debe principalmente a su pared celular, barrera hidrofóbica con alto contenido en lípidos, ácidos micólicos, peptidoglicano y arabinogalactana (Falkinham 2009).

Pared Celular de Micobacterias

La pared celular tiene importancia médica porque las distingue de otras bacterias y por sus factores de virulencia, está formada por una membrana plasmática y por una pared celular. La membrana plasmática es muy parecida a las bacterias gram negativas y está cubierta por una capa delgada de peptidoglicano unido covalentemente a D-arabino-D-galactano que es esterificado por ácidos grasos de cadena larga llamados ácidos micólicos. También presentan otros lípidos que forman una bicapa asimétrica con la capa de los ácidos micólicos. Toda esta estructura contiene proteínas que forman poros a través de la bicapa. Esta combinación polímero-peptidoglicano-arabinogalactano y ácido micólico es responsable de la variabilidad y especificidad de las distintas serovariantes antigénicas de las micobacterias (Chatterjee 2009; Niederweis 2010) (Figura 3). En resumen, la capa externa de las micobacterias consiste en una matriz de proteínas y carbohidratos unida a la pared celular que contiene tanto lípidos especie específicos como propios de género. La composición poco frecuente de esta cubierta celular le da un cuadro distintivo a las micobacterias; como el ser limitadas en su permeabilidad, ser resistentes a químicos fuertes como ácidos, álcalis y

cloro, de ahí su característica de ácido-alcohol resistencia a algunas tinciones, a su marcada hidrofobicidad, y a su adhesión a las superficies.

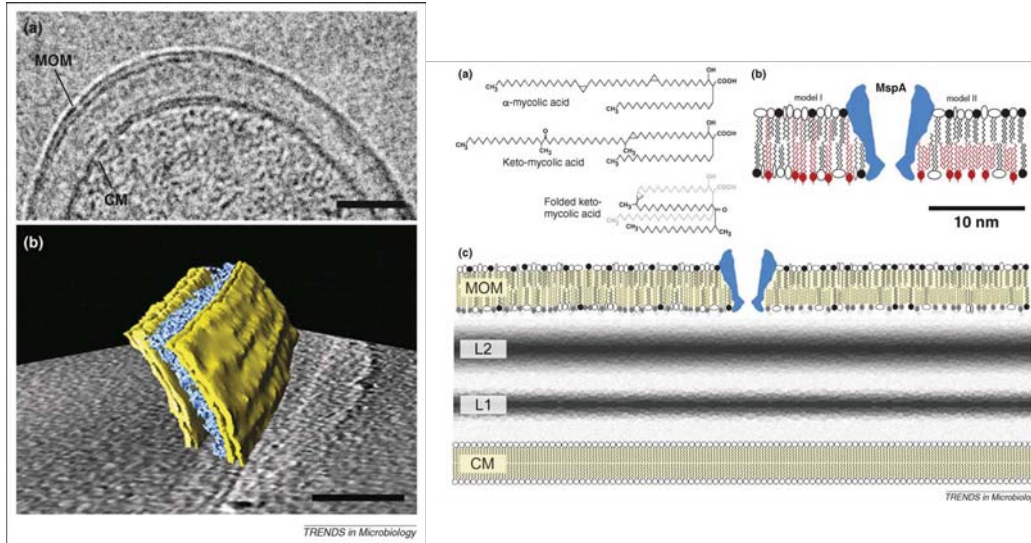


Figura 3. Criolectromicroscopía de la pared celular micobacteriana, en la figura 3a se observa una criosección de *M. bovis* BCG y en la figura 3b una criolectrotomografía. En ambas se observa el espacio periplásmico entre la membrana externa y la membrana citoplásmica donde se encuentran polímeros de arabinogalactana-peptidoglicano. Escala 5nm {Niederweis M. 2010}.

Epidemiología

Las infecciones por MNT en el humano fueron reconocidas al final del siglo XIX. Inicialmente su relación con casos clínicos se adjudicó a colonización transitoria o contaminación de las muestras clínicas y fue posteriormente que las MNT se consideraron como agentes causales de infecciones en humanos. La

importancia del estudio de las infecciones por MNT inició en los años noventa al reportarse un incremento en el número de casos en sujetos con deficiencia en su sistema inmunológico. El grupo de pacientes más afectado es el que presenta el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. A partir de esa fecha se publicaron diversos reportes de infecciones por MNT en personas con éste síndrome y en aquellas que presentan una enfermedad pulmonar como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística pulmonar o diabetes, entre otras (Sexton 2008; Cook 2010). Recientemente, se reportaron casos de infecciones por micobacterias en personas en aparente buen estado de salud (Field 2004; Bodle 2008; Piersimoni 2008). El creciente interés en el aislamiento e identificación de MNT es su relación cada vez más estrecha y frecuente con el humano (Al Mahruqi 2009; Cassidy 2009), asociándolas a infecciones en diversos órganos o tejidos y a su inmunoregulación en la eficacia protectora de la única vacuna que existe contra la tuberculosis, *Mycobacterium bovis* BCG. La capacidad de modular la respuesta inmune de la vacuna BCG por la interferencia de MNT es más evidente en regiones tropicales probablemente por la exposición temprana a MNT que modula la respuesta inmune tolerogénica (Brandt 2002; Young 2007; Mendoza-Coronel 2011).

De 1980 a la fecha se identificaron mas casos clínicos de MNT, cabe mencionar que, cuando se llega a diagnosticar la enfermedad por MNT ésta no es de reporte obligatorio, por lo que existen muchos datos ausentes que impiden tener un mejor diagnóstico y conocimiento de su entorno. Reportes de algunos autores señalan que aproximadamente la mitad de las especies de MNT identificadas en el área de estudio son patógenos oportunistas (Esteban 2008; Billinger 2009; Thomson 2010).

En una revisión del 2008 Piersimoni cuestiona si el incremento de las infecciones por MNT es real o solo se les reconoce mas frecuentemente por una mejor capacidad técnica de los microbiólogos y porque los clínicos piensan más en el diagnóstico por MNT que en el pasado. Por otro lado, Winthrop proporciona la prevalencia de 8.6/100 000 en población general en un periodo de dos años, sólo en el estado de Oregon en los Estados Unidos. Después de ajustar los resultados por edad en ese mismo estudio, la prevalencia fue de 20/100 000 en personas mayores de 50 años. Una mayor frecuencia se observó en mujeres de edad avanzada y personas con enfermedad pulmonar previa. Finaliza el reporte señalando que el valor predictivo del 86% de los criterios microbiológicos de la Sociedad Americana de Tórax y la Sociedad Americana de Enfermedades infecciosas (ATS/IDSA) a todos los hallazgos microbiológicos en todo el estado,

la prevalencia sería de 26.7/100 000 en personas de mas de 50 años; es decir, la frecuencia por MNT sería varias veces mayor que la incidencia anual asociada a *M. tuberculosis* (Winthrop 2010).

Bodle en el 2008 reporta uno de los estudios de infecciones por MNT mas grandes realizados en Estados Unidos y señala que las infecciones diagnosticadas por MNT en personas sanas sugiere un incremento. La correlación con el género coincide con otros reportes que señalan mayor frecuencia en mujeres en especial de edad avanzada; del porcentaje total de cultivos positivos, una tercera parte fue clasificada como enfermedad con una importante tasa de infecciones por MNT de crecimiento rápido (Bodle 2008). La presencia de MNT también fue detectado en diversos equipos de hospitales, lo que implica un riesgo para la población intrahospitalaria (Hilborn 2006; Gomila 2007).

Micobacterias no tuberculosas en agua

Las MNT son patógenos oportunistas y se sugiere diversos vehículos de transmisión: a) por aerosoles (albercas, regaderas y cualquier cuerpo de agua), b) ingesta de agua o alimentos contaminados, c) contacto directo en piel (Corbett

1999; Baquero-Artigao 2005; Best 2009). Las MNT se han aislado de agua dulce (lagunas y ríos), agua salada (mar), albercas, máquinas para hacer hielo, así como en los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano. De hecho, el agua en sus diferentes tipos es uno de los más frecuentemente relacionados a la transmisión de MNT, tanto por el número de aislamientos como por la variedad de especies encontradas en ella (Leoni 1999; Bland 2005; Castillo-Rodal 2011). Existen evidencias que apoyan que el agua es un vehículo importante de transmisión de MNT, donde se observa la asociación causa-efecto entre las MNT y el humano. *Mycobacterium avium* (*M. avium*) fue aislada en diferentes miembros de una familia con infección pulmonar por MNT. *M. avium* se aisló de biopsias de pulmón y expectoración de un paciente y de expectoración de otros dos familiares así como del agua de la regadera de la casa. Tanto en las muestras clínicas como en el agua de la regadera se identificó a *M. avium* con la técnica del análisis del polimorfismo de los fragmentos de digestión (RFLP) (Mangione 2001). En un hospital de Houston Texas (EUA) se aisló a *M. simiae* tanto, en pacientes hospitalizados como de uno de los sistemas de distribución de agua del mismo hospital. La genotipificación se obtuvo por electroforesis de campos pulsados (PFGE) que mostró ser de tipo clonal (El-Sahly 2002).

La persistencia de las MNT en agua se explica por su alta resistencia a

métodos desinfectantes y descontaminantes y por su capacidad de formar biopelículas en prácticamente cualquier superficie. Inicialmente se relacionó la presencia de MNT en los sistemas de distribución con tuberías de polivinilcarbonato (PVC), y relacionadas a temperaturas altas; actualmente se sabe que la formación de biopelículas por MNT ocurre en muchas superficies y a diferentes temperaturas.

En Finlandia, se analizaron diversos sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano seleccionando las muestras de agua al inicio de los sistemas de distribución y en la parte final de los mismos antes de entrar a las tuberías de las casas. Los resultados muestran que las unidades formadoras de colonia (UFC) de MNT se incrementaron 10 veces más en la parte distal de los sistemas de distribución de agua comparado con el número inicial que se encontraba en el mismo sistema de distribución en el sitio de bombeo. De igual forma, se presentó un incremento de UFC en agua de los sistemas de distribución posterior al tratamiento con ozono que se usa como desinfectante. Los autores sugieren que los depósitos de agua sirven como reservorio de bacterias y, tanto las tuberías antiguas (cobre) como las usadas actualmente PVC, representan superficies ideales para la formación de biopelículas (Torvinen 2004). En otro estudio, se evaluó la presencia de MNT con el efecto de la formación de

biopelículas en acero inoxidable y en policarbonato, así como su crecimiento en relación a la concentración de nutrientes. Las MNT de rápido crecimiento disminuyeron su número al disminuir la concentración de nutrientes, no así por el tipo de material en el que fueron crecidas, mientras que *M. avium* representante de las micobacterias de crecimiento lento se multiplicó y formó biopelículas en tres días en presencia o no de nutrientes y en los dos materiales de tuberías utilizados. Este hallazgo llamó la atención ya que se sabe que esta misma especie forma colonias visibles en medio Middlebrook después de 7 días de su inoculación. Por lo que los autores sugieren que *M. avium* está mejor adaptada a vivir en agua que otras micobacterias. Con estos datos diferentes autores sugieren que los depósitos de agua sirven como reservorio de bacterias y, las tuberías no importando el material representan superficies ideales para la formación de biopelículas (Williams 2009).

Falkinham en el 2009, menciona que la hidrofobicidad de la superficie celular es el principal determinante de la persistencia de las micobacterias tanto de rápido como de lento crecimiento, las micobacterias se unen a partículas suspendidas en el agua y colonizan los sistemas de distribución formando biopelículas. La formación de estas biopelículas, las hace resistentes al flujo del agua y a los desinfectantes, este mismo autor sugiere que esta resistencia no es

genética sino adaptativa ya que aunque son capaces de adaptarse y sobrevivir a condiciones adversas debido a que tienen su crecimiento lento comparadas con otras bacterias presentan un metabolismo rápido (Falkinham 2009).

Métodos de recuperación de MNT

El aislamiento o recuperación de MNT del medio ambiente no es fácil ya que los reportes existentes señalan aislamientos en ambientes acuáticos con características diferentes. Tradicionalmente los métodos utilizados para el aislamiento de MNT del medio ambiente son métodos estandarizados para aislar MNT en muestras clínicas y adecuados a muestras del medio ambiente. El número de MNT en las muestras del medio ambiente es reducido comparadas con las muestras clínicas; probablemente porque, en el medio ambiente los sustratos que requieren están compartidos con muchos otros microorganismos. Además la mayoría de las comunidades bacterianas tiene un tiempo de duplicación de menor tiempo en relación al tiempo de crecimiento de las MNT. Los métodos de aislamiento de las MNT del medio ambiente son diversos tanto por las características propias del medio ambiente, como por las características de cada

especie. Du Moulin y col. utilizaron cloruro de cetilpiridinium (CPC) a una concentración de 0.04% para el aislamiento de las MNT provenientes de agua para uso y consumo humano de los sistemas de distribución de agua destinadas a un hospital (Du Moulin 1978), mientras que Kamala comparó seis métodos de descontaminación para aislamiento de MNT de muestras de diferente origen (ambientales y humanas) (Kamala 1994). El método más exitoso fue el compuesto por hidróxido de sodio (NaOH) al 1% combinado con laurilsulfato de sodio (SLS) al 3%. En el año 2004 Parashar y col. aislaron MNT de suelo y agua con NaOH 4%/SDS 3% y Radomski (2010) logró aislamiento de MNT con CPC 0.05%. Esta información muestra la variabilidad en el uso de los tratamientos para aislar MNT del medio ambiente (Parashar 2004; Radomski 2010).

Identificación de Micobacterias no Tuberculosas

La identificación tradicional de las especies de micobacterias se basa en el análisis de las actividades metabólicas mediante pruebas bioquímicas y características fenotípicas por medio del análisis del crecimiento *in vitro*. Estas pruebas requieren material diverso, consumen mucho tiempo (de semanas a

meses) y para la identificación de muchas especies son pobremente reproducibles, particularmente entre las especies cercanamente relacionadas. Para una mejor caracterización en la taxonomía de las micobacterias, se implementaron nuevos métodos de identificación que son rápidos, sensibles y específicos. Desde la década de los 90s se desarrollaron diferentes técnicas moleculares para una detección rápida tanto directa de la muestra, como de cultivo de las micobacterias. Estas técnicas se basan en la amplificación de fragmentos únicos de DNA o RNA micobacterianos por PCR y existen diferentes métodos comerciales disponibles; de los genes mas comúnmente utilizados para tal fin son el elemento de inserción *IS6110* y el *16S* RNAr.

16S RNAr

Diferentes centros hospitalarios realizan la identificación por medio de sondas de hibridación con estuches de diagnóstico (e.g., Accuprobe, Gen-Probe, y LiPA MYCOBACTERIA), algunas especies son erróneamente identificadas (Weisburg 1991; Tortoli 2010) además, el número de las especies tipo que ofrecen en los kits de diagnóstico es reducido (5 a 16 especies), por otro lado, la experiencia y

los lineamientos son para MNT de origen clínico; mientras que, las especies de MNT presentes en medio ambiente son mas diversas, algunas no incluidas en los kits causan patología en el humano y no están consideradas en estos reactivos. En los últimos años se diseñaron métodos moleculares para la identificación de MNT entre ellos el PCR directo con un gen específico, sondas para la hibridación, el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción por PCR y la secuenciación entre otras. La identificación de MNT por secuenciación de un gen es considerado el estándar de oro. Esta técnica compara nucleótidos de la cepa a identificar con las secuencias conocidas que se encuentran en la base de datos del banco de genes; con el fin de separar las especies estrechamente relacionadas o identificar nuevas especies.

La región mas frecuentemente utilizada para propósitos taxonómicos de las bacterias es el gen *16S RNAr* o *16S DNAr*, términos utilizados de manera indistinta. El gen *16S RNAr* es utilizado como cronómetro molecular por el alto grado de conservación que presenta. La secuencia de este gen está constituida por regiones hipervariables, variables y conservadas. El gen *16S RNAr* (gen codificante para el *RNAr del 16S* de la subunidad pequeña ribosomal de aproximadamente 1,500 pb) es el marcador molecular que fue utilizado mayoritariamente para estudios taxonómicos y filogenéticos en diversidad bacteriana y contribuyó

positivamente en este campo (Weisburg 1991) (Figura 4). La secuencia *16S* RNAr es utilizada para un gran número de especies, las que están depositadas en el banco de genes lo que da la posibilidad de comparar la secuencia de una especie desconocida. Estudios comparativos del análisis de 500 pb o 1,500 pb del *16S* RNAr arroja resultados similares aunque, en algunos reportes de casos clínicos mostraron un mayor porcentaje de diferencias entre especies debido a una diversidad ligeramente mayor por kilobase secuenciado en las primeras 500 pb del gen estudiado. Cabe mencionar que se recomienda el uso de 1,500 pb cuando se describen nuevas especies (Clarridge 2004). El método de secuenciación de ácidos nucleicos muestra grandes avances en la última década y permite que un mayor número de laboratorios determinen la secuencia de millones de pares de bases de DNA por año. Este gen en particular divide a las MNT en dos grupos; de rápido y de lento crecimiento. Sin embargo, la presencia de dos o más copias de éste gen en la misma especie o la similitud del mismo entre algunas especies de MNT dificulta la certeza de la identificación. Es por eso que diversos autores decidieron utilizar otros genes para obtener una mejor discriminación entre las cepas de MNT (Harmsen 2003).

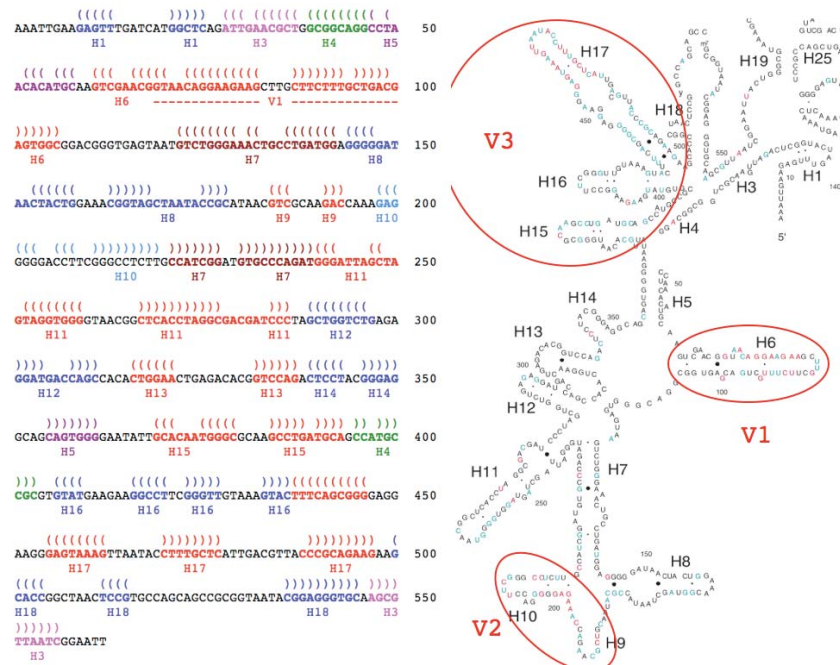


Figura 4. En la figura del lado derecho se observa una esquema del gen *16S* rRNA mientras que en la del lado izquierdo la secuencia del gen.

Gen *hsp65*

Uno de los genes recientemente seleccionados para la identificación de MNT es el gen *groELII* constituido por 441 pb, gen que está presente en todas las micobacterias, es altamente conservado y a la vez presenta mayor polimorfismo al compararlo con el gen *16S*. El PCR de *hsp65*, seguido del análisis de los fragmentos de digestión por las enzimas *BstEII* y *HaeIII* es un método rápido para la identificación de las micobacterias aún en especies cercanamente relacionadas.

La hipervariabilidad del gen *hsp65* lo situó como uno de los genes más utilizados en los métodos de rutina de estudios taxonómicos (Telenti 1993; Brunello 2001) (Figura 5).

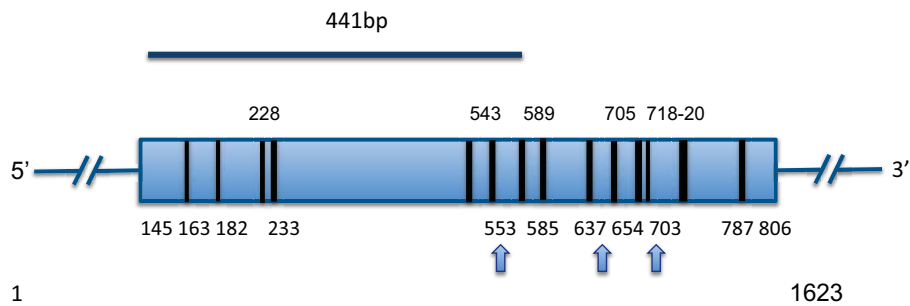


Figura 5. Esquema del fragmento del gen *hsp65*.

Gen *rpoB*

El gen que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana (*rpoB*) está constituido por 3,500 pb y se usa para la identificación de especies nuevas debido a que es altamente conservado y presenta gran polimorfismo con una variación promedio del 3% en su secuencia, existe una sola copia y la divergencia genética de los genes *rpoB* se correlaciona mejor con la divergencia genómica global y proporciona un mejor apoyo de arranque para la reconstrucción

filogenética, por lo que es un buen complemento para una mejor discriminación entre las especies bacterianas cercanamente relacionadas, especialmente las de rápido crecimiento (Miller 1994; Sintchenko 1999) (Figura 6).

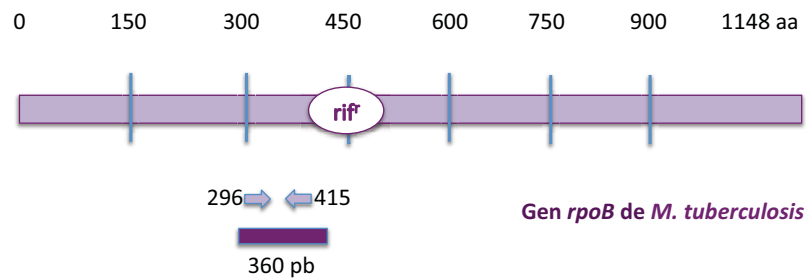


Figura 6. Esquema del fragmento del gen *rpoB*.

Es importante mencionar que en un gran número de casos, la información que proporciona el estudio de un solo gen no permite diferenciar a nivel de especie y mucho menos a nivel de subespecie por lo que la secuenciación con genes concatenados permite la identificación de MNT en diferentes disciplinas.

Con todos estos antecedentes mencionados y con la falta de estudios de MNT en el medio ambiente en México en especial en el agua, decidimos realizar una investigación de la presencia de MNT en tres ambientes acuáticos, y para su especiación con el uso de tres genes concatenados para incrementar el poder discriminatorio presente en cada aislado de MNT y así comparar la diversidad genética que proporcione información sobre la epidemiología de las MNT aisladas de agua. Cabe mencionar que este es el primer estudio realizado en México y en el

mundo donde se realiza el análisis filogenético de máxima similitud con tres genes: *16S*, *hsp65* y *rpoB* para la identificación de los aislamientos obtenidos de tres ambientes acuáticos diferentes. Esto permite conocer la existencia de MNT en diferentes sistemas de agua y al mismo tiempo la identificación a nivel de especie y de subespecie.

Justificación

La creciente asociación de infecciones en humanos por micobacterias no tuberculosas, la modulación que producen en la respuesta inmune de la vacuna *M. bovis* BCG hacia la inmunotolerancia y la fuerte sospecha de que el agua es el principal vehículo para su transmisión, determina la importancia de aislar e identificar MNT en ambientes acuáticos.

Objetivos

Objetivo General

Aíslar e identificar Micobacterias no tuberculosas de diferentes ambientes acuáticos en México.

Objetivos particulares

1. Recuperación de MNT de diferentes ambientes acuáticos.
2. Correlacionar los parámetros físicoquímicos y microbiológicos con la presencia de MNT.
3. Identificar las especies de las cepas de MNT por medio del análisis del polimorfismo de los fragmentos del gen *hsp65* (PCR-PRA - PRASITE) y por secuenciación de los genes *16S RNAr*, *hsp65* y *rpoB*.
4. Describir las especies de MNT aisladas de los ambientes acuáticos.

Material y Métodos

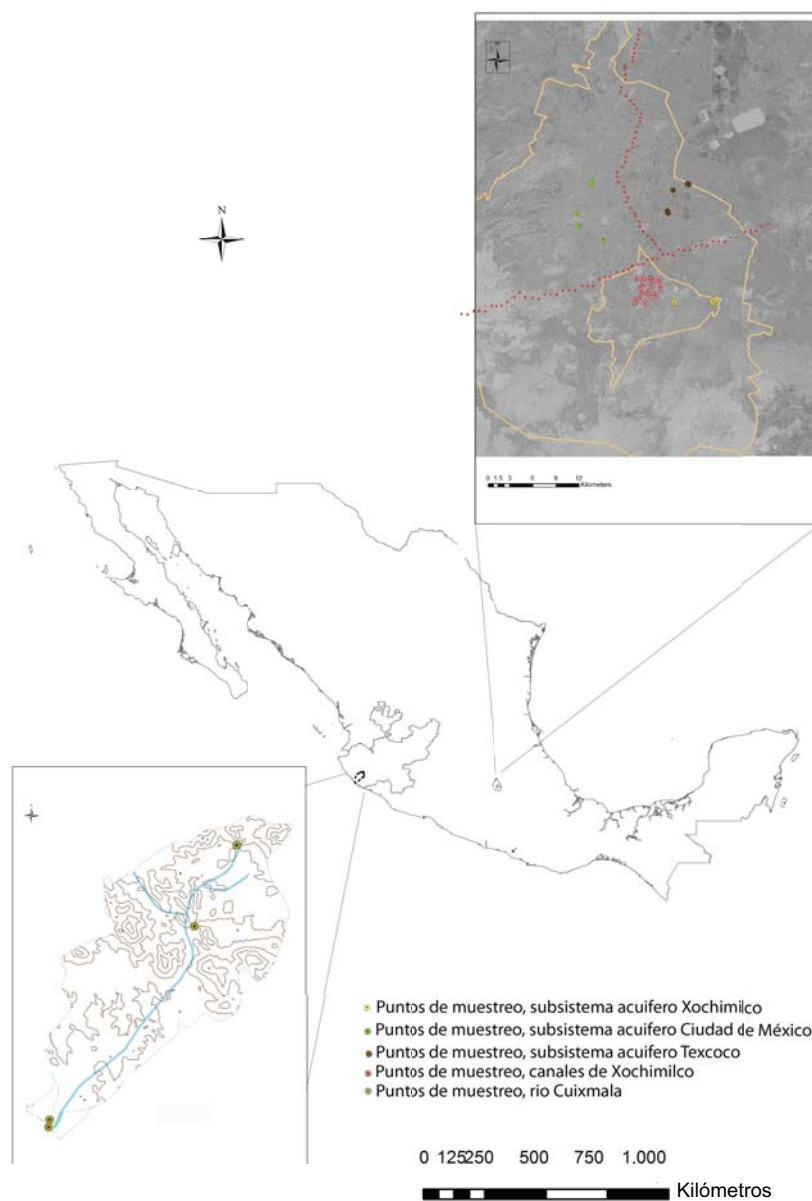
Áreas de estudio

Los subsistemas de agua estudiados están localizados uno en el estado de Jalisco y el otro en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM). En el estado de Jalisco se analizó agua superficial de la cuenca del río Cuítmala que tiene una extensión de 1,000 km² donde se encuentran zonas forestales, pecuarias, agrícolas, urbanas y turísticas. Este río limita la reserva de la Biósfera Chamela-Cuítmala que presenta una extensión de 13,142 hectáreas.

El subsistema de agua de la Ciudad de México pertenece al acuífero de la ZMCM que está localizado en la parte central este del cinturón volcánico Mexicano limitado por elevaciones topográficas de origen volcánico (Mazari-Hiriart 2005). Este subsistema proporciona el 70% de la demanda de agua de todos los habitantes de la zona metropolitana y proviene de agua subterránea de los tres principales subacuíferos (el 30% restante proviene de otras fuentes).

El tercer subsistema estudiado fue el agua superficial de reuso para riego proveniente de los canales de Xochimilco localizados en el sureste de la cuenca del Valle de México, zona conformada por 189 Km de canales que comunica y riega las chinampas (plataformas flotantes construidas con sedimento extraído del fondo

de los sistemas del viejo lago donde se siembran hortalizas, plantas y flores; D.D.F., 1988). El agua de los canales de Xochimilco es alimentada por agua fluvial, aporte de agua tratada proveniente de las plantas de tratamiento de aguas residuales y agua residual sin tratamiento proveniente de los pobladores asentados alrededor de los canales (Mapa 1) (Mazarí-Hiriart 2008).

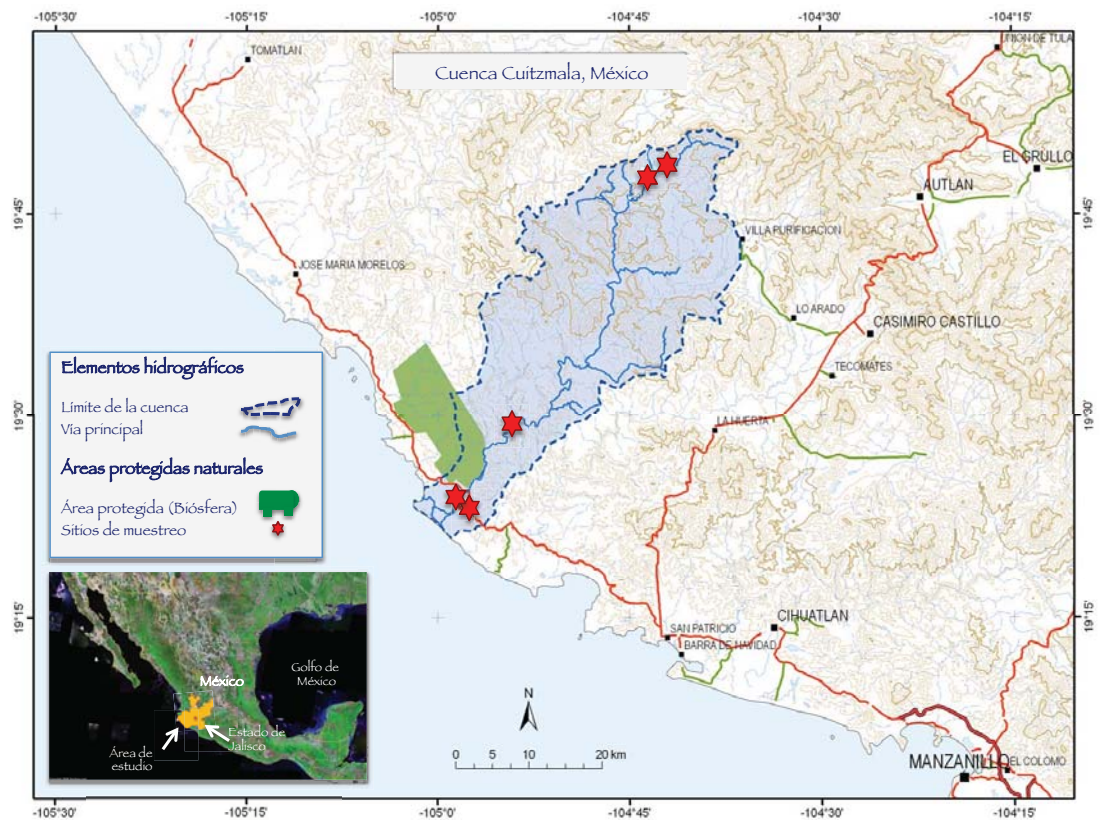


Mapa 1. Mapa que señala la localización de las dos áreas geográficas estudiadas (Río Cuixmala en el estado de Jalisco y Sistemas de distribución de agua y agua de reuso en la ZMCM).

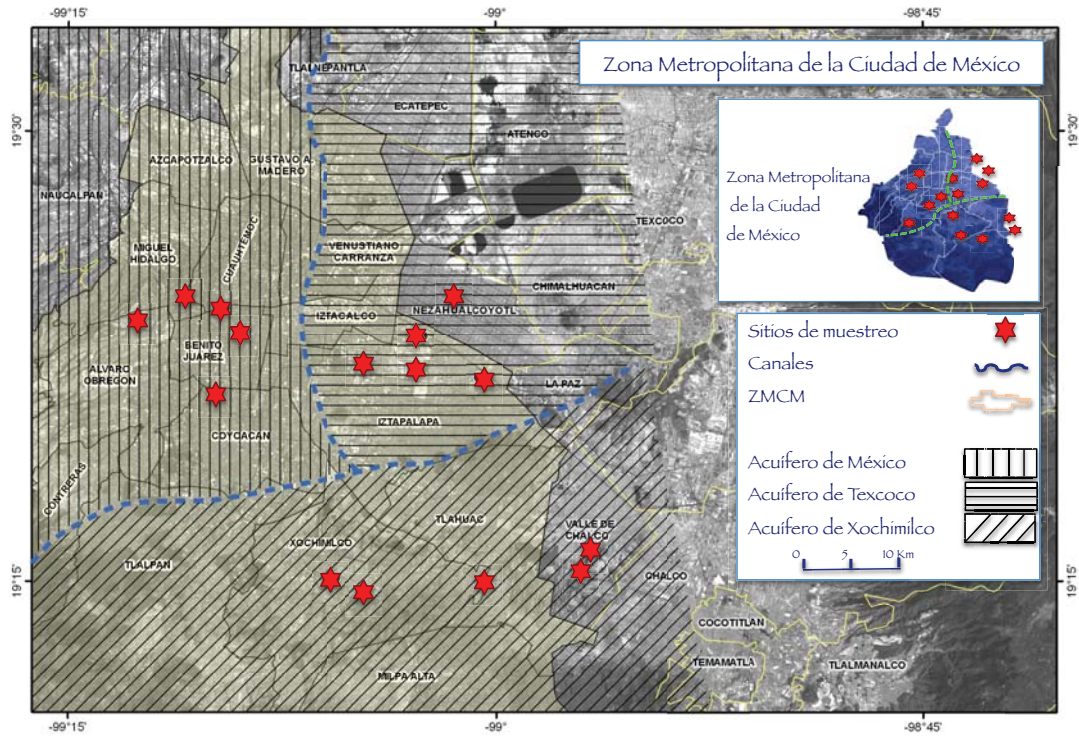
Colección de muestras de agua

Un total de 40 muestras provenientes de los tres sistemas acuáticos fueron estudiadas; cinco muestras de agua de el río Cuitzmala: dos muestras en el inicio del río, una en la parte media y dos en la parte baja donde, ya existen asentamientos humanos. Las muestras se tomaron a una profundidad promedio del río y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento (Mapa 2). Adicionalmente 15 muestras provenientes de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano de la ZMCM fueron seleccionadas de 1,575 registros de pozos de extracción de sitios representativos del área geográfica: cinco en Texcoco, cinco en la Ciudad de México y cinco en Xochimilco (Mapa 3). Las muestras se colectaron del sistema de distribución antes de entrar a los domicilios particulares después de dejar correr el agua 5 minutos y 20 muestras de agua superficial de reuso para riego de los canales de Xochimilco tomadas a profundidad promedio del área seleccionada y de diferentes sitios seleccionadas al azar (11 para agricultura y 9 de área urbana) (Mapa 4). En todos los sitios se colectó 1 L de agua en botellas de polipropileno estériles de boca ancha con tiosulfato de amonio al 0.5%. Las muestras provenientes de la ZMCM se procesaron de

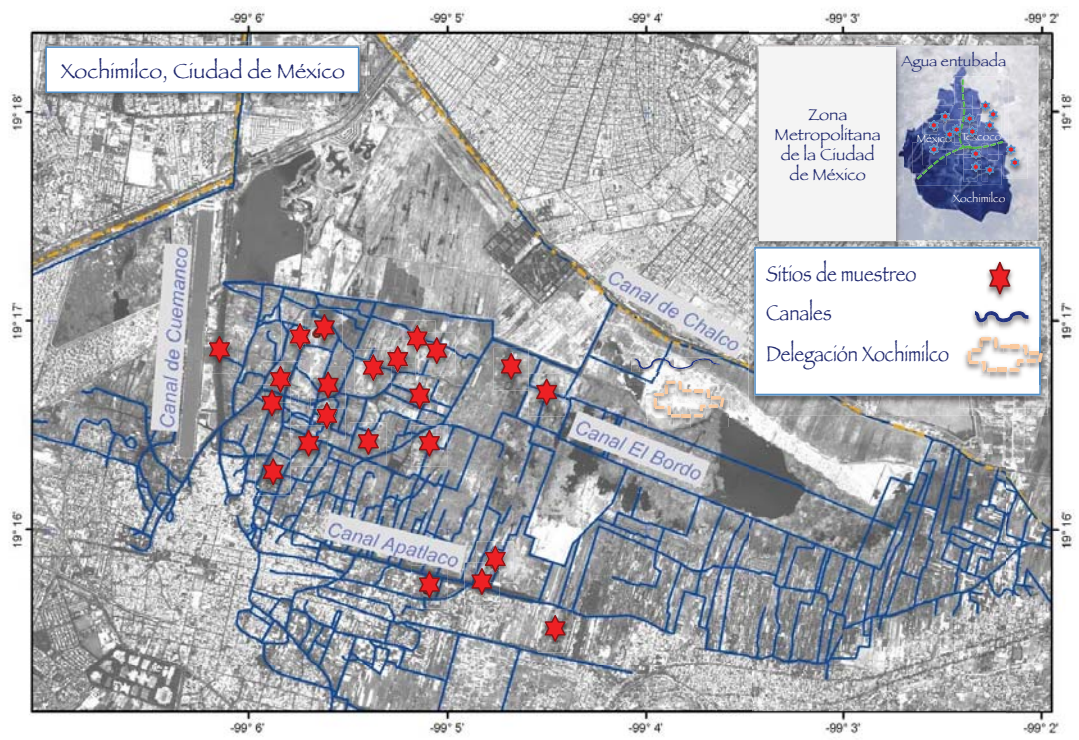
inmediato y las del río Cuítmala se conservaron a 4°C hasta su arribo en el laboratorio para su procesamiento.



Mapa 2. Área geográfica que muestra el río Cuítmala, la reserva ecológica y los puntos de muestreo. Estado de Jalisco.



Mapa 3. Mapa que señala los sitios de muestreo de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano en la ZMCM.



Mapa 4. Canales de Xochimilco representativos de agua superficial de reuso para riego, los puntos rojos señalan los sitios de muestreo.

Características físicoquímicas de las muestras de agua

Los siguientes parámetros se utilizaron para describir las características físicoquímicas de cada sistema: temperatura, pH, conductividad, amonio, nitratos y nitritos. En cada punto de muestreo la temperatura, pH y conductividad fueron obtenidas con una sonda multiparámetros con el medidor de conductividad portátil YSI 3500 (Yellow Spring, OH, USA).

Análisis bacteriológico

El análisis bacteriológico se realizó en los tres tipos de agua en búsqueda de coliformes y enterococos fecales de acuerdo a los procedimientos estándares de filtración de membrana. Por medio de un filtro de acetato de celulosa (Millipore MF type HA 0.45 μm poro) se filtró 1 L de agua y la membrana del filtro se colocó en medio M-FC (medio de cultivo específico para coliformes fecales Beckton-Dickenson Co.) y en medio de agar K-F específico para enterococos. Las muestras se incubaron a 35°C por 24 h para los enterococos fecales y a 44.5°C para las bacterias coliformes fecales. Los enterococcus y coliformes fecales se

incubaron, identificaron y contaron de acuerdo a la Asociación Americana para la salud pública (Apha 1992).

Método de recuperación de MNT

En un estudio piloto se utilizó (1% NaOH/3% SDS) y CPC 0.005% por 15 min en las muestras de los canales de Xochimilco, la recuperación de las bacterias fue menor al 50% del total de muestras debido a la presencia de grandes cantidades de microbiota acompañante que por su crecimiento degradó el medio y no permitió el crecimiento de las MNT. Para evaluar la recuperación de MNT se estandarizaron 3 concentraciones de NaOH (1, 2 y 4%) y tres de CPC (0.005, 0.05 y 0.5%). La metodología se modificó con el incremento en el tiempo de exposición a los descontaminantes de 15 a 30 min y la recuperación de MNT mejoró sustancialmente, al incrementar el tiempo de exposición, mas que incrementar la concentración de los mismos (NaOH 1 y 2% y CPC 0.05 y 0.5%). Este cambio permitió la recuperación de MNT con ambos métodos casi al 100% de las muestras estudiadas, de 20 muestras de agua de reuso para riego de los canales de Xochimilco con NaOH1%/15' se aislaron MNT en 6 de 20 sitios, mientras

que con NaOH1% por 30 min se aislaron en 19 de los 20 sitios estudiados. Una situación semejante fue observada con el método de recuperación con CPC 0.5% ya que se aislaron MNT en 19 de 20 sitios estudiados mientras que con CPC al 0.05% se aislaron MNT en 8 de 19 sitios estudiados. Los resultados preliminares ayudaron a la selección de dos concentraciones en cada uno de los descontaminantes, por lo que la concentración mas alta de NaOH y la mas baja de CPC fueron eliminadas para los sistemas de distribución de agua mientras que para el agua de reuso se mantuvo NaOH al 1 y 2% y CPC al 0.05 y 0.5%. En la muestra que no se aislaron MNT por ambos métodos fue por la alta concentración de microbiota acompañante que impidió el crecimiento de MNT.

Procesamiento de las muestras para aislamiento de MNT

El aislamiento de MNT en agua se realizó con dos métodos de recuperación. La toma de la muestra se realizó con las condiciones mencionadas anteriormente que dependió del área estudiada. 1 L de agua se centrifugó a 5,000 rpm / 4°C por 20 min, el sobrenadante se descartó y con un volumen final de 5 mL se trabajó. Para agua subterránea a un volumen de 500 µl de agua se adicionó 750 µl de

NaOH 0.5 y 1%/SDS 3% y para CPC a 500 µl de agua se adicionó 500 µl de CPC a una concentración final de 0.005 y 0.05%. Para agua superficial (Río Cuitzmala y canales de Xochimilco), se trabajó con los mismos reactivos a mayor concentración, a 500 µl de agua se adicionó 750 µl de NaOH 1 y 2%/SDS 3% y para CPC a 500 µl de agua se adicionó 500 µl de CPC a una concentración final de 0.05 y 0.5%. El NaOH se agitó 30 min a temperatura ambiente y el pH se ajustó a 7 con ácido fosfórico (40%). El CPC se agitó en las mismas condiciones y las muestras con ambos métodos se centrifugaron a 3,000xg por 30 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió dos veces con solución salina estéril (SSE). El precipitado se re-suspendió en 500 µl de SSE y se inoculó 60 µl al medio Lowestein-Jensen (LJ). Todos los cultivos en medio LJ se mantuvieron a 37°C durante dos meses y con observación diaria de los mismos. Posterior al crecimiento de colonias se realizó tinción de Ziehl-Neelsen y los bacilo alcohol resistentes (BAAR) se sembraron en medio 7H10 enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) para obtener colonias aisladas y su posterior identificación.

Identificación de MNT

Los primeros 14 aislamientos de bacilo alcohol resistentes positivos se identificaron mediante los métodos tradicionales (clasificación de Runyon y pruebas Bioquímicas), algunas de las pruebas bioquímicas no fueron reproducibles además de que el tiempo que ocupaba cada ensayo fue muy largo y se consumía gran material, por lo que la identificación se realizó con el método molecular de análisis del polimorfismo de los fragmentos de digestión por reacción en cadena de la polimerasa (PCR-PRA) del *gen hsp65*, éste método se validó con especies de MNT de la colección American Type Culture Collection (ATCC) tanto de MNT como especies del complejo *M. tuberculosis* H37Rv.

Posterior a la identificación de MNT PCR-PRA con el *gen hsp65*, se realizó el análisis de las secuencias de los productos de amplificación para los genes *16S rRNA*, *hsp65* y *rpoB*.

Extracción de DNA

Extracción de DNA micobacteriano se realizó mediante el kit UltraClean Genomic Purification (MO BIO, Laboratories) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. El DNA extraído se suspendió en agua grado molecular y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amplificación (PCR)

Un fragmento de aproximadamente 441 pb del gen *hsp65* se amplificó con dos iniciadores específicos (Tb11[5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT] y Tb12 [5'CTTGTCGAACCGCATACCCT]) descritos por Telenti *y col* (Telenti 1993). La composición de la mezcla de reacción (50 μL) fue de 50 mM KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM de MgCl_2 , 10 mM de dNTPs, 20 pmol de cada iniciador, 1.5 U de Taq polimerasa y 100 ng de ADN suspendidos en agua para PCR. Las condiciones de amplificación consistieron en un primer ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 45 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min, el evento final de extensión consistió en un ciclo a 72°C por 5 min. La presencia del producto

amplificado se confirmó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2% por 1 hora a 100 Volts (V) en solución amortiguadora de Tris-boratos-EDTA (TBE IX; 0.045 M tris-borato y 0.001 M EDTA, pH 8.0). Para la obtención de los productos de restricción se utilizó 10 U/ μ L las enzimas *BstEII* y *HaeIII* (Boehringer Mannheim, Germany). A una mezcla conteniendo 8 μ L de agua para PCR, 2 μ L de solución amortiguadora de restricción y 10 μ L del producto de PCR se agregó 0.5 μ L de cada enzima. Las digestiones fueron incubadas por 2 horas a 60°C para la enzima *BstEII* y a 37°C para la enzima *HaeIII*. La separación de los fragmentos de restricción se observó en un gel de agarosa al 3% (Biogel, Q·Biogene) mediante una electroforesis en solución amortiguadora TBE 0.5X. El análisis se llevó a cabo con el programa GeneTools (Syngene, 1998-2000) y la interpretación se realizó con base en el algoritmo disponible en Internet (<http://app.chuv.ch/prasite>) PRASITE.

Amplificación y secuenciación de los genes 16S rRNA, hsp65 y rpoB

Las amplificaciones de cada especie identificadas por PCR-PRA se enviaron a secuenciar. Para la amplificación del fragmento del gen 16S rRNA se

utilizaron los primers universales fD (ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rDI(cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC) (Weisburg 1991). Para amplificar un fragmento del gen *rpoB* (~ 1,290 bp) se emplearon los primers específicos para *Mycobacterium*, *rpoB_N326* (GAGAACCTGTTCTTcaaggagaagcg) y *rpoB_C757* (CGTCCTCGTAGTTGtgrccytcca), (Contreras-Moreira 2009). Para amplificar un fragmento del gen *hsp65* (~ 644 bp) se utilizaron los primers HSPF3 (ATCGCCAAGGAGATCGAGCT) y HSPR4 (AAGGTGCCGCGGATCTTGTT), descritos por Kim y cols. (Kim 2005). Los productos de PCR obtenidos de los tres genes, fueron secuenciados por MACROGEN (Korea).

Análisis filogenético

Las secuencias parciales generadas en este estudio fueron comparadas con las secuencias de referencia obtenidas por medio de una búsqueda en el programa “Herramientas de Búsqueda de Alineamientos en una Base Local”, por sus siglas en inglés (BLASTN), a través de la base de datos no redundantes (nr) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (August 15th, 2010).

Únicamente los 15 hits mas altos fueron usados en análisis posteriores, de los cuales se excluyeron los correspondientes a secuencias de genomas completos. Los análisis filogenéticos se realizaron con el criterio de máxima verosimilitud (Vínuesa 2008).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medianas con mínimas y máximas. El análisis estadístico de los métodos de recuperación de MNT (intratécnica e intertécnica) y el de las características físicoquímicas y microbiológicas se realizó con pruebas no paramétricas (Wilcoxon y U de Mann-Whitney).

Resultados

Análisis físicoquímico

Los análisis de los parámetros físicoquímicos mostraron que la temperatura del agua de los sistemas de distribución de la ZMCM y del agua de reuso para riego de los canales de Xochimilco fue significativamente menor que la del agua superficial del río Cuítmala ($p < 0.01$). El pH del río Cuítmala fue cercano al neutro ($\text{pH} = 7.6$) y con un ligero incremento en los otros dos tipos de agua sin significancia estadística entre los tres ($p = 0.0772$). La conductividad mas baja se observó en los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano ($51 \mu\text{S}/\text{cm}$), 14 veces mas alta en el agua de reuso para riego ($775 \mu\text{S}/\text{cm}$) y cinco veces mas alta en el agua superficial del río Cuítmala ($310.9 \mu\text{S}/\text{cm}$) con significancia estadística ($p < 0.01$). La concentración de amonio fue más baja en agua superficial que en agua de reuso y que en los sistemas de distribución mientras que, los nítritos y nítratos presentaron una concentración alta en el agua de reuso ($p < 0.01$) (tabla 3).

Tabla 3. Características físicoquímicas e indicadores de contaminación microbiológica					
Parámetros	NOM-127-ECOL 1997	Agua superficial de río N= 5	Agua de los sistema de distribución N= 15	Agua de reuso N= 20	NOM-127-ECOL 1997
Características físicoquímicas					
Temperatura (°C)	20.0-37.0	27.49 (25.03-30.28)	21.26 (17.2-23.17)	20.16 (17.12-23.17)	20.0-37.0
pH (pH)	6.5-8.5	7.6 (7.3-8.72)	7.8 (7.78-8.26)	8.3 (7.85-10.43)	6.5-8.5
Conductividad /25°C (µS/cm)	ND	51 (2.51-320)	310.9 (274.9-879.8)	775 (730-1,070)	ND
Amonio NH ₄ ⁺ (mg/L)	< 0.2 mg/l (hasta 0.3 mg/l en aguas anaeróbicas)	0.02 (0.01-1.33)	0.85 (0.5-0.95)	1.55 (0-12.8)	< 0.2 mg/l (hasta 0.3 mg/l en aguas anaeróbicas)
Nitrito (NO ₂ , mg/L)	0.10 (mg/mL)	0.008 (0.002-.65)	0.0095 (0.0035-0.027)	0.6 (1-1.4)	0.10 (mg/mL)
Nitrato (NO ₃ , mg/L)	3 mg/mL	0.025 (0.006-0.95)	2.4 (2.4-3.05)	3.75 (1.3-11.2)	3 mg/mL
Indicadores de contaminación microbiológica					
Coliformes fecales (UFC/100 mL)	No detectable NMP/100 ml Cero UFC/100 ml	1,095 (346-3,880)	ND	3,250 (0-2,000,000)	No detectable NMP/100 ml Cero UFC/100 ml
Enterococos spp. (UFC/100 mL)	No detectable NMP/100 ml Cero UFC/100 ml	2,188.5 (1,549-2,828)	ND	17,500 (0-1,000,000)	No detectable NMP/100 ml Cero UFC/100 ml
Los resultados se expresan como mediana (mínimo-máximo). NO ₂ = nitritos. NO ₃ = nitratos. ND = no determinado. NMP = número mas probable. UFC = unidades formadoras de colonia.					

Análisis bacteriológico

En agua superficial del río Cuítmala la evaluación de la calidad microbiológica de agua mostró un promedio en la densidad de los coliformes fecales de 1,095 unidades formadoras de colonia (UFC)/ 100 mL, mientras que el promedio de enterococos fecales fue de 2,188 UFC/ 100 mL. En el agua de reuso para riego el promedio en la concentración de coliformes fue de 3,250 UFC/mL y de 17,500 UFC/mL para enterococos (Tabla 3).

Método de recuperación de MNT

Los aislamientos de MNT se obtuvieron con ambos métodos de recuperación utilizados. En agua de los sistemas de distribución con el descontaminante NaOH al 1 y 2% se aislaron las mismas especies. Así *M. nonchromogenicum*, *M. arupense* y *M. peregrinum* fueron aisladas con el uso de NaOH 1% y 2%.

M. nonchromogenicum, *M. peregrinum* y *M. gordonae* se recuperaron con el método de CPC. La concordancia entre los hallazgos obtenidos con NaOH al 1% y

2% fue de 42.8% ($P < 0.500$) y con CPC al 0.005 y 0.05% fue de 14.29% ($p < 0.924$) (tabla 4).

Tabla 4. MNT aisladas en los sistemas de distribución con dos métodos de recuperación

Especies	NaOH (n)		CPC (n)	
	1%	2%	0.005%	0.05%
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	1	1	-
<i>M. arupense</i>	1	-	1	-
<i>M. peregrinum</i>	1	1	2	1
<i>M. gordonae</i>	-	-	1	-
Total	3	2	4	1

Hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de cetilperidinium (CPC)

El aislamiento de MNT entre ambos métodos en agua de los sistemas de distribución mostró que con NaOH se aislaron dos *M. nonchromogenicum*, una *M. arupense* y dos *M. peregrinum* mientras que, con CPC se aisló una *M. nonchromogenicum*, tres *M. peregrinum* y una *M. gordonae*. La concordancia entre los dos métodos es de 57.14% ($p < 0.048$) (Figura 7).

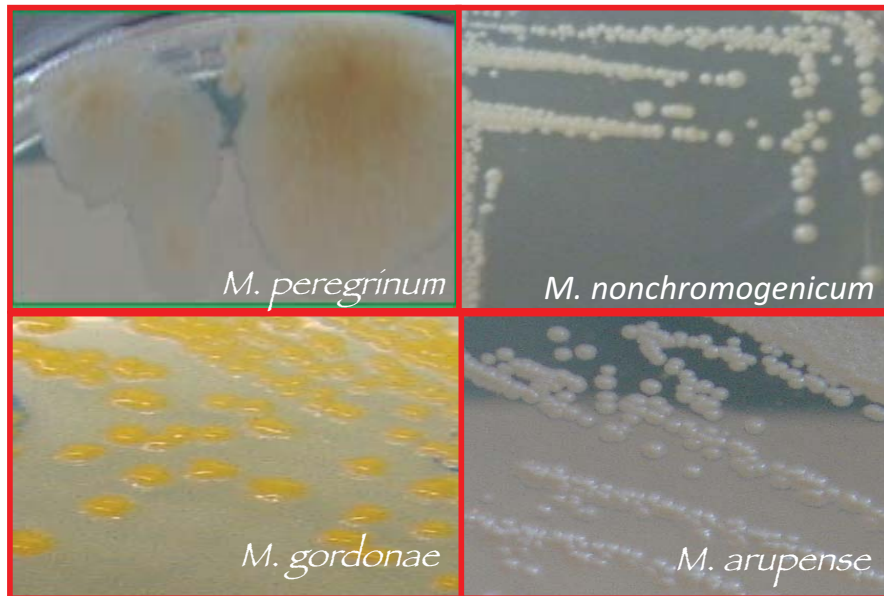


Figura 7. Fotografía de colonias de especies de MNT aisladas de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano.

En agua de reuso con el descontaminante NaOH al 1% se aislaron diez *M. nonchromogenicum*, una *M. arupense*, cinco *M. peregrinum*, una *M. smegmatis*, dos *M. fortuitum*, una *M. chitae*, dos *M. mantenii/M. scrofulaceum* y una *M. porcinum/M. boenickei*. Con la concentración de NaOH al 2% se identificaron siete *M. nonchromogenicum*, una *M. arupense*, siete *M. peregrinum*, una *M. fortuitum*, una *M. avium*, una *M. chitae* y una *M. mantenii/M. scrofulaceum*. El método de NaOH al 1 y 2% presentó una concordancia de 46.34% ($p < 0.167$). Con el método de CPC 0.05% se aislaron cuatro *M. nonchromogenicum*, cinco *M. peregrinum*, una *M. smegmatis*, dos *M. fortuitum* y una *M. chitae*. Con el método

CPC 0.5% se aisló una *M. nonchromogenicum*, siete *M. peregrinum* dos *M. fortuitum*, una *M. avium* y una *M. chitae* (Figura 8) y (Tabla 5).

Tabla 5. MNT aisladas de agua de reuso para riego con dos métodos de recuperación				
Especies	NaOH (n)		CPC (n)	
	1%	2%	0.05%	0.5%
<i>M. nonchromogenicum</i>	10	7	4	1
<i>M. arupense</i>	1	1	0	0
<i>M. peregrinum</i>	5	7	5	7
<i>M. smegmatis</i>	1	0	1	0
<i>M. fortuitum</i>	2	1	2	2
<i>M. gordonae</i>	-	-	-	-
<i>M. avium</i>	-	1	-	1
<i>M. chitae</i>	1	1	1	1
<i>M. mantenii</i> / <i>M. scrofulaceum</i>	2	1	-	-
<i>M. porcinum</i> / <i>M. boenickei</i>	1	-	-	-
Total	23	19	13	12

Al comparar los métodos de recuperación intra-técnica con NaOH se observó una concordancia de 19.51% ($p < 0.855$) y la comparación intra-técnica con el método de CPC mostró una concordancia de 53.6% ($p < 0.957$).

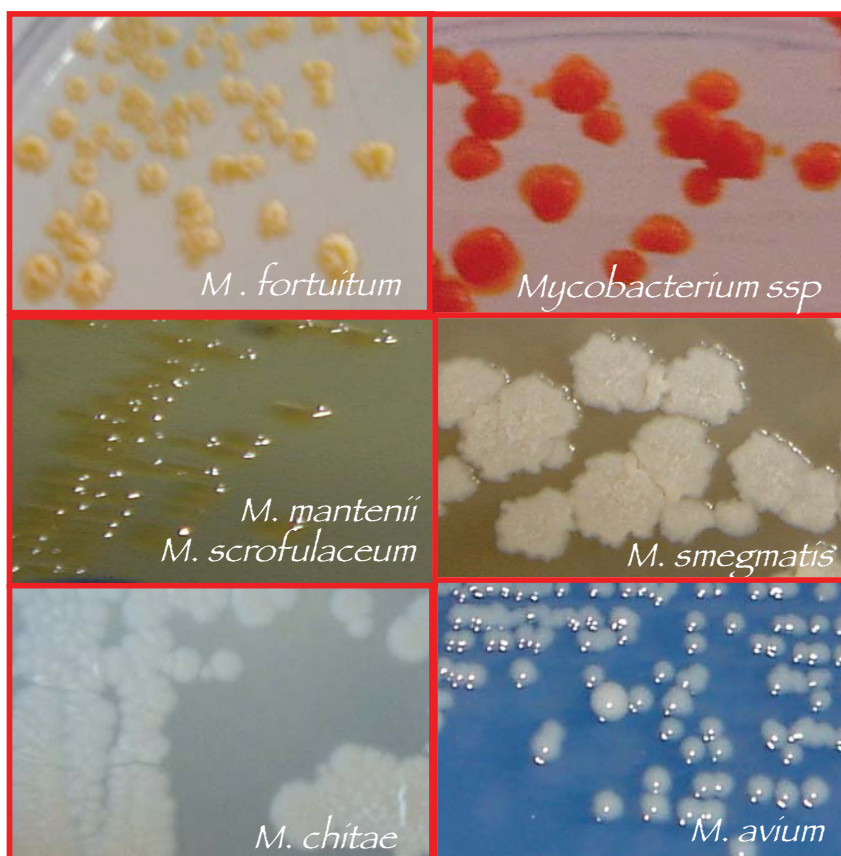


Figura 8. Fotografía de especies de MNT aisladas de agua de uso y consumo humano.

Recuperación de MNT de los tres tipos de agua estudiados

Un total de 40 muestras se analizaron en los tres sistemas acuáticos de los que se aislaron 128 colonias BAAR (Figura 9 y Figura 10). Los aislamientos BAAR positivo pertenecieron a los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano de la ZMCM y al agua superficial de reuso para riego de los canales de Xochimilco, en el agua superficial del río Cuitzmala no se obtuvo aislamientos.

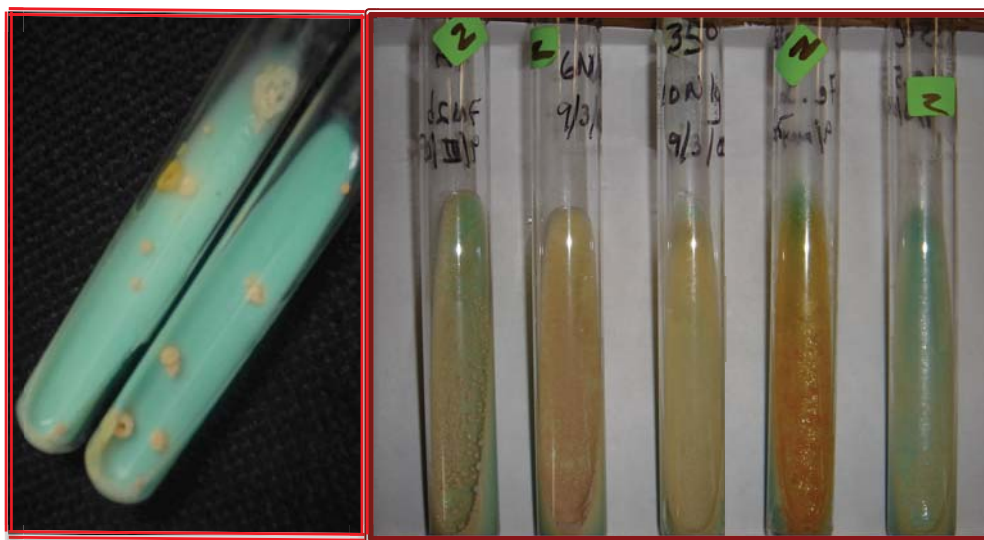


Figura 9. Medio Lowestein Jensen con crecimiento de colonias micobacterianas de diferente tamaño, forma y color.

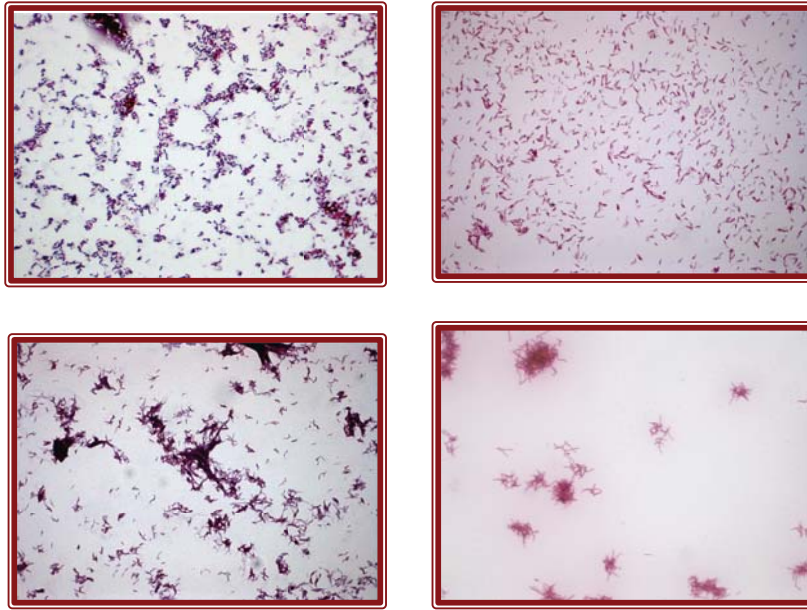


Figura 10. Microfotografía de morfología microscópica de BAAR diferentes teñida con Ziehl Neelsen de cultivos positivos de muestras de agua, 100x.

En todos los puntos de muestreo de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano de la ZMCM (Texcoco, Ciudad de México y Xochimilco) se aislaron MNT, Figura 9. Mientras que; en agua superficial de reuso de los canales de Xochimilco se aislaron en 19 de los 20 sitios estudiados.

Los aislados BAAR positivos identificados por PCR-PRA de los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano mostraron la presencia de *M. nonchromogenicum*, *M. arupense*, *M. peregrinum* tipo I y *M. gordonae*, estas

especies fueron aisladas en todas las muestras analizadas. Mientras que los BAAR aislados de agua de reuso para riego se identificaron 12 especies diferentes (Figuras 11a, 11b y tabla 6).

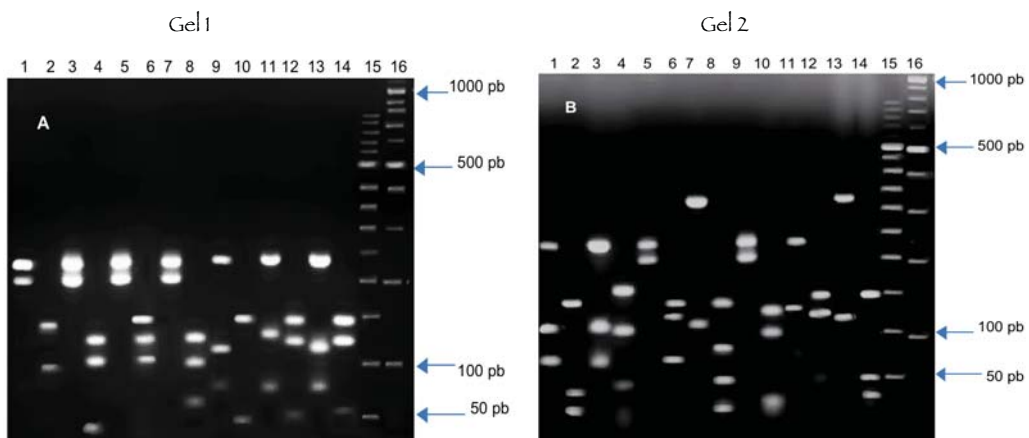


Figura 11a y 11b. Perfiles de los fragmentos de restricción con las enzimas *BstEII* y *HaeIII* de las micobacterias no tuberculosas (MNT) a partir de la amplificación *groELII* (*hsp65*) Gel 1, cepas 2, 4, 7, 8, 13, 18, 27; B. gel 2, cepas 36, 48, 53, 62, 85, 95, 96. Carriles nones, enzima *BstEII*, carriles pares enzima *HaeIII*, carril 15 marcador de peso molecular 50 pb, carril 16 marcador de peso molecular 100 pb.

Tabla 6. Identificación de MNT por PCR-PRA (*hsp65*)

Sistemas de distribución de agua	Canales de Xochimilco
<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. arupense</i>	<i>M. arupense</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. smegmatis</i>
	<i>M. fortuitum</i>
	<i>M. avium</i>
	<i>M. malmoense</i>
	<i>M. szulgai</i>
	<i>M. scrofulaceum</i>
	<i>M. chitae</i>
	<i>M. mantonii</i>
	<i>Mycobacterium spp</i>

Análisis filogenético de las secuencias 16S, hsp65 y rpoB.

Un aislado representativo de cada cepa fue sujeto a MLSA para determinar sus afiliaciones filogenéticas. Desgraciadamente la ausencia de algunas secuencias homólogas para el gen *hsp65* y de siete secuencias del gen *rpoB* en el banco de genes no permitió una buena discriminación por lo que se decidió combinar la evidencia de estos marcadores (*hsp65* y *rpoB*) y compararlos con el gen *16S RNA* de forma individual (Tabla 7).

Tabla 7. Identificación de MNT por MLSA (16S RNA, *hsp65* y *rpoB*).

clave	origen	16S RNA	<i>hsp65</i>	<i>rpoB</i>	especie
02	entubada/reuso	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. alvei</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>
04	reuso	<i>M. avium</i>	<i>M. avium ssp hominissuis</i>	<i>M. avium ssp hominissuis</i>	<i>M. avium ssp hominissuis</i>
07	reuso	<i>M. smegmatis</i> / <i>M. goodii</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>
08	reuso	<i>M. chitae</i>	<i>M. chitae</i>	SR	ND
13	reuso	<i>M. mantenii</i> / <i>M. scrofulaceum</i>	ND	SR	ND
18	entubada/reuso	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	SR	<i>M. nonchromogenicum</i>
27	entubada/reuso	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	SR	<i>M. nonchromogenicum</i>
36	entubada/reuso	<i>M. arupense</i>	<i>M. arupense</i>	SR	<i>M. arupense</i>
48	reuso	<i>M. mantenii</i> / <i>M. scrofulaceum</i>	ND	SR	ND
53	reuso	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
62	reuso	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>
85	reuso	<i>M. porcinum</i> / <i>M. boenickei</i> / <i>M. septicum</i>	<i>M. porcinum</i> / <i>M. boenickei</i>	<i>M. septicum</i>	ND
95	entubada	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
96	reuso	<i>M. mantenii</i> / <i>M. scrofulaceum</i>	ND	SR	ND

MLSA = análisis de multilocus secuenciación, SR = sin referencia, ND = no determinado.

En la Figura 12 (filograma ML) se muestra la relación existente entre los 14 aislados de MNT, 131 secuencias de referencias del género *Mycobacterium* y ocho secuencias fuera del grupo y que corresponden a los géneros *Gordonia*, *Dietzia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*. La primera inspección de los árboles mostró que los aislados de MNT del medio ambiente se encontraron bien agrupados en el clado de *Mycobacterium*, el cual es perfectamente apoyado con un valor de soporte de 1.0 (SH). Los 14 aislados de MNT se distribuyeron en el clado donde se observaron claramente dos grupos, micobacterias de crecimiento rápido y lento, para una mayor claridad; la mayoría de los clados de los tres árboles fueron colapsados que mostraron solo a los mas relevantes para este estudio. Las cepas de MNT 13, 36 y 96 están cercanamente afiliadas con las cepas *M. nonchromogénicum* y *M. arupense*. (0.94). El aislado de MNT 48 fue relacionado significativamente a *M. gordonae* con un valor de soporte (SH) de 0.99. Los aislados de MNT 4, 7 y 8 se encontraron agrupados dentro del bien demarcado clado *M. scrofulaceum*/*M. manteni* (valor de soporte (SH) 0.98). El aislado de MNT 85 fue el único encontrado en el clado del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) con una cercana afinidad a *M. avium*. El aislado 62 de MNT se relacionó a *M. chitae*. Entre los aislados de crecimiento rápido las cepas de MNT 95 y 18 se agruparon dentro del clado *M. goodii*/*M. smegmatis* aunque su afiliación

taxonómica exacta dentro de este grupo no fue determinado debido a la pérdida de resolución de las secuencias de *16S rRNA*. El aislado 27 fue claramente afiliado a *M. fortuitum* con un valor de soporte importante SH 0.98). Finalmente, las cepas de MNT 2 y 53 se agruparon dentro del clado *M. porcínium/M. septicum/M. peregrinum/M. alveí*, un grupo con pobre resolución interna.

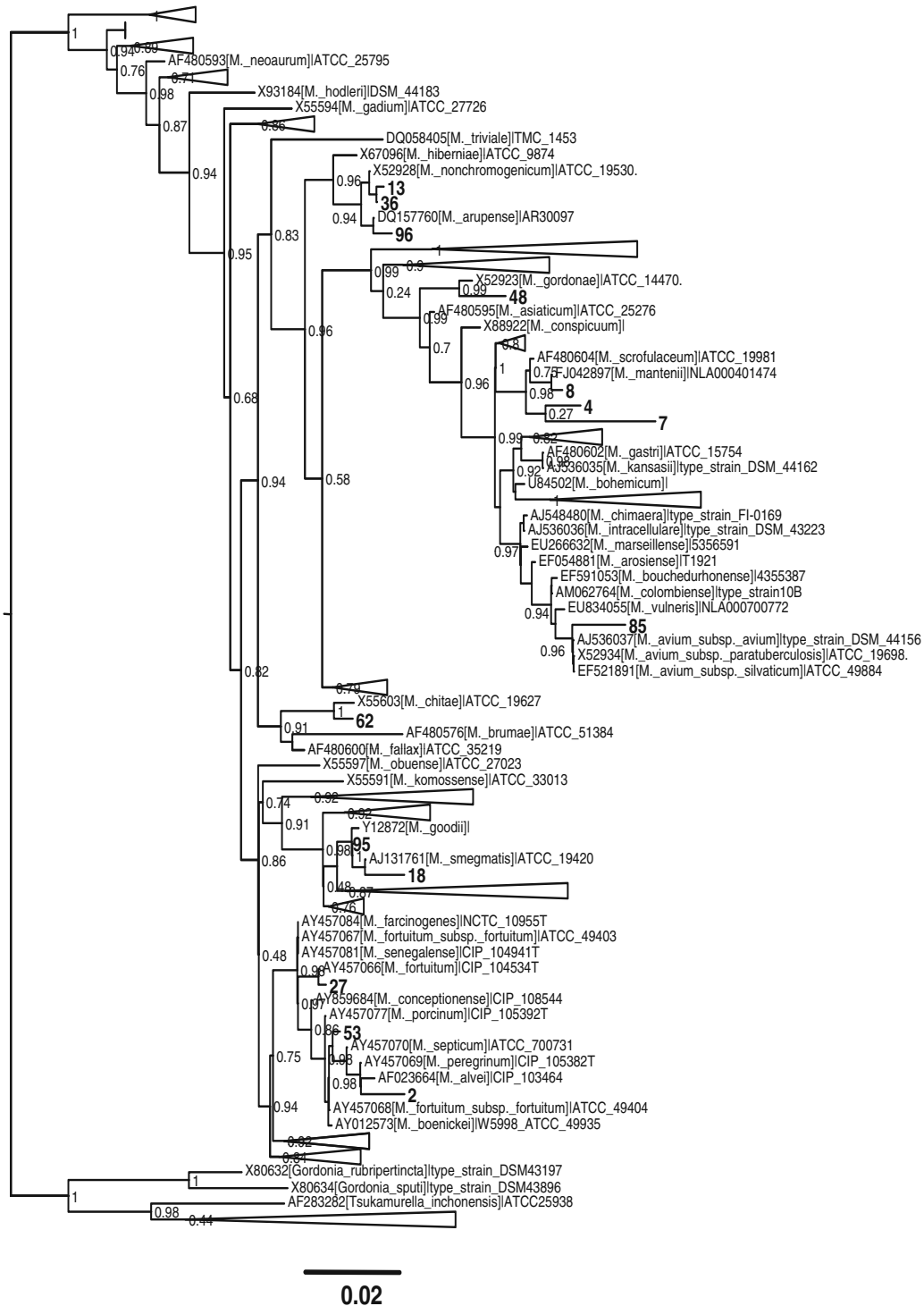


Figura 12. Filogenia de máxima similitud de la secuencia casi completa del gen *16S rRNA* recuperada a través del modelo GTR+G+I que mostró una inferencia de relación de los 14 aislados del medio ambiente con el uso de 131 secuencias de referencia de *Mycobacterium* y 8 secuencias de otros grupos que fueron *Gordonia*, *Dietzia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*. La mayoría de los clados se presentan de forma colapsada.

En un intento por mejorar la clasificación taxonómica de nuestros aislados de MNT, se realizó el análisis de criterio de optimización de máxima verosimilitud de la filogenia de *hsp65* y *rpoB* (Figuras 13 y 14).

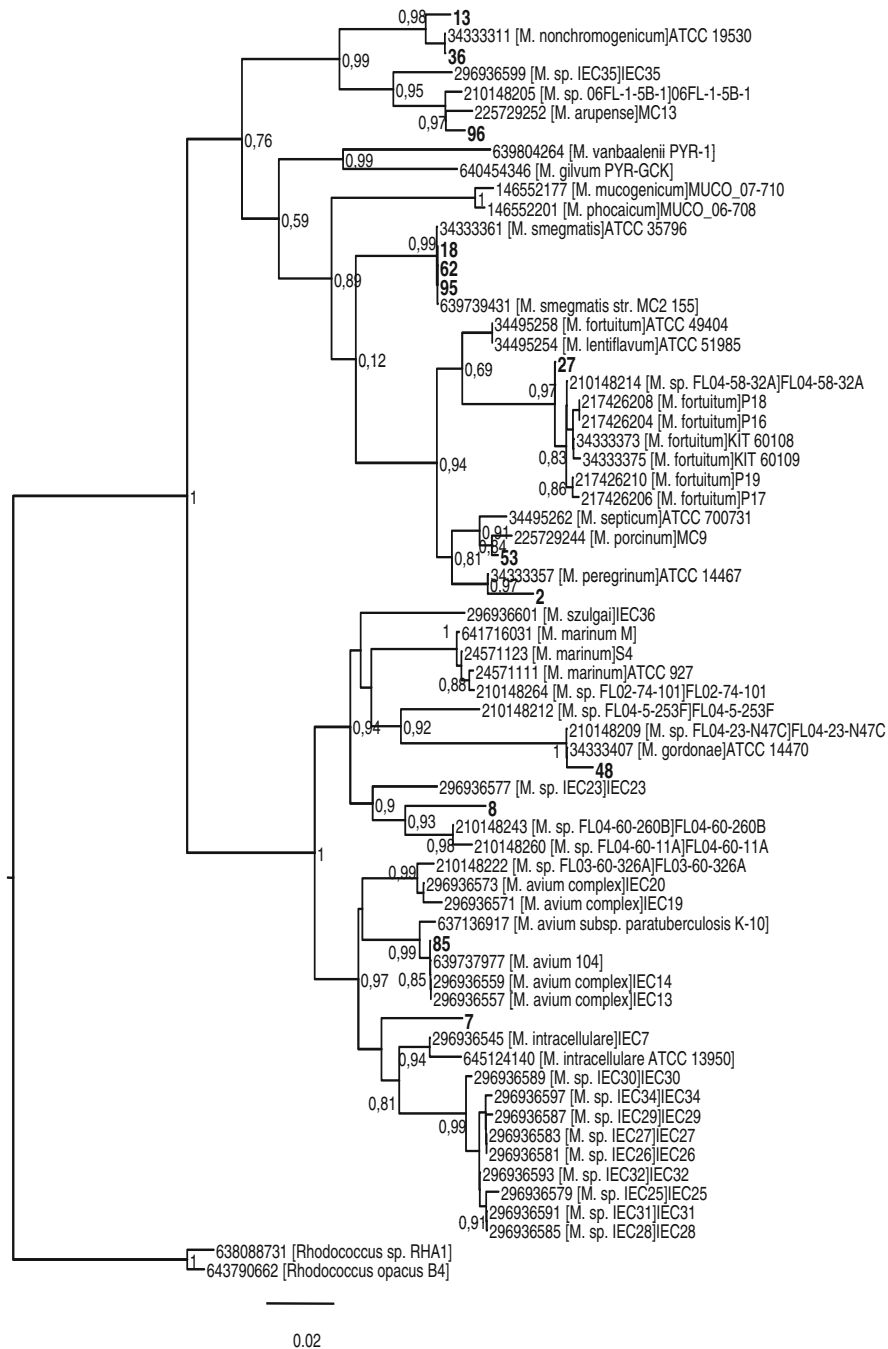


Figura 13. Árbol filogenético con base al gen *hsp65*.

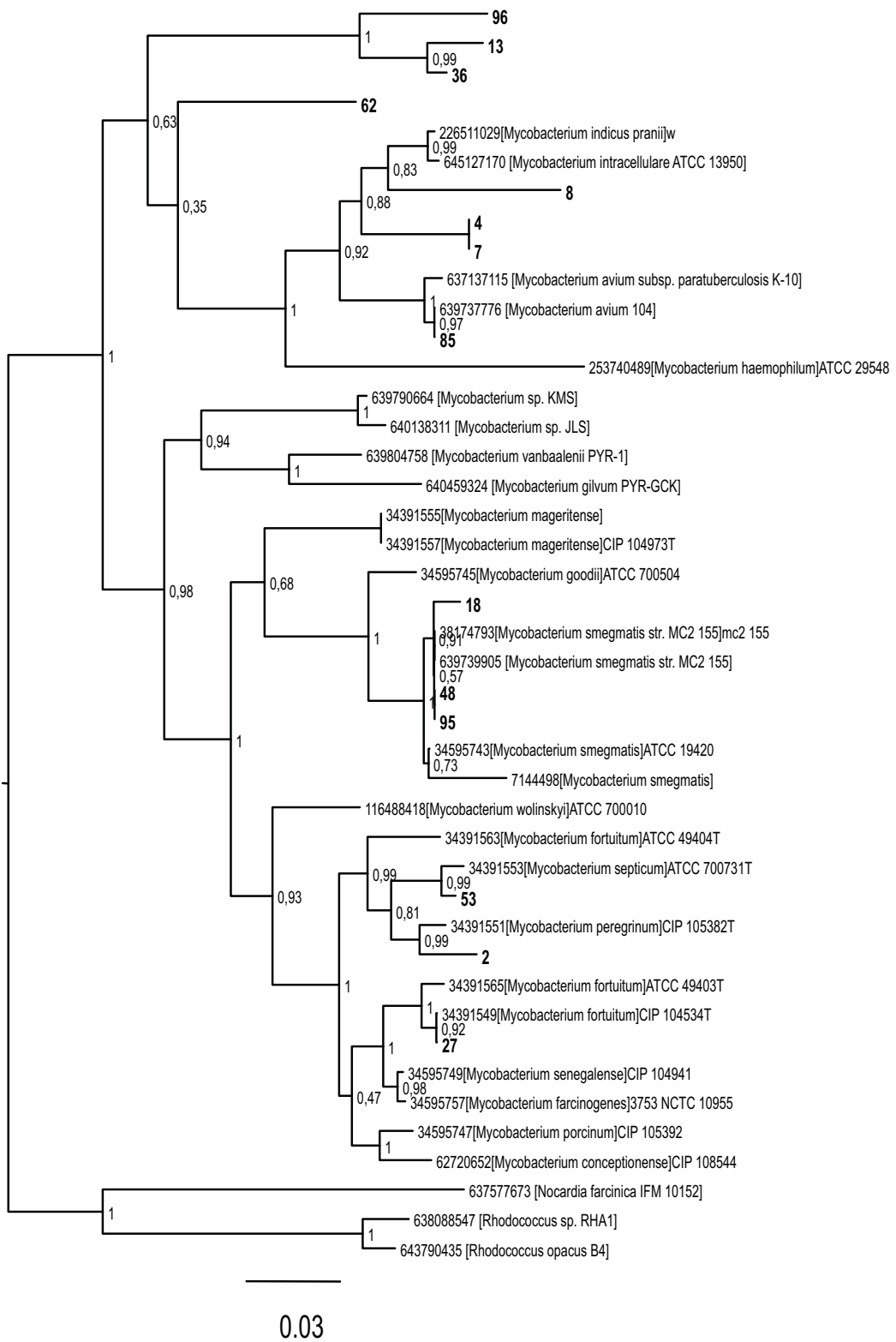


Figura 14. Árbol filogenético del gen *rpoB*.

En resumen, de los sistemas de distribución de agua de la ZMCM se aislaron 4 especies de MNT: *M. peregrinum*, *M. noncromogenicum*, *M. arupense* y *M. gordonae*, mientras que en el agua de reuso para riego se aislaron 8 especies bien definidas: *M. peregrinum*, *M. noncromogenicum*, *M. arupense*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. chitae*, *M. avium* y *M. gordonae*. Una cepa fue tentativamente identificada cercana al grupo *M. mantonii*/*M. scrofulaceum* y otra fue relacionada al grupo *M. porcinum*/*M. boenickei*.

Discusión

Este es el primer estudio que se realiza en México donde se evalúan tres ambientes acuáticos en dos áreas geográficas distantes. Este trabajo se enfocó en la búsqueda de MNT en tres diferentes sistemas de agua con características hidrológicas diferentes. Si bien ya existen reportes en el mundo de la presencia de MNT en el agua, el incremento constante en reportes de infecciones por MNT así como en el número y diversidad de las mismas, ha suscitado gran interés tanto en la identificación de la fuente de transmisión como, en las características fisiopatológicas que producen. En diferentes ocasiones fue señalado que una de las vías más importantes en la transmisión de MNT es el agua a pesar de que son pocos los autores que lo demuestran (El Shaly 2002). Por otro lado, resultados epidemiológicos y de distribución de las MNT son aislados. En nuestros hallazgos, los métodos de recuperación de MNT que utilizamos (NaOH y CPC) fueron similares. Los datos resultados obtenidos sugieren que con una concentración menor se recuperan mayor cantidad y variabilidad de MNT, sin embargo, para confirmar esto, se debe realizar una investigación que incluya frecuencia, estacionalidad y diferentes concentraciones.

La concentración del método descontaminante se debe seleccionar de acuerdo a las características del ambiente acuático, para el agua de los sistemas de distribución la concentración debe ser menor, mientras que para la

recuperación de MNT de cuerpos de agua altamente contaminados la concentración debe ser mayor y así se elimina la microbiota acompañante que obstaculiza el crecimiento de las MNT.

Agua del Río Cuítmala

Llama la atención la ausencia de MNT en agua superficial (río Cuítmala) ya que como fue reportado las MNT son ubicuas. Es importante mencionar que; dado que las MNT presentan características individuales y diferentes entre sí, existe la probabilidad de la presencia de MNT en éste subsistema de agua y que probablemente no sobrevivieron a los métodos de descontaminación utilizados. Para esclarecer la presencia o no de MNT en el río Cuítmala se debe aislar y amplificar el DNA ambiental.

Los valores de los parámetros físicoquímicos del río Cuítmala, cumplieron la norma Norma Oficial Mexicana NOM-127-ECOL-1997, no así la concentración de indicadores fecales y enterococos fecales ya que ambos parámetros excedieron los límites máximos permitidos en calidad de agua (0-UFC/100mL). La presencia

de indicadores fecales sugiere contaminación probablemente originada por las actividades propias de los pobladores como es la cría de ganado.

A pesar de que el promedio de la temperatura en los cinco sitios estudiados (27.5°C) del río Cuítmala fue aproximadamente 6°C superior a la de los otros cuerpos de agua, pensamos que no fue factor que afectara la presencia de MNT ya que el crecimiento *in vitro*, se da a temperaturas menores o mayores a la señalada.

Agua de los Sistemas de Distribución

Las condiciones que encontramos en agua de los sistemas de distribución nos muestra, una correlación negativa con la presencia de enterococos y coliformes fecales explicada por dos razones fundamentales: 1) la mayor parte del agua proviene de pozos con una profundidad de aproximadamente 100 m y 2) antes de enviarla a los sistemas de distribución es tratada con cloro por lo que son eliminadas prácticamente todas las bacterias coliformes. La temperatura del agua fue significativamente menor ($p < 0.01$) comparada con la temperatura del río Cuítmala, el cual es tropical en naturaleza y no afectó la sobrevivencia de las

MNT. Las especies de MNT aisladas en los sistemas de distribución de agua se acompañaron de pH neutro y temperatura promedio de 21°C. La presencia de *M. nonchromogenicum* y *M. peregrinum* en los sistemas de distribución de agua nos sugiere de su resistencia al cloro (método desinfectante de uso común en México y muchos otros países), así como a los métodos de descontaminación para su aislamiento ya que, estas especies se aislaron con los dos métodos y ambas concentraciones. *M. gordonae* se aisló con CPC (0.05 y 0.005%), no así con NaOH; esta especie, es conocida como contaminante de agua de uso y consumo humano ya que es aislada de agua de la llave tanto de casas como de hospitales. *M. gordonae* es medianamente resistente al cloro, aunque, 100 veces mas resistente que *E. coli* (Le Dantec 2002) y con respecto a su patogenicia, existen pocos casos en la literatura de infecciones en humanos por esta micobacteria.

Agua de reuso (canales de Xochimilco)

En agua superficial de reuso se aislaron todas las especies identificadas con excepción de *M. gordonae*. Este cuerpo de agua se caracterizó por una

temperatura de 20°C, pH que en promedio fue de 7.8 aunque, en algunos sitios fue detectado hasta 10.4. Este incremento en el pH puede indicar la presencia de fertilizantes que se sabe de su uso por horticultores de la región y limitantes para el crecimiento de organismos acuáticos. La conductividad fue uno de los parámetros físicos mas elevados, su incremento nos refleja la presencia de sales disueltas así como de materia orgánica e inorgánica y con frecuencia, éste parámetro es utilizado como una herramienta de peso para evaluar la calidad del agua. Este sistema de agua está acompañado de cuentas altas de coliformes fecales y enterococos fecales que junto con los valores de conductividad lo cataloga como un ecosistema con calidad de agua deficiente.

La presencia de MNT en sistemas de distribución de agua potable fue reportada por diferentes autores. La capacidad de algunas especies de micobacterias de resistir a los métodos de desinfección del agua como el cloro (desinfectante universalmente utilizado) y al ozono, así como a otros desinfectantes utilizados en hospitales, laboratorios o en casa-habitación fue señalado. La recuperación de MNT posterior a los métodos de desinfección disminuye ya que se sabe no todas las micobacterias presentan la misma resistencia a los diferentes agentes químicos, probablemente por sus diferencias en los componentes de su pared celular (Niederweis y col. 2010). La pared celular

de las micobacterias es una estructura muy importante para su supervivencia y persistencia en ambientes inhóspitos así como también a la resistencia a diferentes antibióticos. Reportes recientes mostraron la resistencia de MNT a diferentes antibióticos en especial a las de rápido crecimiento y muchas de estas resistencias son intrínsecas. Un resultado de interés en nuestros hallazgos es el aislamiento de *M. avium* de agua de reuso para riego, ya que se sabe que los aerosoles son un mecanismo de transmisión de micobacterias y por lo tanto un foco de infección. Las especies aisladas de los sistemas de distribución, *M. nonchromogenicum* y *M. arupense* pertenecen al mismo clado y se sabe de su capacidad de infectar al humano con deficiencia inmunológica. *M. peregrinum* y *M. gordonae* son especies que fueron aisladas por otros autores de diferentes fuentes de agua incluyendo en los sistemas de distribución y se consideran no patógenas para el hombre.

Filogenia de MNT

De interés en esta investigación, es la correcta caracterización de las especies de MNT, ya que su clasificación es complicada tanto a nivel de especie

como de subespecie. En septiembre del año 2011 se citaron 154 especies nuevas (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Todas las especies citadas fueron asociadas a la secuencia *16S rRNA*, siendo este marcador genético de mucho valor para colocar los nuevos aislados dentro de un amplio marco filogenético molecular, especialmente para confirmar la afiliación genérica y para una clasificación tentativa a nivel especie/complejo (Clarridge 2004). La alta conservación de las secuencias del gen *16S rRNA* impide con frecuencia la clasificación de cepas nuevas de MNT a nivel de especie por lo que emergió una nueva herramienta molecular como es el análisis de las secuencias multilocus (MLSA) como nuevo estándar en la sistemática molecular bacteriana (Vinuesa 2010). Este enfoque de múltiples genes mostró ser exitoso para la clasificación de diversas micobacterias tanto clínicas como de medio ambiente así como también mostró claramente una alta resolución taxonómica de la clasificación filogenética de nuevos aislados de MNT obtenidos por el análisis de las secuencias *hsp65* y *rpoB* al ser comparados con el gen *16S rRNA* (Adékambi 2004; Gomila 2007). (Figuras 12 y 13) Los dos genes son extensamente utilizados y validados para este propósito (Kim 2005) (Adékambi 2009). De hecho la clasificación de diversas cepas del medio ambiente fueron bien situadas en base a un lugar congruente dentro de un clado de especies bien resuelto sobre ambas filogenias. Por ejemplo las cepas de MNT 18 y

95 se encontraron claramente afiliados con *M. smegmatis*, una especie que fue claramente distinguida de *M. goodii* en ambos árboles filogenéticos (Figuras 12 y 13). De igual forma la cepa de MNT 2 fue afiliada sin ambigüedades con *M. peregrinum* en los árboles de *hsp65* y *rpoB* con un valor de soporte de 0.97 y 0.99, respectivamente. La cepa MNT 53, el otro miembro encontrado en el clado *M. porcínium*/*M. septicum*/*M. peregrinum*/*M. alvei* del 16S rRNA forma un clado fuertemente apoyado con *M. septicum* con un valor de soporte alto (0.99) en el árbol del *rpoB* sin tener una asociación importante con *M. porcínium* en el árbol de *hsp65* en donde este gen es incapaz de discriminarlo de *M. septicum* (Figura 14). Desafortunadamente, aún no hay secuencias disponibles para *M. porcínium* en el *rpoB* que sobrelapen con la región dirigida por los primers *rpoB_N326* y *rpoB2_C757* utilizados en este estudio (Figura 14).

Este estudio mostró claramente una resolución taxonómica alta de la clasificación filogenética de los nuevos aislados del medio ambiente

La combinación de éstos marcadores nos permitió clasificar sin ambigüedades a 8 de las 14 cepas de MNT a nivel de especie. Estas cepas fueron identificadas como *M. peregrinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. avium* ssp. *hominisuis*, *M. chitae* y *M. arupense*. Todas estas especies fueron aisladas previamente de diferentes fuentes de agua

incluyendo unidades de hemodiálisis de hospitales (Gomila 2007). Este estudio demuestra la amplia distribución geográfica de las MNT

El resto de los aislados de MNT de agua no fue clasificado sin ambigüedades, en primer lugar por la ausencia en las secuencias de referencias en el Banco de Genes que se sobrelapen con los fragmentos de los genes *hsp65* y *rpoB* secuenciados por nosotros, en especial las cepas de MNT 4, 7 y 8 y que se relacionaron cercanamente a *M. scrofulaceum* y *M. mantenii* en la filogenia con *16S rRNA*. La falta de cercanía y la superposición de las secuencias de referencia de MNT en el Banco de Genes fue particularmente limitado para la región del *rpoB* secuenciado por nosotros.

Hay 8 aislados que no presentaron homología cercana al *rpoB* disponible en el banco de datos para la región seleccionada por nuestros iniciadores. Esta situación no es tan limitante para el amplicón *hsp65*, aunque, para algunas especies tales como *M. arupense*, *M. scrofulaceum* o *M. mantenii* aún no tienen secuencias de *hsp65* depositadas en el banco de datos que sobrelapen con esta región seleccionada por los primers HSPF3 y HSPR4 usados en este estudio.

La situación de las infecciones por MNT en México son parecidas a las acontecidas en el resto del mundo (Molina-Gamboa 1996; Alvarado-Esquivel 2009)

donde algunas especies de MNT aisladas en algún tipo de agua probablemente son responsables de infecciones en pacientes de la misma región.

Las especies recuperadas de los sistemas de distribución de agua también se aislaron en agua de reuso para riego. La literatura nos señala que *M. nonchromogenicum* y *M. arupense* fueron aisladas de diferentes fuentes de agua así como de diferentes tejidos de pacientes infectados, se han relacionado más veces con tejido sinovial que con tejido pulmonar (Eskesen 2007). Las micobacterias de crecimiento rápido y ampliamente conocidas patógenos oportunistas (*M. fortuitum*) fueron aisladas de medio ambiente y de tejido de humano infectados con esta especie. Un estudio multicéntrico conducido por Esteban *y col* (Esteban 2008) mostró que *M. fortuitum* fue el patógeno oportunista aislado con más frecuencia en infecciones pulmonares, mientras que Thomson (Thomson 2010) reportó un incremento en la incidencia de infecciones por *M. fortuitum* por año.

En este estudio, aislamos de agua de reuso para riego una de las MNT más importantes en las patologías del humano a nivel mundial, *M. avium* ssp. *hominissuis* responsable de infecciones en diversos tejidos en el humano especialmente en pulmón y fuertemente asociada a linfadenitis a temprana edad (Bruijnesteijn Van Copenraet 2008; Cassidy 2009; Kaevska 2011).

CONCLUSIONES

1.- El agua de uso y consumo humano y el agua de reuso para riego en la ZMCM mostraron la presencia de MNT y esto implica un riesgo para la salud del humano.

2.- El aislamiento de MNT se realizó con NaOH y CPC en agua entubada para uso y consumo humano y en agua de reuso para riego por lo que se recomienda cualquiera de los dos métodos para recuperar micobacterias no tuberculosas de ambientes acuáticos.

3. Se debe estandarizar la concentración y el tiempo de uso de ambos métodos de recuperación de micobacterias de acuerdo a las características propias del ambiente acuático en estudio.

4.- La presencia de bacterias heterótrofas en el mismo tipo de agua donde se aislaron las MNT muestra que coexisten en equilibrio.

5.- La presencia de MNT de agua para uso y consumo humano de los sistemas de distribución sugiere que éstas son resistentes al cloro, desinfectante

utilizado en agua potable. Es necesario realizar las investigaciones pertinentes y demostrar tal posibilidad.

6.- El método molecular PCR-PRA con el gen *hsp65* para la identificación de MNT es altamente sensible y específico por lo que se recomienda su uso en actividades rutinarias y de investigación.

7. La identificación de especies y subespecies de las MNT se logró por el análisis individual de los árboles filogenéticos con los genes *16S RNA*, *hsp65* y *rpoB*. Los árboles filogenéticos separan claramente a las especies en dos grupos.
1) micobacterias de crecimiento rápido y 2) micobacterias de crecimiento lento.

8.- El número reducido de secuencias disponibles en la base de datos para el gen *rpoB* dió por resultado menor número de identificaciones de las especies de MNT por éste gen.

Perspectivas

Se debe evaluar la susceptibilidad al cloro de las MNT aisladas y confirmar su resistencia.

Sí se confirma la resistencia a los métodos de desinfección, las MNT deben ser incluidas como indicadores en agua para uso y consumo humano.

Para demostrar que la vía de transmisión es el agua es necesario confirmar por métodos moleculares que los aislamientos clínicos son la misma clona que los ambientales.

Se deben realizar diferentes investigaciones para evaluar la fisiopatogenia de las MNT aisladas de agua y emitir recomendaciones.

Referencias

1.- Griffith, D E. "Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease." *Current Opinion in Infectious Diseases* 23, no. 2 (2010): 185.

2.- Tortoli, E. "The New Mycobacteria: An Update." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 48, no. 2 (2006): 159-178.

3.- Leys, Natalie M, Annemie Ryngaert, Leen Bastiaens, Pierre Wattiau, Eva M Top, Willy Verstraete, and Dirk Springael. "Occurrence and Community Composition of Fast-Growing Mycobacterium in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *FEMS microbiology ecology* 51, no. 3 (2005): doi:10.1016/j.femsec.2004.09.015.

4.- Miller, C D, K Hall, Y N Liang, K Nieman, D Sorensen, B Issa, A J Anderson, and R C Sims. "Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading *Mycobacterium* Isolates From Soil." *Microbial ecology* 48, no. 2 (2004): doi:10.1007/s00248-003-1044-

5.- Kim, R D, D E Greenberg, M E Ehrmantraut, S V Guide, L Ding, Y Shea, M R Brown, M Chernick, W K Steagall, and C G Glasgow. "Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease: Prospective Study of a Distinct Preexisting Syndrome." *American journal of respiratory and critical care medicine* 178, no. 10 (2008): 1066.

6.- Piersimoni, C, and C Scarparo. "Extrapulmonary Infections Associated with Nontuberculous Mycobacteria in Immunocompetent Persons." *Emerging infectious diseases* 15, no. 9 (2009): 1351.

7.- Amorim, António, Rita Macedo, Arlinda Lopes, Irene Rodrigues, and Edna Pereira. "Non-Tuberculous Mycobacteria in HIV-Negative Patients with Pulmonary Disease in Lisbon, Portugal." *Scandinavian journal of infectious diseases* 42, no. 8 (2010): doi:10.3109/00365541003754485.

8.- Colombo, Rhonda E, Suvimol C Hill, Reginald J Claypool, Steven M Holland, and Kenneth N Olivier. "Familial Clustering of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease." *Chest* 137, no. 3 (2010): doi:10.1378/chest.09-1173.

9.- Molina-Gamboa, J D, S Ponce-de-León, J Sifuentes-Osornio, M B del Valle, and G M Ruiz-Palacios. "Mycobacterial Infection in Mexican AIDS Patients." *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 11, no. 1 (1996): 53.

10.- Versalovic, J. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, 201

11.- Griffith, D E, T Aksamit, B A Brown-Elliott, A Catanzaro, C Daley, F Gordin, S M Holland, R Horsburgh, G Huitt, and M F Iademarco. "An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous

Mycobacterial Diseases." *American journal of respiratory and critical care medicine* 175, no. 4 (2007): 3

12.- Duval, C W. "Studies in atypical forms of tubercle bacilli isolated directly from the human tissues in cases of primary cervical adenitis." *The Journal of experimental medicine* 11, no. 3 (1909): 403.

13.- Wolinsky, E. "Nontuberculous Mycobacteria and Associated Diseases." *The American review of respiratory disease* 119, no. 1 (1979): 107-59.

14.- Jarzembowski, J A, and M B Young. "Nontuberculous Mycobacterial Infections." *Archives of pathology & laboratory medicine* 132, no. 8 (2008): 1333-1341.

15.- Le Dantec, Corinne, Jean-Pierre Duguet, Antoine Montiel, Nadine Dumoutier, Sylvie Dubrou, and Véronique Vincent. "Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated From a Water Distribution System." *Applied and environmental microbiology* 68, no. 3 (2002): 1025-32.

16.- Schwartz, T, S Hoffmann, and U Obst. "Formation of Natural Biofilms During Chlorine Dioxide and UV Disinfection in a Public Drinking Water Distribution System." *Journal of applied microbiology* 95, no. 3 (2003): 591-601.

17.- Falkinham, Joseph O. "Factors Influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*." *Applied and environmental microbiology* 69, no. 9 (2003): 5685-9.

18.- Falkinham, J O. "Surrounded by Mycobacteria: Nontuberculous Mycobacteria in the Human Environment." *Journal of applied microbiology* 107, no. 2 (2009): doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x.

19.- Torvinen, Eila, Sini Suomalainen, Markku J Lehtola, Ilkka T Miettinen, Outi Zacheus, Lars Paulin, Marja-Leena Katila, and Pertti J Martikainen. "Mycobacteria in Water and Loose Deposits of Drinking Water Distribution Systems in Finland." *Applied and environmental microbiology* 70, no. 4 (2004): 1973-81.

20.- Williams, Margaret M, Mitchell A Yakrus, Matthew J Arduino, Robert C Cooksey, Christina B Crane, Shailen N Banerjee, Elizabeth D Hilborn, and Rodney M Donlan. "Structural Analysis of Biofilm Formation by Rapidly and Slowly Growing Nontuberculous Mycobacteria." *Applied and environmental microbiology* 75, no. 7 (2009): doi:10.1128/AEM.00166-09.

21.- Chatterjee, D, and P J Brennan. "Glycosylated Components of the Mycobacterial Cell Wall: Structure and Function." *Microbial glycobiology: structures, relevance and applications* (2009): 147.

22.- Niederweis, Michael, Olga Danilchanka, Jason Huff, Christian Hoffmann, and Harald Engelhardt. "Mycobacterial Outer Membranes: In Search of Proteins." *Trends in microbiology* 18, no. 3 (2010): doi:10.1016/j.tim.2009.12.005.

23.- Esteban, J, N Z Martín-de-Hijas, A-I Fernandez, R Fernandez-Roblas, I Gadea, and Madrid Study Group of Mycobacteria. "Epidemiology of Infections Due to Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria Diagnosed in An Urban Area." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 27, no. 10 (2008): doi:10.1007/s10096-008-0521-7.

24.- Billinger, Megan E, Kenneth N Olivier, Cecile Viboud, Ruben Montes de Oca, Claudia Steiner, Steven M Holland, and D Rebecca Prevots. "Nontuberculous Mycobacteria-Associated Lung Disease in Hospitalized Persons, United States, 1998-2005." *Emerging infectious diseases* 15, no. 10 (2009): doi:10.3201/eid1510.090196.

25.- Thomson, Rachel M, and NTM working group at Queensland TB Control Centre and Queensland Mycobacterial Reference Laboratory. "Changing Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria Infections." *Emerging infectious diseases* 16, no. 10 (2010): doi:10.3201/eid1610.091201.

26.- Winthrop, K L, E McNelley, B Kendall, A Marshall-Olson, C Morris, M Cassidy, A Saulson, and K Hedberg. "Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Clinical Features: An Emerging Public Health Disease." *American journal of respiratory and critical care medicine* 182, no. 7 (2010): 977.

27.- Covert, T C, M R Rodgers, A L Reyes, and G N Stelma Jr. "Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples." *Applied and environmental microbiology* 65, no. 6 (1999): 2492.

28.- Wallace, John R, Matthew C Gordon, Lindsey Hartsell, Lydia Mosi, M Eric Benbow, Richard W Merritt, and Pamela L C Small. "Interaction of *Mycobacterium ulcerans* with Mosquito Species: Implications for Transmission and Trophic Relationships." *Applied and environmental microbiology* 76, no. 18 (2010): doi:10.1128/AEM.00340-10.

29.- Steinert, M, K Birkness, E White, B Fields, and F Quinn. "*Mycobacterium avium* Bacilli Grow Saprozoically in Coculture with *Acanthamoeba*

Polyphaga and Survive Within Cyst Walls." *Applied and environmental microbiology* 64, no. 6 (1998): 2256-61.

30.- van Ingen, Jakko, Henk J Wisselink, Conny B van Solt-Smits, Martin J Boeree, and Dick van Soolingen. "Isolation of Mycobacteria Other Than *Mycobacterium avium* From Porcine Lymph Nodes." *Veterinary microbiology* 144, no. 1-2 (2010): doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.047.

31.- Katoch, V M. "Infections Due to Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM)." *Indian Journal of Medical Research* 120 (2004): 290-304.

32.- Mediel, M J, V Rodriguez, G Codina, and N Martin-Casabona. "Isolation of Mycobacteria From Frozen Fish Destined for Human Consumption." *Applied and environmental microbiology* 66, no. 8 (2000): 3637-8.

33.- Sexton, P, and A C Harrison. "Susceptibility to Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease." *European Respiratory Journal* 31, no. 6 (2008): 1322-1333.

34.- Cook, James L. "Nontuberculous Mycobacteria: Opportunistic Environmental Pathogens for Predisposed Hosts." *British medical bulletin* 96 (2010): doi:10.1093/bmb/ldq035.

35.- Field, S K, D Fisher, and R L Cowie. "Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease in Patients Without HIV Infection*." *Chest* 126, no. 2 (2004): 566-581.

36.- Bodle, E E, J A Cunningham, P Della-Latta, N W Schluger, and L Saiman. "Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in Patients Without HIV Infection, New York City." *Emerging infectious diseases* 14, no. 3 (2008): 390.

37.- Piersimoni, Claudio, and Claudio Scarparo. "Pulmonary Infections Associated with Non-Tuberculous Mycobacteria in Immunocompetent Patients." *The Lancet infectious diseases* 8, no. 5 (2008): doi:10.1016/S1473-3099(08)70100-2.

38.- Al-Mahruqi, Sara H, Jakko van-Ingen, Suleiman Al-Busaidy, Martin J Boeree, Samiya Al-Zadjali, Arti Patel, P N Richard-Dekhuijzen, and Dick van Soolingen. "Clinical Relevance of Nontuberculous Mycobacteria, Oman." *Emerging infectious diseases* 15, no. 2 (2009): 292-4.

39.-Cassidy, P Maureen, Katrina Hedberg, Ashlen Saulson, Erin McNelly, and Kevin L Winthrop. "Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology." *Clinical infectious diseases : an official*

publication of the Infectious Diseases Society of America 49, no. 12 (2009):
doi:10.1086/648443.

40.- Brandt, Lise, Joana Feino Cunha, Anja Weinreich Olsen, Ben Chilima, Penny Hirsch, Rui Appelberg, and Peter Andersen. "Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine: Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis." *Infection and immunity* 70, no. 2 (2002): 672-88.

41.-Young, Sarah L, Lynn Slobbe, Rachel Wilson, Bryce M Buddle, Geofferey W de Lisle, and Glenn S Buchan. "Environmental Strains of *Mycobacterium avium* Interfere with Immune Responses Associated with *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination." *Infection and immunity* 75, no. 6 (2007):
doi:10.1128/IAI.01826-06.

42.- Mendoza-Coronel, Elizabeth, Rosa Camacho-Sandoval, Laura C Bonifaz, and Yolanda López-Vidal. "PD-L2 Induction on Dendritic Cells Exposed to *Mycobacterium avium* Downregulates BCG-Specific T Cell Response." *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 91, no. 1 (2011): doi:10.1016/j.tube.2010.11.008.

43.- Corbett, E L, L Blumberg, G J CHURCHYARD, N Moloí, K Mallory, T Clayton, B G WILLIAMS, R E Chaisson, R J Hayes, and K M DE COCK. "Nontuberculous Mycobacteria. Defining Disease in a Prospective Cohort of South African Miners." *American journal of respiratory and critical care medicine* 160, no.1 (1999): 15.

44.- Baquero-Artigao, F. "Infección Pediátrica Por Micobacterias No Tuberculosas." In *Anales De Pediatría*. 2005.

45.- Best, Corliss A, and Timothy J Best. "*Mycobacterium smegmatis* Infection of the Hand." *Hand (New York, N.Y.)* 4, no. 2 (2009): doi:10.1007/s11552-008-9147-6.

46.- Leoní, E, P Legnaní, M T Muccí, and R Pirani. "Prevalence of Mycobacteria in a Swimming Pool Environment." *Journal of applied microbiology* 87, no. 5 (1999): 683-688.

47.- Bland, C S, J M Ireland, E Lozano, M E Alvarez, and T P Primm. "Mycobacterial Ecology of the Rio Grande." *Applied and environmental microbiology* 71, no. 10 (2005): 5719.

48.- Castillo-Rodal, A I, M Mazari-Hiriart, L T Lloret-Sánchez, B Sachman-Ruiz, P Vinuesa, and Y López-Vidal. "Potentially Pathogenic Nontuberculous

Mycobacteria Found in Aquatic Systems. Analysis From a Reclaimed Water and Water Distribution System in Mexico City." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology (2011) doi:10.1007/s10096-011-1359-y.

49.- Mangione, E J, G Huitt, D Lenaway, J Beebe, A Bailey, M Figoski, M P Rau, K D Albrecht, and M A Yakrus. "Nontuberculous Mycobacterial Disease Following Hot Tub Exposure." *Emerging infectious diseases* 7, no. 6 (2001): 1039-42.

50.- El Sahly, Hana M, Edward Septimus, Hanna Soini, Joshua Septimus, Richard J Wallace, Xi Pan, Natalie Williams-Bouyer, James M Musser, and Edward A Graviss. "*Mycobacterium simiae* Pseudo-Outbreak Resulting From a Contaminated Hospital Water Supply in Houston, Texas." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35, no. 7 (2002): doi:10.1086/342331.

51.- Hilborn, E D, T C Covert, M A Yakrus, S I Harris, S F Donnelly, E W Rice, S Toney, S A Bailey, and G N Stelma Jr. "Persistence of Nontuberculous Mycobacteria in a Drinking Water System After Addition of Filtration Treatment." *Applied and environmental microbiology* 72, no. 9 (2006): 5864-5869.

52.- Gomila, Margarita, Antonio Ramirez, and Jorge Lalucat. "Diversity of Environmental *Mycobacterium* Isolates From Hemodialysis Water As Shown by a Multigene Sequencing Approach." *Applied and environmental microbiology* 73, no. 12 (2007): doi:10.1128/AEM.02934-06.

53.- du Moulin, G C, and K D Stottmeier. "Use of Cetylpyridinium Chloride in the Decontamination of Water for Culture of Mycobacteria." *Applied and environmental microbiology* 36, no. 5 (1978): 771-3.

54.- Kamala, T, C N Paramasivan, D Herbert, P Venkatesan, and R Prabhakar. "Evaluation of Procedures for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria From Soil and Water." *Applied and environmental microbiology* 60, no. 3 (1994): 1021-4.

55.- Parashar, Deepti, D S Chauhan, V D Sharma, Aradhana Chauhan, S V S Chauhan, and V M Katoch. "Optimization of Procedures for Isolation of Mycobacteria From Soil and Water Samples Obtained in Northern India." *Applied and environmental microbiology* 70, no. 6 (2004): doi:10.1128/AEM.70.6.3751-3753.2004.

56.- Radomski, Nicolas, Emmanuelle Cambau, Laurent Moulin, Sophie Haenn, Régis Moilleron, and Françoise S Lucas. "Comparison of Culture Methods

for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria From Surface Waters." *Applied and environmental microbiology* 76, no. 11 (2010): doi:10.1128/AEM.02659-09.

57.- Dag Harmsen, Stefan Dostal, , Andreas Roth , Stefan Niemann, Jörg Rothgänger, Michael Sammeth, Jürgen Albert, Matthias Frosch and Elvira Richter. RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species *BMC Infectious Diseases* 2003, 3:26

58.- Weisburg, W G, S M Barns, D A Pelletier, and D J Lane. "16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study." *Journal of bacteriology* 173, no. 2 (1991): 697-703.

59.- Tortoli, Enrico, Monica Pecorari, Giuliana Fabio, Massimino Messinò, and Anna Fabio. "Commercial DNA Probes for Mycobacteria Incorrectly Identify a Number of Less Frequently Encountered Species." *Journal of clinical microbiology* 48, no. 1 (2010): doi:10.1128/JCM.01536-09.

60.- Telenti, A, F Marchesi, M Balz, F Bally, E C Böttger, and T Bodmer. "Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis." *Journal of clinical microbiology* 31, no. 2 (1993): 175-178.

61.- Brunello, F, M Ligozzi, E Cristelli, S Bonora, E Tortoli, and R Fontana. "Identification of 54 Mycobacterial Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* Gene." *Journal of clinical microbiology* 39, no. 8 (2001): doi:10.1128/JCM.39.8.2799-2806.2001.

62.- Miller, L P, J T Crawford, and T M Shinnick. "The *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38, no. 4 (1994): 805.

63.- Sintchenko, V, P J Jelfs, W K Chew, and G L Gilbert. "*Mycobacterium tuberculosis rpoB* Gene DNA Sequencing: Implications for Detection of Rifamycin Resistance." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44, no. 2 (1999): 294.

64.- Mazari-Hiriart, Marisa, Yolanda López-Vidal, Sergio Ponce-de-León, Juan José Calva, Francisco Rojo-Callejas, and Gonzalo Castillo-Rojas. "Longitudinal Study of Microbial Diversity and Seasonality in the Mexico City Metropolitan Area Water Supply System." *Applied and environmental microbiology* 71, no. 9 (2005): doi:10.1128/AEM.71.9.5129-5137.2005.

65.- Mazari-Hiriart, Marisa, Sergio Ponce-de-León, Yolanda López-Vidal, Pilar Islas-Macías, Rosa Isabel Amieva-Fernández, and Francisco Quiñones-

Falconí. "Microbiological Implications of Periurban Agriculture and Water Reuse in Mexico City." *PloS one* 3, no. 5 (2008): doi:10.1371/journal.pone.0002305.

66.- Contreras-Moreira, Bruno, Bernardo Sachman-Ruiz, Irais Figueroa-Palacios, and Pablo Vinuesa. "Primers4Clades: A Web Server That Uses Phylogenetic Trees to Design Lineage-Specific PCR Primers for Metagenomic and Diversity Studies." *Nucleic acids research* 37, no. Web Server issue (2009): doi:10.1093/nar/gkp377.

67.- Kim, H, S H Kim, T S Shim, M Kim, G H Bai, Y G Park, S H Lee, G T Chae, C Y Cha, and Y H Kook. "Differentiation of *Mycobacterium* Species by Analysis of the Heat-Shock Protein 65 Gene (Hsp65)." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, no. 4 (2005): 1649-1656.

68.- Vinuesa, Pablo, Keilor Rojas-Jiménez, Bruno Contreras-Moreira, Suresh K Mahna, Braj Nandan Prasad, Hla Moe, Suresh Babu Selvaraju, Heidemarie Thierfelder, and Dietrich Werner. "Multilocus Sequence Analysis for Assessment of the Biogeography and Evolutionary Genetics of Four Bradyrhizobium Species That Nodulate Soybeans on the Asiatic Continent." *Applied and environmental microbiology* 74, no. 22 (2008): doi:10.1128/AEM.00875-08.

69.- Adékambi, T, M Drancourt, and D Raoult. "The RpoB Gene As a Tool for Clinical Microbiologists." *Trends in microbiology* 17, no. 1 (2009): 37-45.

70.- Clarridge, Jill E. "Impact of 16S Rrna Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases." *Clin Microbiol Rev* 17, no. 4 (2004): doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.

71.- Vinuesa, P. "Multilocus Sequence Analysis and Bacterial Species Phylogeny." *Molecular phylogeny of microorganisms* (2010): 41.

72.- Adékambi, Toidí, and Michel Drancourt. "Dissection of Phylogenetic Relationships Among 19 Rapidly Growing *Mycobacterium* Species by 16S rRNA, Hsp65, Soda, RecA and RpoB Gene Sequencing." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54, no. Pt 6 (2004): doi:10.1099/ijs.0.63094-0.

73.- Alvarado-Esquivel, Cosme, Nora García-Corral, David Carrero-Domínguez, José Antonio Enciso-Moreno, Teodoro Gurrola-Morales, Leopoldo Portillo-Gómez, Rudí Rossau, and Wouter Mijls. "Molecular Analysis of *Mycobacterium* Isolates From Extrapulmonary Specimens Obtained From Patients in Mexico." *BMC Clin Pathol* 9 (2009): doi:10.1186/1472-6890-9-1.

74.- Eskesen, Arne Nørgaard, Inge Skræmm, and Martin Steinbakk. "Infectious Tenosynovitis and Osteomyelitis Caused by *Mycobacterium nonchromogenicum*." *Scandinavian journal of infectious diseases* 39, no. 2 (2007):

75.- Bruijnesteijn van Coppentraet, L E S, P E W de Haas, J A Lindeboom, E J Kuijper, and D Van Soolingen. "Lymphadenitis in Children Is Caused by *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and Not Related to Bird Tuberculosis." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 27, no. 4 (2008): 293-299.

76.- Cassidy, P Maureen, Katrina Hedberg, Ashlen Saulson, Erin McNelly, and Kevin L Winthrop. "Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49, no. 12 (2009)

77.- Kaevska, Marija, Iva Slana, Petr Kralik, Udo Reischl, Jaroslava Orosova, Alena Holcikova, and Ivo Pavlik. "'*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*' in Neck Lymph Nodes of Children and Their Environment Examined by Culture and Triplex Quantitative Real-Time PCR." *Journal of clinical microbiology* 49, no. 1 (2011)

78.- Victoria J. Cook,¹ Christine Y. Turenne,^{2*} Joyce Wolfe,^{2,3} Ryan Pauls,⁴ and Amin Kabani Conventional Methods versus 16S Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Nontuberculous Mycobacteria: Cost Analysis. *Journal Of Clinical Microbiology*, Mar. 2003, p. 1010–1015 Vol. 41, No. 3

79.- U.S. Environmental Protection Agency. 2005. Drinking water contaminant candidate list 2; final notice. *Fed. Register* 70:9071–9077.