

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Uno de los principales reservorios de micobacterias no tuberculosas (MNT) es el agua, las cuales representan un riesgo potencial para la salud humana, reflejándose en el aumento de la prevalencia de enfermedades causadas por MNT en humanos, particularmente en individuos inmunocomprometidos.

**Objetivos:** Identificar a nivel de especie las Micobacterias No Tuberculosas mediante el uso del método convencional y molecular presentes en muestras de agua de la Universidad del Quindío.

**Metodología:** Se investigaron 100 muestras de agua de grifos, cultivándolas en Lowenstein-Jensen a diferentes temperaturas. Las muestras con crecimiento positivo se tiñeron con coloración Ziehl Neelsen. La identificación fenotípica se realizó por la metodología internacionalmente utilizada para identificar micobacterias descrita por el CDC de Atlanta y mediante la amplificación por PCR y restricción del gen *hsp65* (PRA)

**Resultados:** Se obtuvo crecimiento en 16 muestras, las cuales fueron positivas a la baciloscopia para BAAR. La identificación de 11 de los aislados de MNT según sus reacciones fenotípicas indicó la presencia de 9 aislados de *Mycobacterium gordonae* y 2 de *Mycobacterium scrofulaceum*. 5 muestras con crecimiento de BAAR no pudieron ser identificadas: 1 por presentar contaminación y 4 no crecieron en los medios para identificación.

Los resultados obtenidos con la identificación genotípica mostraron la presencia de 6 *Mycobacterium gordonae*-3 y 3 *Mycobacterium gordonae*-8; además 2 de *Mycobacterium scrofulaceum*-1.

**Conclusiones:** Aunque las especies encontradas en este estudio no están descritas como patógenas, se constituyen en un riesgo potencial para el desarrollo de infecciones, especialmente en personas inmunocomprometidas y por lo tanto

consideramos necesario continuar los estudios enfocándolos en el análisis del impacto de estas especies en la salud humana.

Palabras claves: Micobacterias No tuberculosas, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, identificación fenotípica y genotípica, PRA.

.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las especies de Micobacterias diferentes a las que componen el complejo *Mycobacterium tuberculosis* son llamadas Micobacterias no tuberculosas (MNT). Algunas de estas especies pueden ser patógenos para el ser humano, causando enfermedades pulmonares, linfadenitis, úlceras de piel e infecciones en heridas de tejido blando y también se han asociado a infecciones nosocomiales. (1, 5,6)

Las MNT se encuentran generalmente en el ambiente como el suelo, agua, animales domésticos y de hábito silvestre, en leche y diferentes alimentos; su principal reservorio en la mayoría de estas fuentes es el agua. (5, 9,12)

Diversos estudios demuestran que están presentes en el agua dulce y de mar, donde los factores geográficos como composición química del suelo, pH, humedad, temperatura, etc., juegan un papel importante para su presencia.

En los hábitats artificiales creados por el hombre como estanques, sistemas de suministro de aguas, piscina, duchas etc., también se han podido aislar MNT. (3,23,26,27). En el caso del complejo *Mycobacterium avium* son los grifos de agua, habiéndose descrito, incluso, epidemias nosocomiales de enfermedad diseminada en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, (SIDA) por transmisión a través de grifos del hospital. (49). Por su parte, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae* se han aislado de forma repetida en sistemas de conducción de agua y grifos; y *Mycobacterium xenopi*, al necesitar temperaturas superiores a 28 °C para su crecimiento, se aísla casi exclusivamente del agua caliente o sus sistemas de conducción, hecho que podría asociarse a infecciones intrahospitalarias. *Mycobacterium marinum* tiene su reservorio y se transmite a través del agua salada, pescado fresco, agua embalsada y piscinas, mientras que las MNT de crecimiento rápido, como *Mycobacterium fortuitum*, y *Mycobacterium chelonae* se pueden aislar de la tierra y del agua. (2)

Esta alta prevalencia en los grifos de agua potable se puede deber a que las Micobacterias no mueren comúnmente a la desinfección y pueden tolerar grandes

rangos de pH, resistencia al cloro, formación de biopelículas y las temperaturas, son factores relacionados a la supervivencia que posiblemente sea un mecanismo de persistencia de las MNT en los sistemas de agua potable por largos periodos de tiempo. (3)

Inicialmente en este estudio se registraron 201 grifos en la Universidad del Quindío, de los cuales se tomó una muestra de 100 grifos por triplicado de los mismos en las diferentes instalaciones de la universidad.

De la anterior muestra se observó crecimiento en 16 muestras de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) que se determinaron por la técnica de coloración Zielh Nielsen.

Dada la importancia de reconocer estas cepas a nivel de especie, nos propusimos identificar estos aislamientos mediante técnicas bioquímicas convencionales y la técnica de Amplificación y restricción del gen *hsp65* basada en PCR. (PRA)

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

Identificación de Micobacterias No Tuberculosas en Sistemas de Distribución de Agua Potable (SDAP) de la Universidad del Quindío mediante el uso del método convencional y molecular.

#### **3.2 Específicos**

- ❖ Determinar la presencia de MNT potencialmente patógenas en las fuentes hídricas de la universidad y analizar sus posibles efectos en la salud de la comunidad universitaria.
- ❖ Identificar por pruebas convencionales los aislados de BAAR de grifos y SDAP de la universidad del Quindío.
- ❖ Utilizar el método molecular PRA para la identificación genotípica de los BAAR aislados.
- ❖ Consolidar el banco de cepas de MNT del Centro de Investigaciones Biomédicas.
- ❖ Implementar una ayuda educativa para la divulgación del riesgo potencial para la salud humana de las MNT asociadas a SDAP.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades producidas por las MNT son un problema de salud asociado a altos índices de VIH tanto en países en desarrollo como en países desarrollados.

En el municipio de Armenia las tasas de incidencia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) son de 2.1 por 10.000 habitantes. El grupo de edad mayormente afectado se encuentra entre los 25 y 34 años, cuyo grado de escolaridad a nivel universitario es del 14% y el 4% con formación técnica.

La identificación de especies Micobacterias No Tuberculosas (MNT) en Colombia, ha sido realizada tradicionalmente por el laboratorio de referencia del Instituto Nacional de Salud. Estas pruebas se basan principalmente en las características fenotípicas tales como: morfología de las colonias, velocidad de crecimiento, temperatura, pigmentación, diferencias metabólicas y adicionalmente en once reacciones químicas que muestran variabilidad entre las especies. Esta metodología aunque es la convencional, requiere de personal capacitado, y requieren de tiempo; aun así los resultados pueden llegar a ser confusos puesto que existen reacciones que son compartidas entre especies y el riesgo de contaminación es alto.

Otro método que puede ser usado, es el descrito por Telenti y colaboradores en 1993 (1) denominado PRA, cuya metodología se basa en las características genotípicas y la observación de diferencias en los patrones de corte generados en el gen *hsp65* que codifica para una proteína de choque térmico de 65 kilo Daltons (kD) por el uso de dos enzimas de restricción diferentes y su posterior comparación utilizando la base de datos PRASITE. Las ventajas del uso de esta metodología son: mayor rapidez, especificidad y menor costo.

La utilización de esta metodología en el Centro de investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío busca establecer una identificación altamente específica y rápida de las especies de micobacterias aisladas en los sistemas de distribución de agua potable de la Universidad del Quindío, así como estimar el impacto de las especies identificadas como potenciales generadores de infecciones y los posibles efectos en la salud de la comunidad universitaria.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las Micobacteriosis son enfermedades causadas por Micobacterias diferentes a las del complejo *Mycobacterium tuberculosis* han aumentado en los últimos años, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Muchas de las especies de MNT que pueden llegar a ser patógenas para el hombre han sido aisladas del agua, representando uno de los principales reservorios y la vía de infección más común.

En un estudio preliminar realizado como parte del ejercicio de formación de semilleros de investigación, se tomaron muestras de los grifos de agua de distintas instalaciones de la Universidad del Quindío. A pesar de haberse aislado BAAR de estas fuentes de agua, no fue posible completar su identificación debido a que las muestras presentaron contaminación con otras bacterias y principalmente por que no se realizo la estandarización de los métodos convencionales y moleculares necesarios para su identificación genotípica y fenotípica.

Es importante la identificación de las micobacterias en los SDAP, ya que el desconocimiento de la verdadera prevalencia de las enfermedades producidas por MNT puede deberse a que no son reportadas en muchos países, probablemente debido a la falta de claridad de su significancia clínica, o porque no existen facilidades para hacer su diagnostico e identificación o simplemente se subestima la prevalencia real porque la enfermedad no es contagiosa.

Dado el potencial de las MNT para generar infecciones es necesario que estas técnicas se coloquen al servicio de la comunidad para evitar un problema de salud pública, no solo universitaria sino en a toda la población en general, y en especial las persona vulnerables a la infección.



## 6. ESTADO DEL ARTE

Los primeros informes del aislamiento en SDAP aparecieron a principios de los años 1900 (4). Las MNT son capaces de crecer en SDAP, (4, 12, 19, 20, 22, 27,36) encontrándose principalmente *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium Kansasii*, y *Mycobacterium Xenopi*. (4) Otros estudios han encontrado diferentes especies además de estas en los SDAP como son *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, y especies saprofitas como *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium gadium*. (18, 19,20) Además por lo menos 33 de 100 especies descritas taxonómicamente pueden ser encontradas en los sistemas de distribución de agua.

También se ha estudiado la presencia de MNT en sitios como piscinas (23,32 ,37), y en elementos de consumo humano como agua embotellada, y muestras de hielo. En maquinas de hielo de hospital se ha aislado *M. fortuitum* y *M. gordonae*. (22)

En un estudio se analizaron los sistemas de distribución de agua potable, además de analizar los depósitos sueltos acumulados. Cubriendo 16 sistemas en ocho localidades. Se encontró que la frecuencia de aislamiento de micobacterias aumento del 35% en la central depuradora al 80% en el sistema y el número de micobacterias en las muestras positivas aumento de 15 a 140 unidades formadoras de colonias (CFU)/litro, respectivamente, adicionalmente el número de Micobacterias eran altos tanto en depósitos viejos como en nuevos. Más del 90% de las Micobacterias aisladas de depósitos de agua perteneció a *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium tusciae*, *Mycobacterium gordonae* y un grupo no clasificado de Micobacterias. (12)

Recientes investigaciones han podido demostrar que las Micobacterias pueden colonizar tanto las líneas de tratamiento del agua como en los sistemas de distribución.

En los sistemas de distribución de agua las Micobacterias saprofitas están presentes en las muestras positivas en un 41.3%, las micobacterias potencialmente patógenas en un 16.3%, y micobacterias no identificadas en 54.8%. (19).

Otros estudios han demostrado la presencia de MNT en el agua de hospitales, por lo cual se han asociado a brotes nosocomiales (36).

La clasificación de las Micobacterias diseñada por Runyon, de acuerdo con sus características de crecimiento y pigmentación, ha sido la base fundamental para identificarlas y estudiarlas, con el tiempo se han usado diferentes técnicas para la identificación de MNT.

Las pruebas convencionales basadas en pruebas bioquímicas, siguen siendo consideradas las pruebas de oro en la identificación de especie, sin embargo dado el gran número de especies conocidas, se requiere de un gran número de pruebas y estas pueden no ser exactas en la interpretación definitiva de la especie(15,21,8,25), métodos basados en la hibridación de ADN genómico (24), análisis de ácidos micólicos y los ácidos grasos a través de métodos que incluyen la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía gas-líquido y la cromatografía de capa fina (12,25,31), Polimorfismo en la Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLP) (16), secuenciación de genes evolutivamente conservados como el gen ribosomal 16S, (ARNr 16S) (15,19,22 ,29,37) Amplificación y restricción del gen *hsp65* basada en PCR (1, 14, 15, 17, 21,30).

El algoritmo original de PRA fue posteriormente modificado y ampliado a 34 especies, debido al gran número de especies y subespecies que constituyen este genero. (14). El método PRA del gen *hsp65* ha sido comparado, con la identificación de métodos convencionales por varios autores. (15, 21,34).

El PRA también ha sido útil para conocer las diferentes variaciones allicas de las micobacterias encontrando un nuevo patrón para *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium intracellulare*, y *Mycobacterium flavescens*, dos nuevos patrones para *Mycobacterium fortuitum*, nuevos patrones para *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium terrae*. (39)

La aplicación de estos métodos en la investigación clínica han evidenciado diferentes rutas de transmisión y la discriminación a nivel de especie de diferentes agentes etiológicos causantes de diferentes brotes.

En Latinoamérica se han desarrollado estudios en asociación con Argentina, Brasil, Colombia, Chile para la identificación de Micobacterias no tuberculosas y como una contribución a la validación del PRA como método diagnóstico. (17,29). Se aislaron MNT y se identificaron por medio de pruebas convencionales y PRA, encontrando principalmente: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium Kansasii*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium szulgai*, con datos concordantes entre las dos técnicas. (15).

En Colombia son pocos los estudios que se han realizado para conocer la presencia e identificación de MNT.

Entre los estudios reportados se ha investigado la presencia de Micobacterias en diferentes fuentes: en aguas negras, en barrido de aposentos y en algas verdes. (8). Otro estudio demostró la presencia de Micobacterias en peces ornamentales y en aguas de las bodegas donde son almacenado estos peces, aislándose un 100% de Micobacterias no tuberculosas de las muestras de agua y en un 34.8% de los peces ornamentales. (26)

En hábitats creados por el hombre existe un estudio como tesis de grado sobre la incidencia de Micobacterias atípicas en aguas de abastecimiento humano en tres centros educativos al sur occidente de Santa fe de Bogotá en 1998. En los cuales

se aislaron *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium gordonae*. (27)

La Presencia de las Micobacterias no tuberculosas en Colombia, evidencia la importancia de identificarlas como agentes etiológicos y por su aumento en pacientes tanto inmunocompetentes como en inmunosuprimidos. Las especies aisladas con mayor frecuencia son: *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum*, además de sugerir metodologías clásicas y de biología molecular para su investigación. (3)

En Colombia la identificación de especies de Micobacterias es realizada por el laboratorio de referencia del Instituto Nacional de Salud el cual se basa principalmente en las características fenotípicas y pruebas bioquímicas.

## 7. MARCO TEÓRICO

### 7.1 Breve Historia de la clasificación de las micobacterias

La clasificación de las micobacterias inicia en 1986 cuando Lehmann y Neumann propusieron por primera vez el género *Mycobacterium* incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* ubicadas en la familia *Mycobacteriaceae* orden *Actinomycetales* y clase *Actinomycetes*. El género *Mycobacterium* es el único género en la familia *Mycobacteriaceae*, aunque este fue propuesto para incluir *Nocardia* y *Rhodococcus* en esta familia (40). Por muchos años *M. tuberculosis*, *M. bovis*, y *M. leprae* fueron reconocidas como patógenos humanos. En 1935, Pinnerle propone el termino (microorganismos ácido alcohol resistentes atípicos), a los aislados que podían causar enfermedades humanas pero que no podían ser diferenciados de *M. tuberculosis* en su morfología básica, pigmentación, y virulencia en animales (40).

En 1938, da Costa Cruz describió y nombró *M. fortuitum* como una especie de micobacteria de crecimiento rápido en absceso post-inoculación en humanos (52). Una década después MacCallum et al. Describieron una serie de enfermedades de la piel causada por una nueva y fastidiosa *Mycobacterium sp.*, que después fue llamada *M. ulcerans* (40). En 1949, Cuttino y McCabe describieron una infección fatal diseminada en un niño causada por un microorganismo nuevamente conocido el cual fue llamado "*Nocardia intracellularis*" (40), posteriormente renombrado *M. intracellulare* por Runyon (40). 1951, Norden y Linell (40) reportaron un granuloma en los nadadores de piscinas causado por "*M. balnei*" posteriormente reconocida como sinónimo de un patógeno de los peces, *M. marinum*, que Aronson había descrito en 1926 (40). En 1956, Masson y Prissck describieron una *Mycobacterium* pigmentada que causaba adenitis cervical en niños y que posteriormente fue llamada como *M. scrofulaceum*. Desde que en 1953, Buhler y Pollak reportaron una enfermedad pulmonar humana causada por

un raro organismo ácido alcohol resistente que fue posteriormente llamada *M. kansasii*. (40)

Timpe y Runyon fueron sistemáticamente recopilando una larga colección de aislados clínicos de Micobacterias. Ellos nombraron el término, “atípico”, que Pinner había usado para describir los aislados clínicos que no parecían como al bacilo del tubérculo de los seres humanos.

## **7.2 El género *Mycobacterium***

El género *Mycobacterium* es el único que pertenece a la familia Micobacteriaceae y al orden Actynomycetales (41). El género *Mycobacterium* consiste en aproximadamente 100 especies, incluso patógenos y saprófitos, y pueden ser divididos en tres grupos basados en los criterios clínicos (4, 40,41).

El primer grupo incluye patógenos estrictos en humanos y animales como por ejemplo los miembros de el complejo *M. tuberculosis* (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, y *M. tuberculosis*), *M. leprae*, *M. avium*, *Subsp. paratuberculosis* y *M. lepraemurium*. Estos patógenos estrictos no son generalmente encontrados en el ambiente.

El segundo grupo consiste en micobacterias potencialmente patógenas en el hombre y animales. La mayoría son halladas casi siempre en medios naturales y pueden convertirse en patógenos bajo circunstancias especiales. Ellas también han sido llamadas “micobacterias oportunistas” o algunas veces “patógenos ocasionales” para distinguirlos de los patógenos estrictos. Algunos de estos son excepcionales como (*M. malmonase*, *M. ulcerans*) o nunca han sido aislados del ambiente, como por ejemplo (*M. haemophilum*) aunque los perfiles epidemiológicos de ellas sugieren que la causas de estas se encuentra presentes en la naturaleza.

El tercer grupo consiste en especies normalmente saprófitas que no son patógenas o son patógenas en forma excepcional. Las especies saprófitas y las potencialmente patógenas son llamadas Micobacterias No Tuberculosas (MNT). Como Wayne (2) indica, estas son bacterias “típicas” de el genero *Mycobacterium* y son bien reconocidas por los taxonomistas. Ellas también han sido sujetas a diferentes investigaciones taxonómicas, y se han llevado a clasificación bajo cada especie ya que son grupos homogéneos que son fácilmente identificados en el laboratorio (2,40). Sus manifestaciones clínicas, son similares a las tuberculosas, pueden ser consideradas “atípicas” siempre y cuando el agente etiológico no pertenezca al complejo *M. tuberculosis*. Este grupo de las MNT ha recibido múltiples denominaciones: micobacterias atípicas (para diferenciarlas de las típicas, es decir, *M. tuberculosis*, aunque no las diferencia como debería del grupo *M. leprae*); paratuberculosa “anónimas”; micobacterias no tuberculosas (a pesar de que producen lesiones con tubérculos); micobacterias diferentes de las tuberculosas (micobacteria other than tuberculosis, MOTT, termino ingles y difícil de traducción a nuestro idioma); micobacterias oportunistas (término inadecuado, pues incluiría microorganismos que ni siquiera han demostrado potencial patógeno en humanos); micobacterias ambientales (se encuentra ampliamente diseminadas por el ambiente, no es un termino habitual en la bibliografía de la lengua inglesa). No hay acuerdo en la denominación, ya que depende de la opinión de cada autor o sociedad científica. Aunque la discusión acerca de su denominación apropiada continua (43,44, 45, 46, 47).

Una clasificación de las micobacterias basada en el riesgo de causar infección en el hombre de las diferentes especies ha sido usada:

**Grupo de riesgo I:** Bajo riesgo de infección para los individuos y la comunidad. Enfermedades nunca o raramente descritas en adultos. Las especies están clasificadas como patógenos raros.

**Grupo de riesgo II:** Riesgo individual moderado, la enfermedad puede ser medianamente severa existiendo en la comunidad. Las especies indicadas son generalmente clasificadas potencialmente patógenas y oportunistas.

**Grupo de riesgo III:** Riesgo de transmisión por aire, la enfermedad después de infectar es severa y algunas veces fatal. Las especies indicadas son generalmente indicadas como patógenos estrictos. (Tabla 1)

Grupo de riesgo IV: Alto riesgo de infección o fatal, alto riesgo para la comunidad. (No hay especies de micobacterias incluidas en este grupo de riesgo), ejemplo: virus Ebola (40).

Grupo de Riesgo I		Grupo Riesgo II	Grupo Riesgo III
<i>M. agri</i>	<i>M. komossence</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. Boris</i>
<i>M. Alves</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. branderi</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. fortuitum</i>	
<i>M. brumae</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. chitae</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. intracellulare</i>	
<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. kansasii</i>	
<i>M. chubuense</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. malmoense</i>	
<i>M. confluentis</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. genavense</i>	
<i>M. conspicuum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. cookii</i>	<i>M. porcinum</i>		
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. poriferae</i>		
<i>M. duvalii</i>	<i>M. pulveris</i>		
<i>M. fallax</i>	<i>M. rhodesiae</i>		
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. senegalense</i>		
<i>M. flavescens</i>	<i>M. smegmatis</i>		
<i>M. gadium</i>	<i>M. sphagni</i>		
<i>M. gastris</i>	<i>M. terrea</i>		
<i>M. gilvum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>		
<i>M. gordonae</i>	<i>M. tokaiense</i>		
<i>M. hassiacum</i>	<i>M. tripex</i>		
<i>M. hiberniae</i>	<i>M. triviale</i>		
<i>M. hodleri</i>	<i>M. vaccae</i>		
<i>M. interjectum</i>			

**Tabla 1** Clasificación de las especies de micobacterias de acuerdo al riesgo para la salud humana.



### 7.3 Consideraciones Microbiológicas

Los microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium* esta integrado por bacilos largos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud o curvos en forma de maza inmóviles, no esporulados, aerobios estrictos y otros microaerófilos como *M. bovis* (40,41). Las especies de este género presentan un elevado contenido de G+C (61-71%) en su ADN, la única excepción ha sido *M. leprae* con un contenido de G+C (54-57%) en su ADN (41). Se caracterizan por tener una pared celular gruesa y con un elevado contenido de lípidos que supone el 60% del peso seco de la misma, la cual la hace permeable a los agentes hidrofílicos. Esta pared consta de cuatro capas:

Peptidoglicano: Es la mas interna con moléculas de N.acetilglucosamina y ácido N.glicosilmurámico esta capa da rigidez y forma a la bacteria.

Polímeros de arabinosa y galactosa: Que se encuentra unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Se trata de ácidos grasos de cadena larga (60 a 90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica.

Ácidos micólicos

Lípidos superficiales (micosidos, cord factor, y sulfolípidos): Esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido alcohol resistencia. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (41).

Aunque son grampositivos se colorean irregularmente. Las micobacterias son teñidas por el método Ziehl-Neelsen más eficaz para ponerla en manifiesto, en el que se utiliza como solución decolorante una mezcla de etanol y ácido clorhídrico.

Estos microorganismos una vez coloreados son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica y por eso se denomina Bacilos ácidos alcoholes resistentes (BAAR).

#### **7.4 Micobacterias No Tuberculosas (MNT)**

Las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) o Micobacterias Ambientales (MA) son microorganismos ubicuos ambientalmente cuyo rango de patogenicidad para humanos y animales depende del inóculo de colonización para la enfermedad. Algunas veces la determinación de la significancia de una MNT detectada en una muestra clínica a veces no es tan fácil y requiere reunir criterios específicos (45). El desconocimiento de la verdadera prevalencia de las enfermedades producidas por las MNT puede deberse a que no son reportadas en muchos países, probablemente debido a la falta de claridad de su significancia clínica, o porque no existen las facilidades para hacer su diagnóstico, identificación e incertidumbre en los tratamientos, tanto en los medicamentos a utilizar como en su duración o simplemente debido a que no existe interés en la salud pública y se subestima la importancia de las enfermedades porque no son contagiosas (3).

Las MNT pueden causar infección o enfermedad en pacientes con predisposición como por ejemplo (disfunción pulmonar, conteo bajo de células CD4) pero también ha sido demostrado que *M. avium* causa enfermedades en personas sin condiciones de predisposición. Sin embargo, muchas especies pueden ser patógenos para el ser humano, las siguientes son las principales enfermedades: enfermedad pulmonar, neumonía hipersensible, linfadenitis, lesiones no pulmonares localizadas como por ejemplo (ulceras de piel e infecciones de heridas del tejido blando y enfermedad en los huesos), enfermedad diseminada y también se han descrito infecciones nosocomiales, fuentes de agua, duchas, tinas, agua de diálisis, hielo y máquinas de hielo, floreros, siendo los agentes más involucrados el complejo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. xenopi*,

y también en los tubos de distribución de agua en las unidades odontológicas (4,19).

Estos organismos también tienen un alto riesgo para la salud, especialmente en la población inmunodeficiente. Principalmente *M. avium*, *M. gordonae* que frecuentemente afecta a pacientes con SIDA, las infecciones por MNT son comúnmente uno de los criterios usados para el diagnóstico de SIDA en pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (48).

## **7.5 Epidemiología de las MNT**

Muchas MNT son aisladas de agua y suelos, pero algunas son aisladas de otras fuentes como el polvo de la casa. Esto es ahora generalmente aceptado como el origen ambiental, especialmente aguas naturales, que resultan ser el reservorio para muchas infecciones humanas causadas por el complejo *M. avium* (MAC). La aerosolización del agua puede ser un medio para la transmisión de infecciones, en ambientes tanto naturales como domésticos. (40)

### **7.5.1 *Mycobacterium kansasii***

Características generales: Desde que *M. kansasii* fue descrita en 1955 cierto número de documentos reportan su presencia en muestras de agua. *M. kansasii* es una micobacteria fotocromógena de crecimiento lento. Su crecimiento ocurre entre 32 °C y 42°C, mejor a 37°C pero no a 45°C. Su característica bioquímica son la producción de catalasa, ureasa, pirazinamidasas, reducción de nitratos y su habilidad para hidrolizar tween 80. Sus colonias son rugosas o planas con bordes irregulares. *M. kansasii* es una especie de MNT comúnmente aislada en humanos.

### **7.5.1.1 Epidemiología**

Esta micobacteria ha sido recuperada en agua potable. En humanos, esta causa enfermedad pulmonar diseminada en pacientes inmunodeficientes (49). Sin embargo, la enfermedad pulmonar es la característica para pacientes inmunocompetentes y sin ningún factor de riesgo (40). La enfermedad causada por estas especies ha sido descrita alrededor del mundo, pero se ha descrito mayor incidencia en personas con mala situación socioeconómica (50,51).

### **7.5.2 *Mycobacterium fortuitum***

Características generales: *M. fortuitum* ha sido descrita por da Costa Cruz en 1938 (52). *M. fortuitum* es una micobacteria ambiental no cromogenica de rápido crecimiento. Su característica bioquímica es que son positivas a la prueba de arilsulfatasa a los 3 días, crecimiento en MacConkey sin cristal de violeta crecimiento a 42°C y en presencia de NaCl al 5%, positivas a la actividad de nitrato reductasa.

#### **7.5.2.1 Epidemiología**

Estas especies han sido recuperadas en agua potable, en sistemas de distribución de agua y una variedad de suelos de todo el mundo (53,54). En humanos es asociados frecuentemente a infecciones cutáneas (55, 56,57) y raramente enfermedades pulmonares diseminadas (58).En algunos brotes de infección por *M. fortuitum* una fuente ambiental ha sido identificada.

### **7.5.3 *Mycobacterium gordonae***

Características generales: *M. gordonae* es común en el ambiente, es una micobacteria escotocromógena de lento crecimiento, esta especie hidroliza tween 80, no es capaz de reducir nitrato, ureasa negativa y catalasa positiva. Las colonias son rugosas y amarillas o pigmentada naranja, el crecimiento óptimo es a 37°C pero es capaz de crecer en un rango de 25 a 37°C. *M. gordonae* es una especie altamente polimorfica (40)

#### **7.5.3.1 Epidemiología**

*Mycobacterium gordonae* es una micobacteria ambiental comúnmente encontrada en el agua (59). Esta especie es la más contaminante en los laboratorios de micobacteriología clínica. Esta especie es considerada no patógena sin embargo varios reportes han implicado a *M. gordonae* en infecciones humanas, y hay poca información de ellas como agente etiológico (60).

### **7.5.4 *Mycobacterium scrofulaceum***

Características generales: *M. scrofulaceum* puede ser asociada a infecciones como linfadenitis cervical en niños (61). Puede ser aislada en lagos naturales y ríos y aerosoles (62,63). *M. scrofulaceum* es una micobacteria escotocromógena de crecimiento lento. Su mejor crecimiento es a 37°C, no hidroliza tween 80 y es negativa a la prueba de reducción de nitratos. Es usualmente positiva a la ureasa y catalasa semicuantitativa. Las colonias son lisas de color amarilla o naranja. Esta especie pudo ser asociada en el pasado con *M. avium* ya que esta compartía varias características fenotípicas, ecológicas, patogénicas y genotípicas. Sin embargo, esta es considerada una especie distinta.

#### **7.5.4.1 Epidemiología**

*Mycobacterium scrofulaceum* puede ser aislada en el ambiente, principalmente en lagos y ríos de clima calientes. En todo caso, en los últimos años, una disminución en el número de aislados ha sido bien notada. Esto puede ser explicado por la descripción de nuevas especies aisladas en linfadenitis que en el pasado pudo ser equivocada como *M. scrofulaceum*. En humanos, esta especie es asociada a linfadenitis en niños, limitado a nódulos linfáticos mandibulares y cervicales. La asociación u otra presentación clínica son raras pero ha sido descrita causando infección diseminada, úlceras crónicas en la piel y enfermedades pulmonares en pacientes VIH positivo (64,65, 66,67).

#### **7.5.5 *Mycobacterium chelonae***

*Mycobacterium chelonae* fue primero descrita en el manual Bergey's en 1923. En 1953, Moore y Frerichs aislaron la micobacteria en un absceso de rodilla (68). *M. chelonae* es una micobacteria no cromogénica de rápido crecimiento. Las colonias son más mucosas que rugosas y aparecen en las primeras semanas de incubación usando medios de cultivos convencionales. Las características bioquímicas son positivas a la prueba de arilsulfatasa a los 3 días, crecimiento en MacConkey sin cristal de violeta, negativo a la captación del hierro y la prueba reducción de nitratos. Esta especie puede ser distinguida de otras especies potencialmente patógenas de crecimiento rápido tales como *M. fortuitum* y *M. abscessus* (40).

#### **7.5.5.1 Epidemiología**

Esta especie es abundante en ambientes artificiales hechos por el hombre como agua potable pero puede ser recuperada en lagos, ríos, agua de mar, y aguas de

alcantarillado. Su amplia distribución en el ambiente hace que estas especies sean comúnmente contaminantes en el laboratorio. Por la misma razón ésta puede contaminar soluciones, equipos médicos y heridas quirúrgicas. En humanos *M. chelonae* esta asociada a tejidos blandos, infecciones diseminadas, tejidos blandos y pulmones. (40, 69, 70,71).

## **7.6 Clasificación de las Micobacterias No Tuberculosas**

En 1959, Runyon sugiere la clasificación de las MNT, desde el punto de vista práctico y, por lo tanto, no agrupa las MNT descubiertas más recientemente (1). La clasificación, ofrece un alto valor para otros estudios bacteriológicos, clínicos y epidemiológicos.

La clasificación de Runyon esta basada en sus características fenotípicas como la tasa de crecimiento y producción de pigmento en la oscuridad o únicamente después de ser expuestas a la luz. (Tabla 2) Las MNT se dividieron en cuatro grupos (72):

Grupo	Características
I	Crecimiento lento – fotocromógenas: Los cultivos creciendo activamente desarrollan pigmentos amarillos a la exposición a la luz pero no producen pigmento en la oscuridad. Los cultivos requieren de 2 a 6 semanas de incubación para haber un crecimiento visible como por ejemplo ( <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> ).
II	Crecimiento lento – escotocromógenas: Su pigmento es producido en la luz o en la oscuridad. Los cultivos requieren de 2 a 6 semanas de incubación para haber un crecimiento visible. ( <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. szulgai</i> ).
III	Crecimiento lento – no cromógenas: Este grupo contiene ambas especies potencialmente patógenas y especies no patógenas. Muchas de estas no son pigmentadas y tiene crecimiento extremadamente largos ( <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. terrae</i> ).
IV	Crecimiento rápido – caracterizadas por su habilidad para su rápido crecimiento, en 2 a 7 días. Muchas de ellas pueden ser pigmentadas y no pigmentadas. Las colonias pueden ser generalmente lisas pero algunas pueden aparecer rugosas (Complejo <i>M. fortuitum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> ).

**Tabla 2** Clasificación de micobacterias no tuberculosas según Runyon. Fuente: Leaño, S.C, et al.2004. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. European Commission International Cooperation (INCO) for Developing Countries (DEV) Concerted Action (CA) project N°ICA 4-ct-2001-10087, Brussels, Belgium.

### 7.7 Micobacterias No Tuberculosas del Medio Ambiente.

Las MNT pueden ser halladas en la naturaleza en todas las latitudes. Son encontradas en polvo, suelo, agua, leche, alimentos, aerosoles, en ambientes frescos y húmedos (4, 40,19). Estamos regularmente en contacto con las MNT y no es sorprendente que por encontrarse ampliamente distribuidas en la naturaleza, colonicen el tejido normal, lo cual ocurre probablemente por la



inhalación de aerosoles contaminados o por ingestión de aguas o comidas contaminadas con micobacterias ambientales, llegando así a colonizar la nasofaringe, las mucosas bronquial e intestinal (5,17,18,20,21). Ellas también pueden ser halladas en la piel o en el excremento de personas sanas (7).

Esto es muy importante para diferenciar ambientes naturales (la cual por definición no ha tenido que ser creadas por el hombre), de los ambientes artificiales que son colonizados por un considerable espectro de micobacterias ambientales (9). Algunas especies son halladas en forma extraña en condiciones naturales y frecuentemente en ambientes artificiales este es el caso de *M. marinum*, *M. chelonae* y *M. avium* (40).

Ciertas especies como *M. gordonae*, son encontradas en ambos ambientes naturales y artificiales. En general la frecuencia y las especies aisladas varían en las diferentes regiones geográficas. Finalmente, lo que se conoce en el momento, algunas especies como por ejemplo *M. haemophilum*, *M. genavense* nunca han sido aislados en forma natural aunque la epidemiología de las enfermedades sugiere que ellas pueden ser causada por su presencia en el ambiente (3,40).

### **7.8 Enfermedades adquiridas y especies de MNT en Sistemas de Distribución Agua Potable (SDAP).**

Las MNT pueden ser responsables de enfermedades que no son iatrogénicas o nosocomiales pero que pueden ser adquiridas después de un contacto con los sistemas de distribución de agua potable (SDAP) contaminada. Las MNT sobreviven y se multiplican formando biopelículas en las tuberías de distribución de agua, piscinas, acuarios y baños para el lavado de los pies. En general, las infecciones ocurren en pacientes quienes tienen contactos prolongados con reservas de agua y/o quienes tienen historia de lesiones en piel o microtraumas

por donde puedan colonizar. *M. marinum* produce granulomas han sido descritas en pacientes con un historial de traumas y pescadores relacionados a su ocupación (7,6). Recientemente las erupciones de *M. fortuitum* y *M. chelonae* en furunculosis han sido reportadas en personas que se hacen pedicure y manicure en salones de belleza (53,55).

Las pruebas de calidad de agua potable comprenden análisis físicos, químicos y microbiológicos. En Europa, los estándares de calidad para el agua potable son descritos en la directiva de la Comunidad Europea 93/83 EC del consejo de 3 de noviembre de 1998 donde estipula que el agua potable "debe estar libre de cualquier " microorganismos y ha llevado a que se implementen medidas de vigilancia y control influyendo filtración y tratamiento de agua con luz UV en Inglaterra (4).

Aunque los organismos comúnmente encontrados en sistemas de agua potable son bacterias heterotróficas no patógenas, otros organismos, como virus (enterovirus, virus de la hepatitis A, norovirus), protozoos (amebas, *Giardias* spp). Aunque cada SDAP abrigue su propia flora de micobacterias, las Micobacterias Ambientales (MA) no son incluidas como un parámetro estándar en el análisis microbiológico del agua. (4)

Varios autores han demostrado la presencia de MNT en SDAP público. (20, 77,78).Diversos estudios demuestran que están presentes en el agua dulce y de mar, donde los factores geográficos como composición química del suelo, pH, humedad, temperatura, etc., juegan un papel importante para su presencia. (7,9). Las especies *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, y *M. xenopi* son las micobacterias mas frecuentemente reportadas que se encuentran en el agua potable (4,19). Esta claro que una descripción completa de la composición de especies es obstaculizada por la carencia de pruebas convenientes y métodos de aislamiento, y probablemente debido a ausencia o presencia temporal de MNT en la tubería (4)

## **7.9 ¿Cómo pueden sobrevivir las MNT en sistemas de distribución de agua potable?**

Las rutas por las cuales las micobacterias pueden entrar en los SDAP incluyen brechas de tratamiento de agua, tubos de escape, válvulas, uniones entre tubos, tanques de almacenaje de agua tratada, tratamientos impropios de materiales (79). Una vez que las micobacterias han accedido a la tubería, estos organismos pueden sobrevivir y persistir, ya que esta misma le proporciona las condiciones ambientales favorables. Las micobacterias son más resistentes a los desinfectantes que otras bacterias y virus (17,80), además las MNT son más resistentes que el *M. tuberculosis* a los biocidas razón por la que es importante establecer la concentración y el tiempo de acción de los micobactericidas utilizando como organismos indicadores MNT y no *M. tuberculosis* (81). Las características fisiológicas, como el crecimiento en concentraciones nutritivas bajas, asociación a las biopelículas, interacciones con protozoos, y resistencia al cloro son factores de supervivencia importantes. (4)

### **7.9.1 Condiciones de crecimiento:**

En general, el crecimiento de las MNT en sistemas de distribución de agua potable y en las paredes de los tubos son influenciadas por varios factores, incluso la concentración de la materia orgánica biodegradable (este parámetro incluye al carbón orgánico disuelto biodegradable y el Carbón Orgánico Asimilable COA), el fósforo microbianamente disponible y los nutrientes, la acumulación de sedimentos, interacciones microbianas, concentración de desinfectantes residuales libres, tiempo de residencia, factores ambientales (incluso pH, temperatura y turbiedad del agua), diseño de la red (presencia de callejones sin salida, diámetro de los tubos), hidráulica y características del material que cubre los tubos de distribución como composición, porosidad y brusquedad (4,79,82).

Es conocida la absoluta dependencia de las micobacterias de una tasa suficiente de hierro para el crecimiento. Cuando se desarrolla in vivo, el bacilo tuberculoso depende de la producción de micobactinas, sustancia que puede recuperar el hierro a partir de la transferrina y permiten así el crecimiento (4). Como muchos de estos factores pueden ser determinantes para el crecimiento de las micobacterias.

### **7.9.2 Nutrición:**

El agua potable puede ser considerada como un medio nutritivo y pobre en las condiciones que el Carbón Orgánico Asimilable (COA) fue quitado durante el tratamiento del agua. El COA es la fracción de la materia orgánica biodegradable que puede ser convertida y asimilable al nuevo material celular, es de gran ayuda para el crecimiento potencial en el agua potable. Las micobacterias pueden sobrevivir en el agua a pesar de niveles nutritivos bajos en el agua de grifo. Las bacterias ávidas, la corrosión, la sedimentación y la concentración de materia orgánica contribuirán al aumento de nutrientes en el agua potable. El alto contenido de hierro era probablemente debido a la corrosión de la pared del tubo y ha sido demostrado que el hierro reacciona con el cloro libre, causando una disminución del efecto del cloro en el agua y utilizándolo para su propio crecimiento.

### **7.9.3 Temperatura:**

La temperatura del agua puede afectar drásticamente la diversidad microbiana en ambientes acuáticos (2). Aunque la temperatura óptima de crecimiento general suele ser de 35 y 37°C existe determinadas especies que precisan temperaturas de 30°C (*M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*) *M. xenopi* al necesitar temperaturas superiores a 28°C a 42°C para su crecimiento, se aísla casi

exclusivamente del agua caliente o en sistemas de conducción, hecho que puede producir casos intrahospitalarios (41).

#### **7.9.4 El papel de las biopelículas (biofilms):**

Donlan (83) define una biopelícula como " un ensamblaje de células microbianas las cuales se asocian de forma irreversible en la superficie o encerradas en una matriz". La matriz esta compuesta de polisacárido y otro material no celular, además puede ser establecida dependiendo sobre el ambiente en el que se. La biopelícula puede ser importante para el origen de las micobacterias ambientales. Sin embargo, el papel de los biopelículas es proteger a las micobacterias de las agresiones ambientales, y en algunos casos promueve el crecimiento de la micobacterias. En particular los biopelículas en sistemas de distribución de agua potable, han sido bien documentados (84, 85, 86,87). La prevalencia de muchas especies de MNT en los suministros de agua es directamente explicada por su alta resistencia innata al cloro (88, 89, 90). Los tratamientos en los sistemas de distribución de agua potable con cloro u ozono resultan en un dramático cambio en la población bacterial pero las MNT son capaz de formar los biopelículas y persistir allí (35, 91). Las biopelículas formadas en forma natural han sido menos reportadas (92). La alta hidrofobicidad de micobacterias, la resistencia contra los antibióticos, desinfectantes, y la resistencia a metales pesados, permite que se formen los biopelículas sobre una variedad de superficies orgánicas como (plástico, PVC, silicona, celulosa, caucho) y superficies inorgánicas como (cobre, vidrio) (85,88).

La presencia de biopelículas en micobacterias ambientales puede tener impacto sobre la salud humana, como también puede ser responsable por problemas de contaminación y enfermedades antimicrobianas (40).

La formación de biopelículas puede ser descrita por un modelo multipasos distinguidos (95,96):

( 1) Formación de una película de acondicionamiento (a menudo se describe como el ensuciamiento de la superficie), que cambia las propiedades de la superficie, que por su parte influye en la adherencia bacteriana, (2) adherencia reversible del microorganismo a la superficie, (3) adherencia irreversible, (4) formación de microcolonia y (5) formación de biopelículas. La estructura de una biopelícula depende de muchos factores internos y externos, y por consiguiente varios modelos han sido propuestos (97,98). La formación de una biopelícula en los sistemas de distribución de agua potable podría ser vista como un proceso consecutivo en la estructura y en la composición de especies (99).

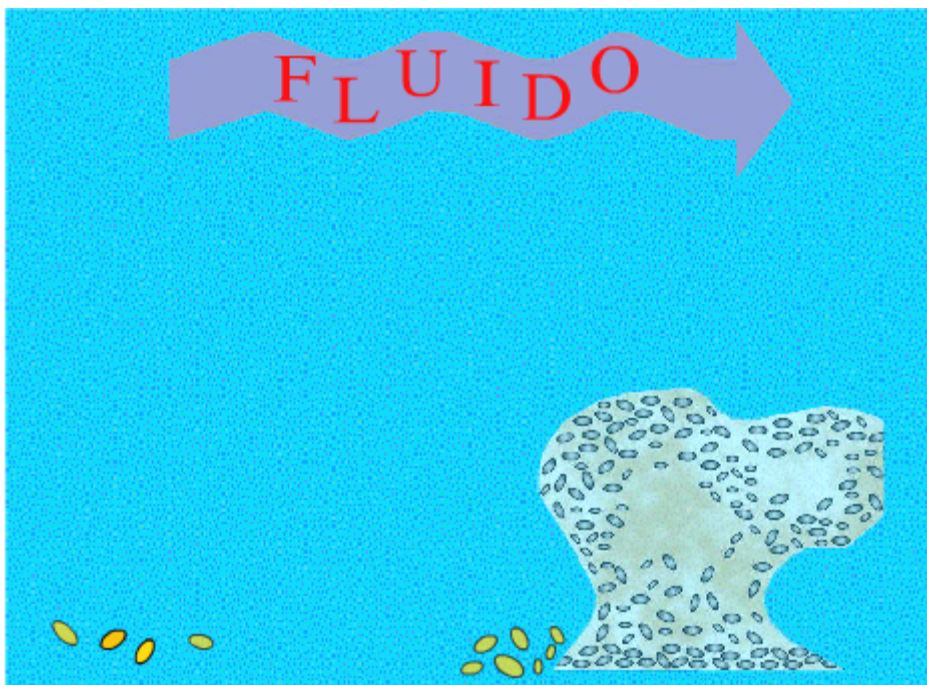


Figura 1. Formación de una biopelícula en un Sistema de Distribución de agua Potable.

### **7.9.5 Asociación con protozoos:**

Otro factor en la supervivencia de las micobacterias es su asociación con amebas de vida libre y otros protozoos. La ameba están presentes en los sistemas de distribución de agua potable (93,94) y en los sistemas de agua de los hospitales (75) y ha sido demostrado que otros organismos se asocian con amebas (74). Algunas MA se asocian a las amebas pero no son completamente dependientes, y no solo sirven para hospedaje de las micobacterias sino también como vehículo de transmisión.

### **7.10 Identificación de MNT**

La identificación de micobacterias es esencial para la instauración de un tratamiento adecuado y también para resolver algunas preguntas epidemiológicas y la patogénesis, la identificación correcta de MNT es unas de las tareas más complejas llevadas a cabo en un laboratorio de micobacteriología. Esta identificación puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales, cromatográficos o genómicos (10).

#### **7.10.1 Métodos fenotípicos convencionales**

Los métodos tradicionales se basan en el tiempo de crecimiento, los aspectos morfológicos y de cromogenicidad de las colonias. Aunque el crecimiento lento de estos microorganismos demora semanas la identificación definitiva. Una buena alternativa en la identificación convencional es la utilización de las técnicas cromatográficas y muy especialmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Aunque esta técnica proporciona una identificación rápida, precisa de

aplicación universal, es un método complejo que requiere un instrumental costoso, elevado entrenamiento y están reservadas a los laboratorios de referencia. (9)

### **7.10.2 Métodos genotípicos**

Actualmente, las técnicas de ácidos nucleicos parecen la mejor alternativa para una identificación rápida y precisa. Sus principales ventajas consisten en una aplicación universal sobre todos los aislamientos, posible detección rápida, identificación de micobacterias de difícil cultivo, reconocimiento preliminar de nuevos taxones micobacterianos. Se basa en el análisis de patrones de restricción enzimáticos de ampliaciones generados por PCR de genes específicos de *Mycobacterium* como *hsp65* o ARNr 16 S. La técnica de amplificación de este gen y posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos obtenidos mediante restricción con dos enzimas (BstEII y HaeIII), descrito hace algunos años por Telenti et al. (1). La interpretación de los patrones es llevada a cabo mediante tablas publicadas y recientemente en un sitio en Internet (<http://www.hospud.ch:8005>). Este método ha sido usado en diferentes laboratorios, pero existen pocas publicaciones acerca del uso rutinario de esta técnica. (9, 15,42).



## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

**8.1 Tipo de estudio:** El presente estudio es considerado como Descriptivo de corte transversal.

### **8.2 Obtención de las muestras:**

Se registraron 201 grifos en la Universidad del Quindío, de los cuales se tomó una muestra representativa de 100 grifos por triplicado, de las fuentes hídricas según las diferentes instalaciones de la Universidad como son: Bloque de Medicina, Bloque de Bienestar Universitario, Bloque de Ingeniería, Bloque de Biblioteca, Bloque de Educación, Bloque de Ciencias Básicas y tecnológicas, Bloques Administrativos y Plantas Piloto.

#### **8.2.1. Toma de la muestra:**

Los grifos fueron abiertos permitiendo el fluido del agua durante un minuto después de lo cual se cerró; posteriormente y mediante un movimiento de rotación en el interior del grifo, se tomo la muestra con un escobillón marca CE0373 y colocados dentro de un tubo FALCON de 15 ml; el cual contenía una solución phosphate buffer sodium (PBS) de pH 7.4. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Ciencias Biomédicas para su procesamiento.

#### **8.2.2. Procesamiento de la muestra:**

Las muestras se centrifugaron a 4400 rpm en una centrifuga refrigerada a 4°C durante 45 minutos; El sobrenadante fue descartado. El precipitado fue sometido a descontaminación mediante tratamiento con solución de NaOH. Las muestras se cultivaron en Lowenstein Jensen e incubadas a 35°C. Para la determinación de

bacilos alcohol resistente se realizo la tinción de Ziehl Neelsen para la observación al microscopio.

### **8.3 Cepario:**

Para conservar las cepas obtenidas, fue necesario guardarlas en unos viales de 1.5 ml los cuales contenía cada uno 1 ml de glicerol al 50% en agua destilada, este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar que protege a las muestras de una posible contaminación y luego se homogenizó en un vortex y refrigeró a una temperatura de -70°C.

### **8.4. Identificación fenotípica:**

Para la confirmación de la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes se analizaron las siguientes características:

#### **8.4.1 Tiempo de Crecimiento**

Crecimiento rápido: Son aquellos cultivos que presentan crecimiento de cepas a los seis días de siembra.

Crecimiento lento: Los que no presenten crecimiento antes de 7 días son de lento crecimiento.

#### **8.4.2. Producción de pigmento:**

Describe la presencia o ausencia de pigmento en el cultivo.

Foto-cromógenas: Presenta pigmentación solamente después de la exposición a la luz.

Escoto-cromógenas: Es capaz de producir pigmentación de la colonia en la oscuridad.

No-cromógenas: No produce pigmento.

#### **8.4.3. Crecimiento en diferentes temperaturas:**

Las diferentes especies de micobacterias muestran una llamativa dependencia de la temperatura de incubación para el desarrollo óptimo, característica que son usadas en la diferenciación de especies.

37°C

42°C

32°C

Temperatura ambiente

#### **8.4.4. Crecimiento en diferentes medios de cultivo:**

Algunas especies tienen requerimientos nutricionales especiales que les permite o les impiden crecer en todos los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de micobacterias.

Lowstein Jensen (LJ): Es el más frecuentemente utilizado en la mayoría de los laboratorios clínicos de diagnóstico, Contiene huevos enteros coagulados, sales definidas, glicerol, fécula de papa y el agente inhibidor verde de malaquita.

Stonebrinke modificado por Giraldo (StG)

MacConkey sin cristal violeta: Permite diferenciar entre las distintas especies de crecimiento rápido, en particular dentro de las no pigmentadas, fundamentalmente entre las que se asocian y no se asocian con patología humana. La mayoría de las

especies no son capaces de crecer en este medio, estimula el desarrollo del complejo *M. fortuitum*.

#### **8.4.5. Crecimiento en presencia de diferentes sustancias químicas:**

Hidracida del ácido 2 tuiofen carboxílico (TCH) 10 µg/ml: Inhibe selectivamente el desarrollo de *M. tuberculosis* mientras que la mayoría de las otras micobacterias pueden crecer en un medio que contenga este compuesto lo cual es de ayuda para la diferenciación de ciertas cepas *M. bovis* y su variedad BCG con *M. tuberculosis* y otras micobacterias de lento crecimiento.

Cloruro de sodio (NaCl) 5%: La capacidad de crecer en medio de cultivo que contiene NaCl al 5% varia, la mayoría de las rápidas crecedoras el *M. flavescens*, *M. triviale* y *M. chelonae* crecen, lo que facilita su diferenciación del antiguo Complejo *fortuitum-chelonae*.

Hidroxilamina (HA) 250 µg/ml: Esta prueba es de gran valor para hacer la diferenciación entre *M. bovis* y su variedad BCG con *M. tuberculosis* y otras micobacterias de crecimiento lento.

Isoniacida (INH) 10 µg/ml: Consiste en estudiar la capacidad de las distintas especies de micobacterias para crecer en medios que incorporen en su composición determinadas sustancias inhibidoras y diferenciar micobacterias de crecimiento lento.

#### **8.4.6. Pruebas enzimáticas:**

Actividad de catalasas: La catalasa es una enzima intracelular capaz de desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno. Las micobacterias poseen varias

clases de catalasa que varían en su estabilidad al calor. Al pH, al igual que presenta una actividad variable.

Estabilidad de la catalasa a pH 7/68°C: No todas las especies pueden producir una reacción positiva después de calentar el cultivo a 68°C durante 20 minutos.

Catalasa semicuantitativa: La actividad de catalasa se puede evaluar semicuantitativamente midiendo la altura alcanzada por la columna de burbujas producida cuando se agrega peróxido de hidrogeno a la colonia.

Reducción de nitrato: Algunas micobacterias reducen los nitratos, característica que es utilizada como una prueba para lograr la identificación de especie. La prueba detecta la habilidad de algunas micobacterias para reducir nitratos ( $\text{NO}_3$ ) por medio de la enzima nitratorreductasa, actividad que esta influenciada por la edad del cultivo, la temperatura, presencia de inhibidores enzimáticos y la concentración de iones hidrogeno.

La nitrorreductasa reduce el nitrato de sodio a nitritos, los cuales son detectados en medio ácido por la adición de sulfanilamida y dihidrocloruro-N-naftiletildiamina, formando un complejo de cloruro de diazonio de color fucsia.

Hidrólisis de tween 80, 5 y 10 días: La hidrólisis del tween 80 puede ser utilizada para separar micobacterias de crecimiento lento potencialmente patógenas de las comúnmente saprófitas, las primeras la gran mayoría de las veces la dan positivas mientras las segundas la dan negativa. La micobacteria que tiene la capacidad de hidrolizar el tween lo hace por medio de una estereasa que lo desdobla y produce ácido oléico que hace que cambie el pH del sustrato y que el indicador que posee cambie de color.

Ureasa: Algunas micobacterias hidrolizan la urea liberando amoníaco, esta característica es útil para identificar micobacterias escotocromógenas y no

cromógenas de crecimiento lento. La micobacteria que tiene ureasa hidroliza la urea que se encuentra en el sustrato liberando amoníaco, el cual alcaliniza el medio de cultivo y hace que el colorante que se ha colocado cambie de color.

Pirazinamidasasa 4 y 7 días: La pirazinamidasasa desdobla la pirazinamida en ácido pirazinóico y este se detecta mediante la adición sulfato de hierro y amonio formando una sal ferrosa que se precipita y se visualiza como un anillo en la superficie del medio de cultivo.

Fosfatasa ácida

Arilsulfatasa 3 y 14 días: La arilsulfatasa es una enzima que rompe la unión de un grupo sulfato y un anillo aromático, en este caso el bisulfato potásico de fenoftaleina dejando la fenoftaleina incorporada al medio de cultivo, la cual es detectada por la adición de un álcali.

#### **8.4.7. Otras pruebas:**

Captación de hierro: Algunas micobacterias tienen la capacidad de incorporar sales de hierro solubles desde el medio de cultivo, lo que produce un aspecto marrón herrumbroso con el agregado de una solución acuosa al 20% de citrato férrico.

Para la diferenciación de las micobacterias que pueden encontrarse en el agua se tendrá en cuenta el siguiente cuadro.

## **8.5. Identificación genotípica**

### **8.5.1 Extracción de ADN genómico:**

A partir del crecimiento bacteriano obtenido en el medio Löwenstein Jensen después de incubación a 37°C hasta cumplir 15 días. Se obtiene la masa bacilar por raspado y se transfieren las bacterias dentro de un vial que contenga 400 µl de buffer TE 1 por filtrado.

Calentar durante 20 minutos a 80°C para inactivar las micobacterias, enfriar a temperatura ambiente.

Adicionar 50µl de la lisozima de 10 mg/ml, mezclar mecánicamente e incubar a 37°C toda la noche. Adicionar 80µl de la mezcla SDS 10% / proteinasa K (70µl y 10µl respectivamente), mezclar manualmente e incubar 10 minutos a 65°C. Adicionar 100 µl de NaCl. 5M. Adicionar 10 µl de solución CTAB / NACL, la cual debe ser precalentada a 65 °C durante 10 minutos. Mezclar manualmente hasta que el líquido sea blanco. Incubar 10 minutos a 65 °C.

Adicionar un volumen (alrededor de 750µl) de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1), mezclar por inversión mínimo durante 10 segundos, y centrifugar a temperatura ambiente por 10 minutos a 12000 g. Transferir la fase acuosa a otro vial.

Añadir cuidadosamente 0.6 volúmenes (~450µl) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar por inversión. Mirar el tamaño del precipitado y estimar la cantidad de buffer TE 1x dentro del cual se disolverá el ADN en el paso 18. Incubar 60 min a -20 °C. Centrifugar 15 min., 4°C a 12000 g. Transferir el sobrenadante a otro vial.

Adicionar el pellet 1 ml de etanol al 70% y mezclar por inversión. Centrifugar 15 min a 4°C. Descartar el sobrenadante. Repetir este procedimiento anterior. Dejar

secar el pellet a temperatura ambiente. Resuspender el pellet en la cantidad estimada de buffer TE 1x (~ 50 µl). El ADN debe ser almacenado a 4°C si es necesario.

Debe estimarse la concentración de ADN mediante electroforesis en gel agarosa 0.8%. (Figura4).

### 8.5.2. PCR:

#### 8.5.2.1 Cebadores:

Descritos por Telenti y colaboradores. (1993)

Tb. 11: ACCAACGATGGTGTGTCCAT

Tb. 12: CTTGTCGAACCGCATACCCT

#### 8.5.2.2 Mezcla de reacción PCR:

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción
Agua Mq (1x)	-	22 µL
Tampón PCR (10X)	1x	5 µL
Cebador Tb 11	25 picomoles	1 µL
Cebador Tb 12	25 picomoles	1 µL
dNTPs (2.5Mm)	200 µM	4 µL
MgCl (25Mm)	1.5Mm	1.5 µL
Taq Pol (5U/µL)	1 U	0.5 µL
Glicerol	10 %	5 µL
ADN	-	10 µL
Total	-	50 µL

Tabla 3. Reactivos utilizados en la mezcla de PCR para una única reacción.



### 8.5.2.3 Reacción PCR

1 ciclo	95°C	5 min
45 ciclos	94°C	1 min
	60°C	1 min
	72°C	1 min
1 ciclo	72°C	7 min

Verificar la amplificación utilizando 10  $\mu$ l de la reacción en un gel de agarosa al 1 %

### 8.5.3 Digestión enzimática

15  $\mu$ l del producto de la PCR fue digerido separadamente con cada enzima (BstEII y HaeIII)

Condiciones de reacción:

15 $\mu$ l	Producto PCR
2.5 $\mu$ l	Buffer específico para cada enzima
1 $\mu$ l	Enzima
6.5 $\mu$ l	Agua mQ

---

Volumen final 25  $\mu$ l

La digestión con BstEII se incubó a 60°C y con HaeIII a 37°C por 3 horas.

#### **8.5.4 Gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 4%. Se agregó el bromuro de etidio 1 mg/10ml directamente al gel o bien teñir después de la electroforesis. Se colocó por los menos 3 pozos con el marcador de 50 pb (o dos en los extremos del gel de 50 pb y uno en el medio de 25 pb).

Se registro el orden del gel para el análisis posterior.

#### **8.5.5 Documentación del gel**

Los geles fueron fotografiados con una cámara Polaroid.

#### **8.5.6 Análisis de los patrones PRA**

El análisis se realizó mediante el uso de las tablas publicadas por Telenti y colaboradores (1993). Devallois y colaboradores (1995) y/o en el sitio <http://www.hospvd.ch:8005> (7). Las que se compararán para determinación de especies.

## **8.6. Análisis Estadístico:**

Los datos obtenidos en la prueba fenotípica se procesaron mediante la prueba del Signo que utiliza la distribución binomial acumulativa la cual es una de las distribuciones discretas de probabilidad más útiles. Se puede considerar en un experimento que el resultado es la ocurrencia o la no ocurrencia de un evento.

La variable aleatoria  $X$  es el número de coincidencias de la especie con la que identifica la prueba. (Tabla 6)

La hipótesis de investigación es que los dos resultados coincidan o sea que la proporción de positivos (+) es mayor que las negativas (-) o sea que la hipótesis nula sería  $H_0 : P < \frac{1}{2}$  entonces  $X \sim B(17, 1/2)$  cuando la hipótesis nula es cierta el nivel de significancia es del 5%.

Además a cada prueba de identificación se le realizó análisis de frecuencia.

## **8.7. Ayuda Pedagógica:**

Se elaboró un plegable que ésta dirigido a la comunidad Universitaria pero sobre todo a las personas inmunocomprometidas, con el propósito de informar el riesgo de estas MNT para producir infecciones en los seres humanos que consumen agua de grifo, para reforzar esta información se realizó una página Web que se encuentra en las siguientes paginas <http://es.geocities.com/mycptomol/LAS-MICOBACTERIAS.html> , <http://es.geocitiies.com/mycptomol/bacterias.html> y <http://es.geocities.com/mycptomol/micobacteria-ambiental.html>. Sobre el impacto de las MNT en los seres humanos.

## 9. RESULTADOS

Del total de 100 muestras tomadas se obtuvieron 16 cultivos con crecimiento de BAAR positivo (Tabla 4)

La identificación de 11 de los aislados de MNT según sus reacciones fenotípicas indicó la presencia de 9 aislados de *Mycobacterium gordonae* y 2 de *Mycobacterium scrofulaceum*.

De los 9 aislados que se identificaron como *Mycobacterium gordonae* todos presentaron pigmentación amarilla o naranja, con colonias mucoides, el tiempo de crecimiento fue mayor a 7 días, siendo escotocrógenas, su crecimiento óptimo fue a 37°C aunque también pudieron crecer a 25°C. (Figura 2). No se desarrollaron en el medio enriquecido con MacConkey sin cristal violeta ni en presencia de NaCl. En las pruebas enzimáticas fueron positivas en arilsulfatasa y catalasa semicuantitativa y negativa a pirazinamidasa y fosfatasa ácida. En las otras pruebas de identificación presentaron variación en los resultados. (Tabla 5).

En 2 de los aislados que se identificaron como *Mycobacterium scrofulaceum* se presentó pigmentación amarillo intenso, morfología de las colonias lisas, y fueron escotocrógenas de lento crecimiento. Su crecimiento óptimo fue a 37°C y 25°C. No se desarrollaron en el medio de MacConkey sin cristal violeta y tampoco en presencia de NaCl pero sí en Hidroxilamina (HA), Isoniacida (INH), Hidracida del ácido 2 tuiopen carboxílico (TCH). En las pruebas enzimáticas fueron positivas a la urea, catalasa semicuantitativa y negativas a tween, fosfatasa ácida y captación de hierro. (Tabla 5).

En 5 muestras con crecimiento de BAAR no se lograron identificar: 1 por presentar contaminación y 4 muestras no crecieron en los medios para identificación. Al aislado que se contaminó se le repitieron las pruebas fenotípicas pero también estas se contaminaron. Esto pudo ocurrir en el transcurso de las pruebas de identificación debido a diferentes causas, entre las más comunes la contaminación por soluciones de laboratorio tales como (indicadores de pH, descontaminantes,

agua no estéril, en el mismo autoclave. Otra posible causa es la contaminación por especímenes contaminantes que se adhieren a los utensilios de laboratorio.

Se obtuvo la amplificación del gen *hsp65* de 14 cepas, este gen se encuentra en forma constitutiva y conservada en estas micobacterias, obteniendo una banda de aproximadamente 440 pb. (Figura 5) Posteriormente se realizó la restricción con las enzimas *BstE II* (Figura 6) y con *Hae III* (Figura 7) evidenciando la presencia de 6 *Mycobacterium gordonae*-(3) con tamaño de las bandas de 100/120/240 para *BstE II* y de 130/110 para *Hae III*; y 3 *Mycobacterium gordonae*-(8) con tamaño de las bandas 325/120 para *BstE II* y de 130/110 para *Hae III*; además 2 de *Mycobacterium scrofulaceum*-(1) con tamaños de las bandas 240/100 para *BstE II* y de 110 para *Hae III*. La interpretación de los patrones de bandas obtenidos fue realizada en la base de datos disponible en Internet (PRASITE <http://app.chuv.ch/prasite> ), lo cual nos permitió identificar las especies anteriormente mencionadas. No pudieron ser identificadas: Las micobacterias de los carriles 3,7 y 13 pues no se observó la banda para la identificación, la muestra 15 y 16 no hubo suficiente inóculo para la extracción de ADN.

Muestra	Localización	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA	IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA
1	Bloque Nuevo, Piso 3, Laboratorio	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 3
2	Bloque Nuevo, Piso 3, Baño Hombres	S.I	<i>M. gordonae</i> 3
3	Bloque Nuevo, Piso 4, Baño Hombres	S.I	S.I
4	Bloque Administrativo 2 Baño Mujeres	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M. gordonae</i> 8
5	Plantas Piloto Baño Mujeres	<i>M. gordonae</i>	<i>M.scrofulaceum</i>
6	Bloque Ingeniería Piso 1 Baño Mujeres	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.scrofulaceum</i>
7	Bloque Biblioteca Baño Hombres	<i>M. gordonae</i>	S.I
8	Bloque Educación Piso 1 Baño de Cocina	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 3
9	Bloque Administrativo 2 Baño Hombres	S.I	<i>M. gordonae</i> 3
10	Bloque Medicina Piso 2 Baño Mujeres	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 3
11	Bloque Educación Piso 2 Baño Mujeres	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 3
12	Bloque Educación Piso 1 Poseta	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 8
13	Plantas Piloto Cultivo In Vitro	S.I	S.I
14	Bloque Administrativo Piso 1 Baño Hombres	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 8
15	Bloque Medicina Piso 1 Laboratorio Bioquímica	<i>M. gordonae</i>	S.I
16	Bloque Administrativo 1 Baño Hombres	S.I	S.I

Tabla N°4 Relación entre el crecimiento BAAR positivo, la localización del grifo y resultados fenotípicos y genotípicos. SI: Sin Identificar.

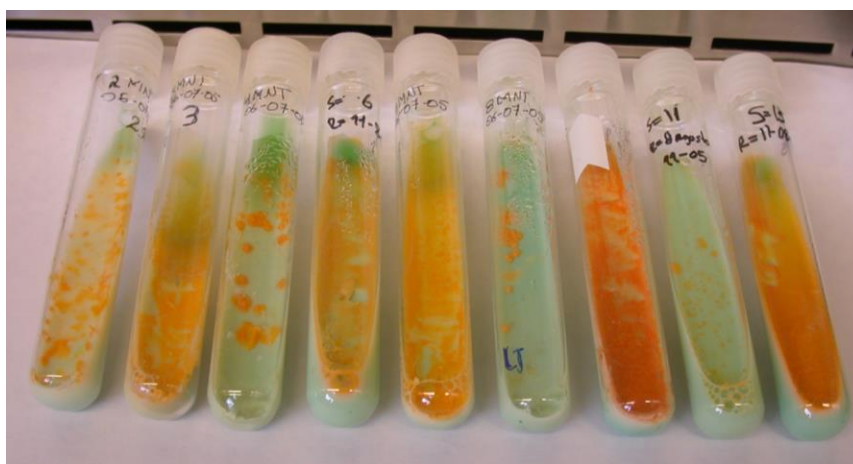


Figura 2. Fotografía del crecimiento en medio de Lowenstein Jensen de micobacterias obtenidas de muestras de agua de los grifos de la Universidad del Quindío.

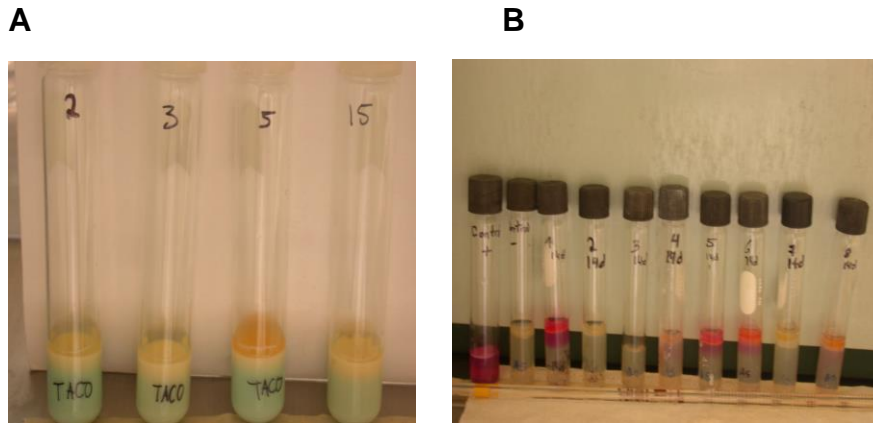


Figura 3. Fotografía ilustrando algunas de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación fenotípica de micobacterias según el protocolo del CDC de Atlanta., donde se ilustran las siguientes reacciones: A. Catalasa semicuantitativa, B. Arilsulfatasa 14 días.

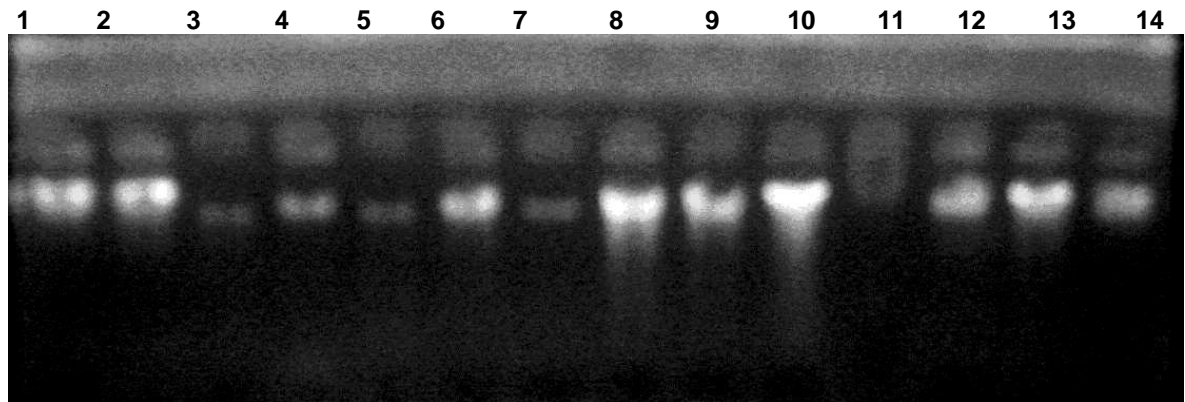


Figura 4: Extracción de ADN genómico de 14 cepas de MNT utilizando el método de Van Soelingen.

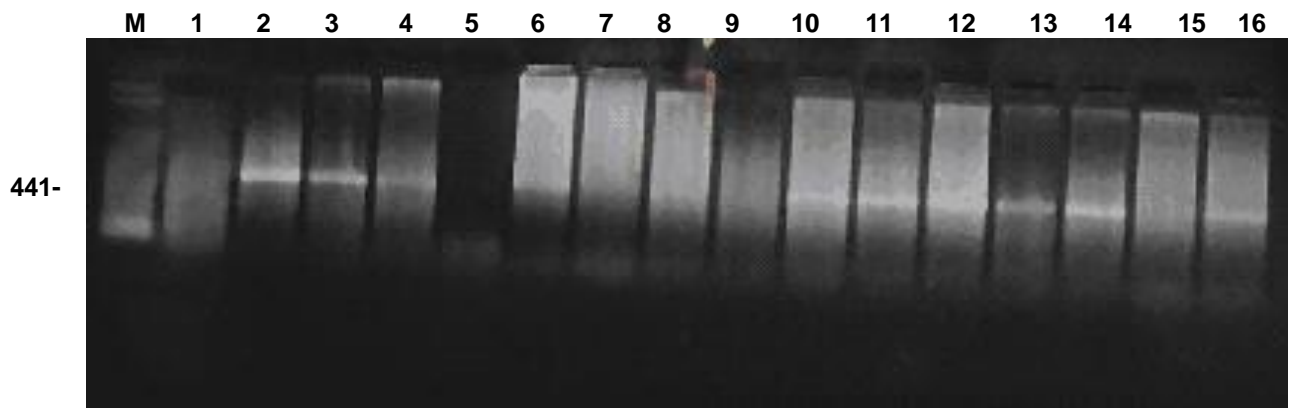


Figura 5. Amplificación del gen *hsp65* por PCR. M: Marcador, 1-14 cepas de MNT, 15: control negativo, 16: control positivo.

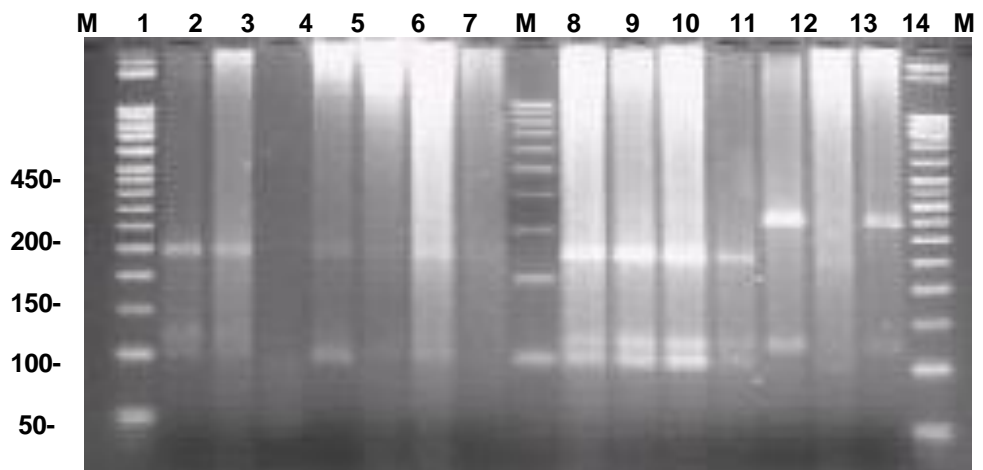


Figura 6. Restricción del gen *hsp65* con la enzima de restricción BstE II. M: Marcador de peso molecular. 1- 14 Aislados de MNT.



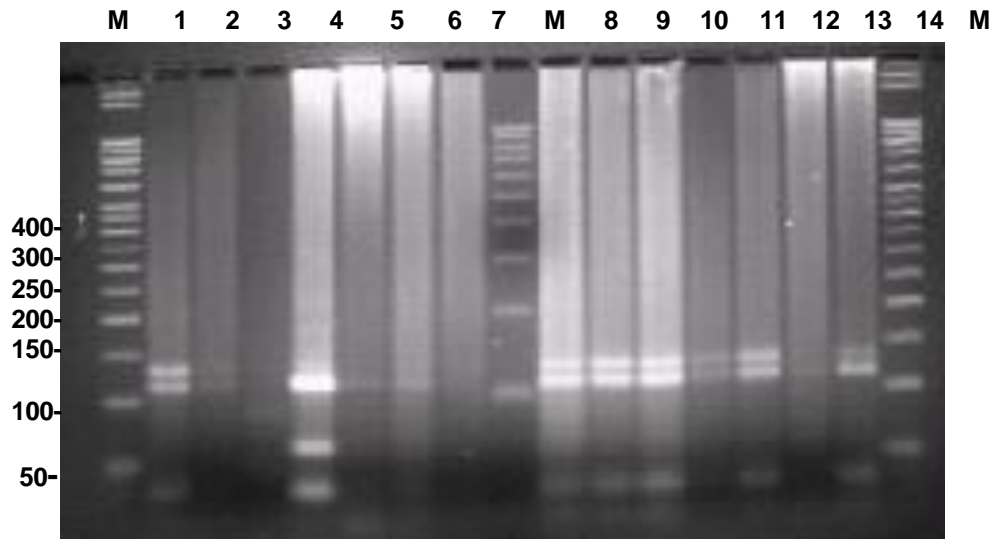


Figura 7. Restricción del gen *hsp65* con la enzima de restricción Hae III. M: Marcador de peso molecular. 1-14 Aislados de MNT.

## 10. Análisis Estadístico:

En la prueba de distribución binomial acumulativa se pudo apreciar la probabilidad de error de la técnica fenotípica, indicando la correlación entre cada una de las reacciones positivas y negativas de las pruebas fenotípicas y las especies identificadas.

Por lo tanto entre 17 pruebas y las especies identificadas la mayor correlación fue 16. La probabilidad de error fue de 0.0001 es decir el 0.01% . (Figura 8).

La menor correlación fue 13. la probabilidad de error fue de 0.0245 que es igual al 2.45 % . (Tabla 5). Esto nos indica que la técnica fenotípica es específica para la identificación de *M. gordonae* y *M. scrofulaceum*.

Lo anterior indica que la hipótesis nula se rechaza ya que esta tenía un nivel de significancia del 5%.

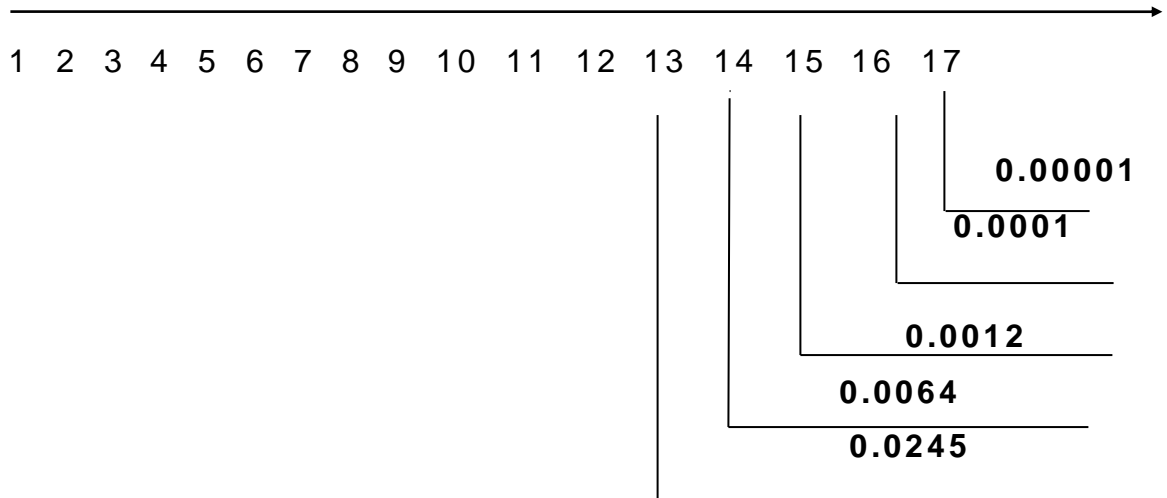


Fig 8. Distribución Binomial Acumulativa Inversa.

**ASLADO**

	Lj	Ok	Stg	Mc	NaCl	HA	TCH	INH	Tween	ARIL 3d 14d
<i>M. gordonae</i>	+	+	+	-	-	ND	+	-	+	- +
Número 1	+	+	+	-	-	-	+	+	-	- +
Número 5	+	-	-	-	-	+	+	-	+	- +
Número 7	+	-	+	-	-	-	+	-	-	- -
Número 8	-	+	+	-	-	-	-	-	-	- +
Número 10	+	+	+	-	-	-	+	-	-	- +
Número 11	+	+	+	-	-	+	+	-	-	- +
Número 12	+	+	+	-	-	-	+	-	+	- +
Número 14	+	+	+	-	-	-	+	-	+	- +
Número 15	+	+	+	-	-	-	+	-	+	- +
<i>M. scrofulaceo</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	- -
Número 4	+	+	+	-	-	+	+	+	-	- +
Número 6	+	+	-	-	-	-	+	+	-	- +

(Continua)

P.A	Urea	Fosf.a	Capt.h	Cat.s.q	25°c	37°c	Correlación	Significancia
+/-	-	+/-		+	+	+		
-	+	-	-	+	+	+	14	0.64%
-	-	-	-	+	+	+	15	0.12%
-	+	-	-	+	+	+	13	2.45%
-	+	-	-	+	+	+	13	2.45%
-	+	-	-	+	+	+	15	0.12%
-	+	-	-	+	+	+	15	0.12%
-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
+	+	-	-	+	+	+		
-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
-	+	-	-	+	+	+	14	0.64%

Tabla 5. Especificidad de la prueba Fenotípica. Lj: Lowenstein Jensen, Ok: Ogawa Kudoh, Stg: Stonebrinke modificado por Giraldo, Mc: MacConkey, NaCl : Cloruro de Sodio, HA: Hidroxilamina, TCH: Hidracida del ácido 2 tufen carboxílico, INH: Isoniacida, Tween: Hidrólisis del tween, ARIL: Arilsulfatasa, P.A: Pirazinamidasa, Urea: Ureasa, Fosf.a: Fosfatasa ácida, Capt.h: Captación de hierro, Cat s.q: Catalasa semicuantitativa. Fuente: los autores.

### 10.1 Análisis de frecuencias

Las pruebas fenotípicas identificaron 9 aislados como *M. gordonae* lo que representa el 56,2% de los 16 aislados, y 2 aislados fueron *M.scrofulaceum* con un 12.5%.(Figura 9).

El 31.2% que corresponde a 5 aislados no pudieron ser identificados. (Tabla 6)

<b>IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA</b>	<b>FRECUENCIA RELATIVA</b>	<b>FRECUENCIA ACUMULATIVA</b>
<i>M. gordonae</i>	9	0,5625
<i>M. scrofulaceum</i>	2	0,1250
S.I	5	0,3125

Tabla N. 6 Frecuencias Relativa y Acumulativa para la Identificación fenotípica. S.I: Sin Identificar.

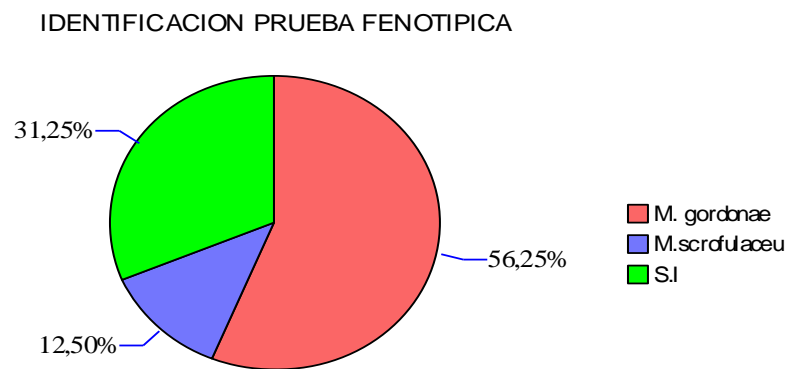


Figura N. 9 Porcentaje de las frecuencias acumulativas para la Identificación fenotípica.

<b>IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA</b>	<b>FRECUENCIA RELATIVA</b>	<b>FRECUENCIA ACUMULATIVA</b>
<i>M. gordonae</i>	9	0,5625
<i>M. scrofulaceum</i>	2	0,1250
S.I	5	0,3125

Tabla N. 8 Frecuencias Relativa y Acumulativa para la Identificación Genotípica. S.I: Sin Identificar.

De los 16 aislados 9 fueron identificados por medio de la prueba genotípica como *M. gordonae* con un 56.25% y 2 fueron *M. scrofulaceum* con un 12.50%. El 31.25% corresponden a 3 muestras que no se les vio las bandas y 2 muestras que se perdieron durante el paso por cultivo. (Figura 10).

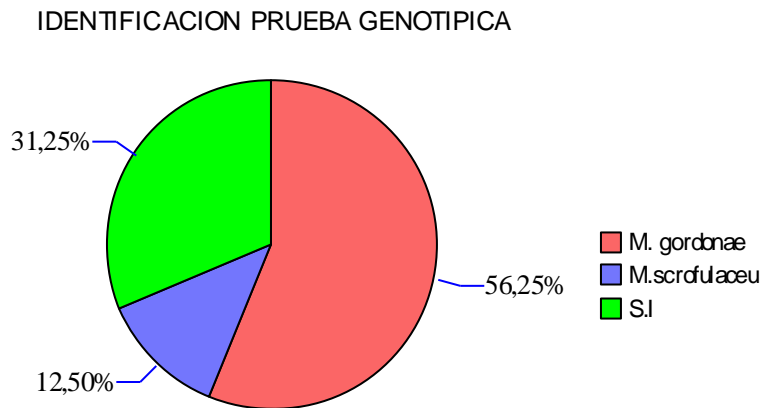


Figura N.10 Porcentaje de las frecuencias acumulativas para la Identificación genotípica.

## 11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de las cepas encontradas en sistemas de distribución de agua de la Universidad del Quindío, indica la presencia de subtipos de *M. gordonae*, la cual es una de las MNT ambientales frecuentemente aislada en el agua (5) y aunque es considerada no patogénica, varios reportes la han implicado en infecciones humanas y en algunos casos no se ha confirmado su etiología como agente causal. (6)

La presencia de *M. scrofulaceum* ha sido asociada a fuentes hídricas como lagos y ríos en climas cálidos y puede generar infecciones en nodos linfáticos en niños y pacientes inmunocomprometidos (1,8). No hay reportes de que ésta especie se encuentre en los SDAP, por ende nuestro estudio se constituye en la primera descripción de esta especie en SDAP a nivel regional y nacional.

En estudios realizados en los Estados Unidos *M. gordonae* y el complejo *M. avium*, son catalogadas MNT potencialmente patógenas frecuentemente identificadas en laboratorios de micobacteriología (15).

La presencia de especies como *M. gordonae* y *M. scrofulaceum* en los SDAP pueden ser explicada, porque la permeabilidad de la pared celular de estas le confiere una resistencia innata a una amplia variedad de agentes antimicrobianos, incluso antibióticos y desinfectantes (ejemplo el cloro). Las MNT forman biopelículas en las tuberías de agua y de esta manera sobreviven, crecen y se multiplican, haciéndose más resistentes al cloro, lo cual puede tener impacto en la salud humana.

Las MNT desempeñan un papel importante en todo el mundo, ya que son las responsables de las micobacteriosis en individuos inmunocomprometidos, dado el incremento en la incidencia de enfermedades asociadas en pacientes con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) como en pacientes VIH negativos (10).

El desarrollo de estas infecciones depende tanto del estado inmunológico del huésped y a partir de allí su evolución progresiva hacia la enfermedad.

Desde hace varios años se ha publicado informes evidenciando la presencia de MNT saprófita y potencialmente patógena en los SDAP en diferentes países. Comprobando que el agua es una de las vías de transmisión (2).

La directiva de la Comunidad Europea 93/83/EC del consejo del 3 de noviembre de 1998 estipula que el agua potable debe estar libre de cualquier microorganismo o parásito que perjudique la salud humana ya que es un derecho fundamental.

Aunque los SDAP abriguen su propia flora de microorganismos las MNT no son generalmente incluidas como parámetros en los análisis microbiológicos (2).

El aumento en las infecciones por micobacterias no tuberculosas no está muy claro y se pueden deber a distintos lugares según la región geográfica (9)

El diagnóstico de las micobacteriosis se confirma por aislamiento de muestras clínicas o ambientales y visualización de BAAR a través del microscopio y su identificación se realiza mediante pruebas bioquímicas convencionales, las cuales presentan limitaciones en cuanto al tiempo de crecimiento, cantidad del inóculo, y dificultad de identificar subespecies. La aplicación de esta técnica bioquímica es relativamente sencilla, económica, y no requiere gran equipamiento (6).

La implementación de esta técnica permite generar resultados oportunamente e identificar las especies que se asocian a la presencia de MNT en sistemas de distribución de agua, lo cual conduce a plantear posibles respuestas a interrogantes epidemiológicos.

Los resultados de la técnica fenotípica utilizada, indicaron la presencia de *M.gordonae* y *M.scrofulaceum* de acuerdo a la clasificación de Runyon, según la cual podemos afirmar que estas especies conforman el grupo II correspondiente a micobacterias de crecimiento lento, escotocromógenas, del cual también hacen parte *M. szulgai* y *M. flavescens*.

De otra parte es importante tener en cuenta que la identificación fenotípica no se puede sustentar en una sola prueba (caso de la catalasa), sino en los resultados coherentes de un conjunto de ellas ya que algunas especies comparten varias reacciones conduciendo a resultados inexactos (3,6). Lo anterior permite explicar la difícil determinación de definir si una de las especies era *M.scrofulaceum* o *M.szulgai*, lo cual fue resuelto gracias al poder discriminatorio de la técnica genotípica implementada como prueba confirmatoria y así se pudo concluir que las especies encontradas en los SDAP de la Universidad del Quindío, correspondían a *M.gordonae* y *M.scrofulaceum*.

Estas especies son consideradas como oportunistas cuando la persona tiene algún compromiso de la respuesta inmune. Un estudio reciente de la Secretaría de Salud de Armenia (comunicación personal) determinó que el 14% de infectados por VIH en el municipio de Armenia tienen formación universitaria; si bien ello no implica que todos estén vinculados a la universidad del Quindío, llama la atención acerca del riesgo potencial de adquirir esta infección por parte de personas inmunocomprometidas no solo por VIH sino por otras enfermedades tales como: cáncer, diabetes, transplantes, enfermedades autoinmunes y pulmonares.

La utilización de métodos de aislamiento y identificación de MNT más específicos es una necesidad imperiosa, ya que permiten determinar y describir los factores que contribuyen de manera directa o indirecta a la persistencia de las MNT en los SDAP (11).

La técnica de PRA mediada por PCR ha sido usada para la identificación y diferenciación de especie micobacteriana en razón de varias ventajas potenciales: Genera datos directos, inequívocos y puede distinguir linajes filogenéticos subespecíficos médicamente relevantes.



El gen *hsp65* región altamente conservada, presente en todas las micobacterias, es más variable que los genes que codifican para la subunidad del ARN ribosomal 16s y por lo tanto es potencialmente útil para la identificación de especies genéticamente relacionadas. Las variaciones de secuencia en el gen *hsp65* sirven para identificar tanto micobacterias de lento crecimiento como las de rápido crecimiento al nivel de especies (11, 18, 22, 23, 27).

El éxito de los aislamientos esta influenciado por varios factores entre los cuales se destacan los procesos de decontaminacion toda vez que en el se reduce sustancialmente la viabilidad y por ende el número y la variedad de especies, asi mismo algunas especies de MNT requieren de medios de cultivos especiales para su crecimiento tal es el caso de *M. haemophilum*, el cual solo crecen en un medio con hemina es decir en agar sangre y requiere de un periodo mayor de tres meses para evidenciar colonias. Otras de las dificultades es la necesidad de incubarlas en temperaturas que varían entre los 32 °C a 42°C si se desea obtener un óptimo crecimiento.

Es indispensable utilizar no solo la técnica bioquímica convencional, de detección e identificación sino también emplear la técnica genotípica que hoy se dispone a nivel mundial ya que en algunas ocasiones requiere la confirmación por técnica bioquímica convencional. (6,9). Además se ha observado que en la mayoría de las nuevas micobacterias hay una gran correlación entre sus características fenotípicas y genotípicas formando árboles filogenéticos que agrupan a las diferentes micobacterias (3).

## 12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ❖ Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran la presencia de Micobacterias no tuberculosas en los sistemas de distribución de agua potable de la Universidad del Quindío, por tal motivo se deben implementar medidas de vigilancia y control en alianza con las investigaciones científicas con el fin de encontrar una mejor estrategia en beneficio de la calidad del agua para evitar la propagación y diseminación.
- ❖ Aunque las especies encontradas en este estudio no están descritas como patógenas, se constituye en un riesgo potencial para el desarrollo de infecciones, especialmente en los estudiantes VIH positivos en la universidad de Quindío personas y por lo tanto consideramos necesario continuar los estudios enfocándolos en el análisis del impacto de estas especies en la salud humana.
- ❖ La epidemiología de las MNT no esta completamente entendida por lo cual se debe estudiar aspectos como la fuente, ruta de infección y su patogénesis, como es también muy escaso el conocimiento de la vigilancia lo cual seria vital para el manejo de las MNT.
- ❖ Los resultados que arrojan las pruebas genotípicas y las fenotípicas de las micobacterias tienen una gran correlación entre ellas, por ello se recomienda utilizar las dos técnicas para la confirmación de las especies identificadas.
- ❖ La resistencia de las MNT a los desinfectantes nos sugieren que se deben realizar investigaciones a nivel genético y metabólico para determinar con certeza la causa de la posible resistencia a los desinfectantes.

- ❖ Debido a que en el Municipio de Armenia la incidencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es del 2,1 por 10.000 habitantes y el grupo de edad afectado con mayor frecuencia esta entre los 25 y 34 años se recomienda extender la identificación de MNT en todo el municipio de Armenia principalmente en el hospital, albergues y las residencias de los pacientes (VIH) para conocer con certeza el riesgo que representan estas especies en la salud de las personas.
  
- ❖ Es importante que el personal de salud se les brinde mayor información sobre las MNT y sus efectos en la salud humana y de acuerdo a esto realizar una evaluación diagnostica para el respectivo tratamiento, tanto en los medicamentos a utilizar como en su duración.
  
- ❖ En general las infecciones que ocurren en pacientes quienes tienen contacto prolongado con reservas de agua, lesiones en la piel, microtraumas y inmunocomprometidos deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:
  - ✓ No tomar el agua que proviene de los grifos, ya que la MNT se pegan a los tubos de los sistemas de distribución de agua potable.
  - ✓ Hervir el agua que se consume en casa. Después del primer hervor dejarla de 10 a 15 minutos más.
  - ✓ Evitar lavar las heridas con agua de grifo, pues ellas pueden entrar y diseminarse por el organismo.

### 13. BIBLIOGRAFIA

1. Telenti, et al.1993 Rapid identification of micobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 31:175-178.
2. Wayne LG. 1985.The “atypical” micobacteria: Recognition and disease assocition. CRC Crt Rev Microb. 12:185-222.
3. León franco clara Inés. 1998. Presencia de las Micobacterias No Tuberculosas en Colombia. MEDICAS UIS. Revista de los Estudiantes de medicina de la Universidad de Santander. 12:181-7.
4. Vaerewijck J.M. Mario,et al. 2005.Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health.FEMS Microbiology Reviews
5. Caminero Luna. J.A. 2001. Micobacterias atípicas. Servicio de Neumología. BSCP Can Ped.25-2.
6. Hosrburgh CR Jr. 1992.Epidemiology of micobacterial diseases in AIDS. Res Microbiol. 143:372-6.
7. Portaels F. 1995.Epidemiology of micobacterial diseases. Clin Dermatol.13:207-22.

8. Muños Rivas G. 1953. Micobacteriaceas del medio ambiente colombiano. VI congreso Internacional de Leprología.
9. Collins, C.H.,J.M. Grange, and M.D. Yates.1984. Micobacteria in water. J. Appl. Bacteriol. 57:193-211.
10. Alcaide Fernando, Benitez Miguel Angel. 2000. Aspectos Microbiológicos de la infección por *Mycobacterium Kansaii*. Servicio de Microbiología. Ciutat Sanitaria i Universitária de Bellvitge.
11. Instituto Nacional de salud. 2001. Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de referencia. Laboratorio de Micobacteriologia. Bogota.
12. Torniven, E. et al. 2004.Mycobacteria in water and Loose Deposits of Drinking water Dristribution Systems in Finland. Applied and Environmental Microbiology. 70:1973-1981. Finland.
13. Taylor, T.B. et al. 1997.Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media.J. Clin. Microbiol., 35: 79-85.
14. Devallois, A.; GOH, K.S.& Rastogi, N. 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR – restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp 65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J.Clin. Microbiol. 35:2969-2973.

15. Da Silva, C.F., Ueki, S.Y., Geiger Dde,C.,Leao, S.C., 2001.hsp 65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory.Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 43, 25-28.
16. Aronson, T, et al. 1999.Comparison of Large Restriction Fragments of Mycobacterium avium Isolates Recovered From AIDS and Non- AIDS patients with those of isolates from potable water. J.Clin. Microbiol.37:1008-1012.
17. Leao, S.C, et al. 2005.Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from latin America and the caribbean.Journal of .Microbiological Methods. 61: 193-199.
18. Schulze. Robbecke, R., Buchholtz K. 1992.Heat Susceptibility of Aquatic Mycobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 58: 1869-1873.
19. Le Dantec. C. et al. 2002. Occurrence of Mycobacteria in water treatment lines and water Distribution Systems. Applied and Environmental Microbiology. 68:5318-5325.
20. September, S.M. Bruzel, V.S.& Venten, S.N. 2004.Diversity of Nontuberculoïd Mycobacterium species in Biopelículas of Urban and Semiurban Drinking Water Dristibution System.Applied and Environmental Microbiology. 70:7571-7573.
21. Wang,S.X.etal.2005. Rapid identification of pathogenic Rapidly Growing Mycobacteria by PCR- Restriction Endonuclease Analysis. Annals Academy of Medicine.34:137-140.
22. Covert, T.C. et al. 1999. Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in environmental Samples. Applied and Environmental Microbiology.65:2492-2496.

23. Leoni. E. et al. 1999. Prevalence of Mycobacteria in Swimming pool Environment. Journal of Applied Microbiology. 85:685-688.
24. Ellner, P.D. et al. 1988. Rapid detection and identification of mycobacteria by combining radiometric and nucleic acids probe methods. J.Clin. Microbiol. 26:1349-1352.
25. Leite, C.Q. et al. 1998. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience.Mem. Inst.Oswaldo Cruz. 93:801-805.
26. Serna LS,Leon CI, Giraldo E, et al. 1987. Presencia de micobacterias atípicas en peces ornamentales. Biomedica (sup1)51.
27. Agudelo SP, Moreno LJ. 1998. Incidencia de micobacterias atípicas en aguas de abastecimiento humano en centros educativos al sur occidente de Santa fé de Bogotá.Tesis de grado. Universidad Inca.
28. Böddinghaus, B., et al. 1990.Detection and identification of mycobacteria by amplification of Rrna. Clin. Microbiol.28:1751-1759.
29. Murcia, M.I. et al. 2004. Distribución de patrones PRA en aislamientos clínicos del complejo Mycobacterium avium procedentes de España y Suramérica. Biomédica.24 (supl)604.
30. Rocha,A.S.et al. 1999. Use of PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp 65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. J. Microbiol.Meth.,37:223-229.

31. Butler, W.R.et al. 1991. Identification of mycobacteria by high- performanc liquid chromatography. J.Clin. Microbiol.29:2468-2472.
32. Marks, J., and T. Szulga. 1965. Thin- layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification; technical procedures;Mycobacterium fortuitum. Tubercle. 46:400-411.
33. Ringueth,et al. 1999. sp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology.37:852-857.
34. Springer, B. et al. 1996. Two-laboratory Collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. Journal of Clinical Microbiology. 34: 296-303.
35. Primm,T.et al. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews.17: 98–106.
36. Chang, C.et al. 2002. Identification of Nontuberculous Mycobacteria Existing in tap water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. Applied and Environmental Microbiology.68: 3159-3161.
37. Angenent, L.T.et al. 2005. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. Pnas.102:4860-4865.
38. Parashar D.et al. 2004. Optimization of Produres for isolation of Mycobacteria from soil and water samples obtained in Northern India. Applied and Environmental Microbiology.70:3751-3755.



39. Da Silva A. et al. 2002. Novel allelic Variants of Mycobacteria Isolated in Brazil as Determined by PCR-Restriction Enzyme Analysis of hsp 65. *Journal of Clinical Microbiology*.40:4191-4196.
40. Leão, S.C, et al.2004. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. European Commission International Cooperation (INCO) for Developing Countries (DEV) Concerted Action (CA) project N°ICA 4-ct-2001-10087,Brussels,Belgium.
41. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de enfermedades infecciosas y parasitarias. <http://www.Seimc.org/protocolos/microbiologia/Cap9.htm> #35c.
42. Bhattacharya B. et al.2003. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Tropical Medicine and International Health*. 8:150-157.
43. American Thoracic Society.1997. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*.156:S1-S25.
44. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. 2000. Management of opportunist mycobacterial infections:Joint Tuberculosis Committee guidelines.*Thorax*.55:210-8
45. Ruiz Manzano J. et al. 1998. Recomendaciones SEPAR Nomenclatura y clasificación de las micobacterias. *Arch Bronconeumol*.34:154-7.

46. Medina Cruz MV, et al.1999.Enfermedades producidas por micobacterias ambientales. Med Clin (Barc). 113:621-30.
47. Casal M. 2003. Cómo denominar a las micobacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* y a *M. leprae*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 21:296-8.
48. Inderlied, C.B.et al. 1993. The *Mycobacterium avium* complex.Clin.Microbiol. Rev.6:266-310.
49. Soto, I.et al.1995. Infección por *Mycobacterium kansasii* en paciente con SIDA. Revista Argentina de Infectologia. 8:21-24.
50. Henry MT.et al.2004. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology,treatment and response.Eur Respir J.23:741-6.
51. Bloch KC,et al. 1998. Incidence and clinical implications of isolation of *Mycobacterium kansasii*:results of a 5-year, population-based study. Ann Intern Med.129:698-704.
52. Da Costa Cruz, J.C.1938. *Mycobacterium fortuitum* um novo bacillo acidoresistance patogenico para o homen. Acta Medica (Rio de Janeiro)1:297-301.
53. Leite,C.Q.F. et al.1989. Prevalencia e distribuicao de micobacterias nas aguas de algumas regioes do Estado de Sao Paulo – Brasil. Revista de Microbiologia. 20:432-441.
54. Oriani, D.S., and M.A. Sagardoy.2002. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). Rev. Argent. Microbiol. 34:132-7.

55. Oliveira,R.S. et al. 2001. Micobacteriose cutanea atípica pósmesoterapia. Anais Brasileiros de Dermatologia.76:711-715.
56. Reis,C.M.S. et al. 1993. Complicacoes cutaneas da mesoterapia:infeccao por Mycobacterium fortuitum (duas observacoes). Anais Brasileiros de Dermatologia. 68:277-280.
57. Restrepo, M.A.,et al.1981. Lesiones de los tejidos blandos causadas por *Mycobacterium fortuitum-chelonei*. Acta Medica Colombiana. 8:235-240.
58. Corti, M. et al. 1999. Disseminated infection due to Mycobacterium fortuitum in an AIDS patient. Medicina (B Aires) 59:274-6.
59. Nascimento, M.C.P., and P.P. Gontijo Filho.1991. Ocorrencia de micobacterias atípicas en ambientes acuáticos. Jornal de Pneumologia. 17:166-168.
60. Ruiz Perez, A., and L.M. Mederos Cuervo. 1999. Mycobacteriosis caused by Mycobacterium gordonae. First case reported in cuba. Rev Cubana Med Trop. 51:128-9.
61. Masson, A.M., and F.H. Prissick.1956. Cervical Lymphadenitis in children caused by chromogenic Mycobacteria.Can. Med. Assoc J. 75:798-803.
62. Falkinham, J.O.,3rd,B.C. Parker, and H. Gruft.1980. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. I.Geographic distribution in the eastern United States. Am Rev Respir Dis 121:931-7.

63. Wendt, S.L. et al. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria.III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. Am Rev Respir Dis.122:259-63.
64. Andrade, L. et al. 1986. Infecção pulmonar por Mycobacterium scrofulaceum. Jornal de Pneumologia. 12:175-179.
65. Ferrazoli, L.et al. 1992. Micobacterias outras que não o Mycobacterium tuberculosis: análise da ocorrência e de aspectos relevantes ao diagnóstico da infecção. Hansen int. 17:15-20.
66. Ferreira, R.M.et al.2002. Nontuberculous mycobacteria I: one year clinical isolates identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro,Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era.Mem Inst Oswaldo Cruz. 97:725-9.
67. Nuñez,L.C.et al.1991. Micobacteriosis por Mycobacterium scrofulaceum: reporte de un caso. Revista Cubana de Medicina Tropical. 43:124-127.
68. Moore,M., and J.B. Frerichs.1953. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous,abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, Mycobacterium abscessus, n.sp.J Invest Dermatol.20:133-69.
69. Casagrande,I.S.J.,J.Lucciola,andC.A.Salles.1986. Micobacterias atípicas em biopróteses:causa potencial de endocarditecom culturas negativas.Arq.Bras.Cir.Cardiovasc 1:40-43.

70. Jorge Sdo, C.et al.1994. Endocarditis due to *Mycobacterium chelonae* in a valvular prosthesis. *Arq Bras Cardiol.* 63:121-5.
71. Woo,P.C.et al.2002. Relatively alcohol-resistant mycobacteria are emerging pathogens in patients receiving acupuncture treatment. *J.Clin Microbiol.* 40:1219-24.
72. Morris A, Harrison A.C.2003.Chapter 19: Non-Tuberculous Mycobacteria. *Guidelines for Tuberculosis Control in New Zealand.*p,1-24.
73. Bendelac,A.et al.1985. *Mycobacterium chelonae* cutaneous infections.General review apropos of a case. *Ann Dermatol Venereol.*112:319-24.
74. Greub,G. and Raoult, D.2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:413-433.
75. Rohr, U. et al. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1822-1824.
76. Ang,P.et al.2000. Retrospective study of *Mycobacterium marinum* skin infections.*Int J Dermatol.*39:343-7.
77. Bailey,R.K,et al. 1970. The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water.*Am. Rev. Respir. Dis.*101:430-431.
78. Kawai, M, et al.2004. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply systems determined by real-time

PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Applied. Microbiol.* 97:1123-1131.

79. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2002. Health risks from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems. 17:50. <http://www.epa.gov/safewater>.

80. Vincent Levy-Frebault V. 1991. Ecologie des mycobacteries et mode de contamination humaine. *Med Mai Infect.* 21:16-25.

81. Russell AD. 1996. Activity of biocides against mycobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 81:87s-101s.

82. Menaia, J. and Mesquita, E. 2004. Drinking water pipe biofilm: present knowledge, concepts and significance. *Water Supply* 4, 115-124.

83. Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8:881-90.

84. Falkingham, J.O., 3rd. 2002. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med.* 23:529-51.

Livanainen, E. et al. 1999. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *J Appl Microbiol.* 86:673-81.

85. Schulze-Robbecke, R., and R. Fischeder. 1989. Mycobacteria in biofilms. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 188:385-90.

86. Schulze-Robbecke, R., B. Janning, and R. Fischeder. 1992. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuber Lung Dis.* 73:141-4

87. Falkinham, J.O. et al. 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.*67:1225-1231.
88. Taylor, R. et al. 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Applied. Environ. Microbiol.*66:1702-1705.
89. Carson, L. et al. 1978. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.*36:839-846.
90. Norton, C.D., and M.W. LeChevallier. 2000. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.*66:268-276.
91. Marsollier, L. et al. 2003. Ecology and transmission of *Mycobacterium ulcerans*. *Pathol Biol (Paris)* 51:490-5.
92. Hoffmann, R. and Michel, R. 2001. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of Drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*203:215-219.
93. Sibille, I. et al. 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.*64:197-202.
94. Allison, D.G. 1993. Biofilm-associated exopolysaccharides. *Microbiol. Eur.*1:16-19.

95. Watnick, P. and Kolter, R.2000. Biofilm, city of microbes.J.Bacteriol.182:2675-2679.
96. Wimpenny,J.et al. 2000. Heterogeneity in biopelículas. FEMS Microbiol.Rev.24:661-671.
97. Dunne Jr.,W.M. 2002. Bacterial adhesion:seen any good biofilms lately? Clin. Microbiol.Rev.15:155-166.
98. Martiny,A.C.et al. 2003. Long-term succession of structure and diversity of a biopelículas formed in a model drinking water distribution system.Applied.Environ. Microbiol. 69:6899-6907.

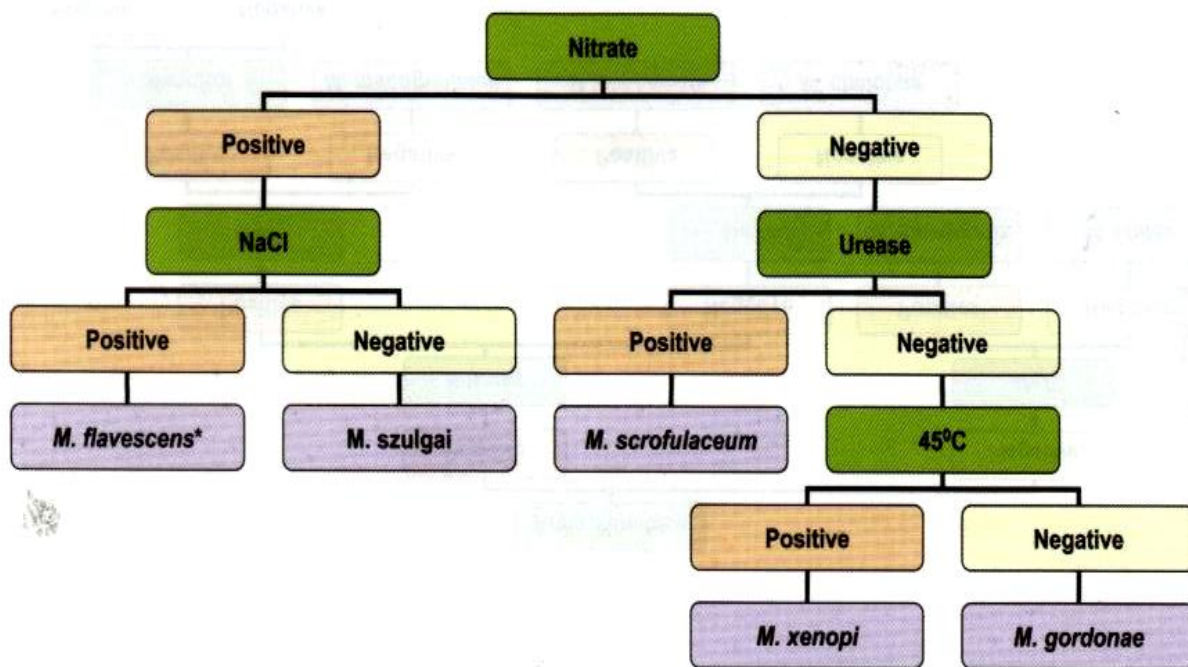


## ANEXOS

### ANEXO 1

Pruebas enzimáticas para la identificación de escotocromógenas de lento crecimiento.

### ESCOTOCROMÓGENAS DE LENTO CRECIMIENTO



\* *M. flavescens* puede ser identificado como un rápido crecedor.